



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

VICERRECTORÍA EJECUTIVA

SISTEMA UNIVERSITARIO DE BIBLIOTECAS

Biblioteca Digital

La presente tesis es publicada a texto completo en virtud de que el autor ha dado su autorización por escrito para la incorporación del documento a la Biblioteca Digital y al Repositorio Institucional de la Universidad de Guadalajara, esto sin sufrir menoscabo sobre sus derechos como autor de la obra y los usos que posteriormente quiera darle a la misma.

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD



**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

**“ASOCIACIÓN ENTRE LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA
INTESTINAL Y LOS METABOLITOS INTESTINALES CON
CITOCINAS PROINFLAMATORIAS Y MARCADORES DE
ACTIVACIÓN VASCULAR EN PACIENTES CON VIH Y
ENFERMEDAD POR HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO”**

PRESENTA

TANIA ELISA HOLGUIN AGUIRRE

DIRECTOR DE TESIS

DRA. EN C. KARINA SÁNCHEZ REYES

CODIRECTORA DE TESIS

DRA. EN C. MONSERRAT ÁLVAREZ ZAVALA

ASESOR DE TESIS

DRA. LUZ ALICIA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

GUADALAJARA, JALISCO. NOVIEMBRE, 2022

DEDICATORIA.

A mi familia y a mis pacientes.

AGRADECIMIENTOS.

A las Dras. Karina y Monse por su paciencia y enseñanzas.

Pero también, por ser un ejemplo de mujeres comprometidas con la ciencia.

A la Dra. Teresita por su trabajo, indispensable en el análisis de la microbiota intestinal.

A Lucero por su apoyo y por su confianza.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	4
ABREVIATURAS	6
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	15
I. INTRODUCCIÓN	18
II. MARCO TEÓRICO	20
1. El virus de la inmunodeficiencia humana.....	20
1.1. Epidemiología de la infección por VIH.....	21
1.2. Entrada y ciclo de replicación del VIH.....	22
1.3. Patogénesis de la infección por VIH.....	23
1.4. Tratamiento antirretroviral.....	24
1.5. Enfermedades no definitorias de SIDA.	25
2. Enfermedad por hígado graso no alcohólico.....	26
2.1. Prevalencia e incidencia de NAFLD.....	27
2.2. Prevalencia de NAFLD en grupos de alto riesgo.	28
2.3. Patogénesis de NAFLD.....	30
3. Microbiota intestinal en VIH-NAFLD.	32
3.1. Metabolismo Microbiano en VIH-NAFLD.	35
3.2. Eje intestino-hígado.....	35
4. Perfil inflamatorio en VIH-NAFLD.....	37
5. Marcadores vasculares en VIH-NAFLD.	38
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	41
IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	42
V. JUSTIFICACIÓN	42
VI. HIPÓTESIS	43
Hipótesis nula.....	43
Hipótesis alterna.....	43
VII. OBJETIVOS	43

Objetivo general.....	43
Objetivos específicos.....	43
VIII. DISEÑO METODOLÓGICO.....	44
Diseño de estudio.....	44
Universo del estudio.....	44
Tamaño de la muestra.....	44
Periodo de estudio.....	44
Sede del estudio.....	44
Financiamiento.....	45
Tipo de muestra.....	45
Consideraciones éticas.....	45
Bioseguridad.....	46
Criterios de selección.....	46
Variables.....	47
Material y métodos.....	49
Análisis estadístico.....	53
IX. RESULTADOS.....	54
X. DISCUSIÓN.....	98
XI. CONCLUSIONES.....	124
XII. LIMITACIONES.....	129
XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	130
XIV. PRODUCTOS.....	148

ABREVIATURAS.

AAA Aminoácidos aromáticos	Env Proteína de envoltura
ABC Abacavir	ER Del inglés: <i>Endoplasmic reticulum</i>
ADN Ácido desoxirribonucleico	FAS Gen que codifica para el ligando Fas (FasL) o Apo-1
ALT Alanina aminotransferasa.	FTC Emtricitabina
APRI Del inglés: <i>Aspartate aminotransferase to platelet ratio index</i>	GALT Del inglés: <i>gut associated lymphoid tissue</i>
ARFI Del inglés: <i>Acoustic Radiation Force Impulse</i>	GGT Gamma-glutamil transferasa
ARN Ácido ribonucleico	Gp41 Glicoproteína 41
ARNm ARN mensajero	Gp120 Glicoproteína 120
AST Aspartato aminotransferasa	GSG Glutamato-serina-glicina
BCAA Del inglés: <i>branched chain amino acids</i>	GSH Glutation en estado reducido
BCKDH Del inglés: <i>branched chain alpha keto acid dehydrogenase</i>	HCC Del Inglés: <i>hepatocellular carcinoma</i>
BCKDK Del inglés: <i>branched chain ketoacid dehydrogenase kinase</i>	HDL Del inglés: <i>high density lipoprotein</i>
CCR5 Quimiocina receptora tipo 5	HIF Del inglés: <i>hypoxia inducible factor</i>
CD4 Antígeno de diferenciación 4	HSH Hombres que tienen sexo con hombres
CD8 Antígeno de diferenciación 8	hs-PCR Proteína C reactiva de alta sensibilidad
CDC Del inglés: <i>centers for Disease Control and Prevention</i>	HTA Hipertensión arterial
CXCR4 Quimiocina receptora tipo 4	HTLV III Del inglés: <i>human T-lymphotropic virus III</i>
CVD Del inglés: <i>Cardiovascular Disease</i>	ICAM-1 Del inglés: <i>inter cellular adhesion molecule</i>
DE Desviación estandar	IFN Interferón
DM2: Diabetes mellitus tipo 2	IL Interleucina
ECV Enfermedad cardiovascular	IMC Índice de masa corporal
ELISA Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas	InVIH Instituto de Investigación en Inmunodeficiencias y VIH
ENT Enfermedades no transmisibles	

INSTI Inhibidor de la transferencia de las cadenas de la integrasa

IP Inhibidores de proteasa

IR Del inglés: *Insulin Resistance*

ITRNN Inhibidor no nucleósido de la transcriptasa reversa

LDL Del inglés: *low density lipoprotein*

LSH Lipasa sensible a Hormonas

MRS-PDFF Resonancia magnética con espectroscopia y medición de la densidad de grasa

NAFLD Del inglés: *non alcoholic fatty liver disease*

NASH: Del inglés: *non alcoholic steatohepatitis*

NF-κB Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

OMS Organización mundial de la salud

ONUSIDA Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA

PCA Del inglés: *Principal Coordinate Analysis*

PCR Proteína C Reactiva

PDGF Del inglés: *Platelet-derived growth factor*

PSGL-1 Ligando de glicoproteína P-selectina

PVVIH Personas que viven con VIH

RI Resistencia a la insulina

RIQ Rango intercuartilar

ROS Del inglés: *Reactive oxygen species*

sCD36 Fracción soluble de CD36

SCFA Del inglés: *short chain fatty acids*

SIDA Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

MS Del inglés: *Metabolic syndrome*

TAF Tenofovir alafenamida

TARV Terapia antiretroviral

TDF Tenofovir disoproxilfumarato

TGL Triglicéridos

TFG Tasa de filtrado glomerular

TGF-β Factor de crecimiento tisular β

TLR Del inglés *Toll like Receptors*

TNF-α Factor de necrosis tumoral α

Treg Células T reguladoras

3TC Lamivudina

UFC Unidad formadora de colonias

USG Ultrasonografía

VIH Virus de inmunodeficiencia humana

VLDL Del inglés *very low density lipoprot*

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Estructura del Virus de la Inmunodeficiencia Humana.....	21
Figura 2. Entrada y ciclo de replicación del VIH.....	23
Figura 3. Patogénesis de NAFLD.....	32
Figura 4. Barrera intestinal.....	36
Figura 5. Algoritmo de distribución de los pacientes por grupos.....	54
Figura 6. Niveles de IL-6 e IL-18.....	63
Figura 7. Niveles de IL-18 en relación a los grados de esteatosis por USG.....	71
Figura 8. Niveles de Ox-LDL en relación a los grados de esteatosis por USG.....	72
Figura 9. Analisis de correlaciones entre las varibles de interés en el grupo control.....	73
Figura 10. Analisis de correlaciones entre las variables de interés en el grupo esteatosis.....	74
Figura 11. Análisis de correlaciones entre las variables de interes en el grupo control y grupo fibrosis.....	75
Figura 12. Analisis de correlaciones entre las variables de interes en grupo control vs. el grupo con esteatosis más fibrosis.....	75
Figura 13. Concentración de aminoácidos plasmáticos en grupos con y sin esteatosis.....	77
Figura 14. Perfil de aminóácidos con concentraciones por encima de los valores de referencia en PVVIH con y sin esteatosis.....	78
Figura 15. Perfil de aminóácidos con concentraciones por debajo de los valores de referencia en PVVIH con y sin esteatosis.....	78
Figura 16. Perfil de aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs) en PVVIH con y sin esteatosis.....	79
Figura 17. Evaluación de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) en heces de pacientes de los cuatro grupo de estudio.....	80
Figura 18. Curva de rarefacción de la microbiota intestinal de los cuatro grupos incluidos para el análisis.....	82
Figura 19. Diversidad alfa de la microbiota intestinal.....	83

Figura 20. Diversidad beta de la microbiota intestinal.....	85
Figura 21. Abundancia relativa a nivel de filo y género de la microbiota intestinal de pacientes con la población total y los diferentes grupos analizados.....	73
Figura 22. Heatmaps del <i>core</i> microbiano a nivel género para cada grupo.....	88
Figura 23. Diagrama de Krona de la composición microbiana en los diferentes grupos de estudio.....	89
Figura 24. Patrón presente de microbiota intestinal según enterotipo y grupo de pacientes para <i>Bacteroidetes</i> , <i>Firmicutes</i> y <i>Prevotella</i>	91
Figura 25. Análisis estadístico <i>Metagenomaseq</i> para la asociación de la comunidad microbiana en los diferentes grupos.....	93
Figura 26. Redes de correlación de condición más relevantes presentes en los diferentes grupos.....	95
Figura 27. Taxones como biomarcadores candidatos para grupos.....	96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Operalización de variables.....	48
Tabla 2. Distribución de las PVVIH por grupos.....	55
Tabla 3. Características demográficas y medidas antropométricas.....	56
Tabla 4. Datos sobre la infección por VIH.....	57
Tabla 5 . Estudios de laboratorio e índice HOMA.....	58
Tabla 6. Índices predictivos de esteatosis, fibrosis y riesgocardiovascular.....	61
Tabla 7. Niveles séricos de citocinas.....	63
Tabla 8. Niveles séricos de marcadores de activación vascular.....	64
Tabla 9. Comparación entre el grupo control vs. grupo esteatosis.....	65
Tabla 10. Comparación entre el egrupo control vs. esteatosis + fibrosis.....	65
Tabla 11. Comparación entre el grupo control vs. fibrosis.....	66
Tabla 12. Comparación entre el grupo control vs. grupo esteatosis moderada y severa (esteatosis grado 2 y 3).....	66
Tabla 13. Comparación entre el grupo control vs. grupo esteatosis + fibrosis severa (ARFI-4).....	68
Tabla 14. Comparación entre el grupo control vs. grupo esteatosis moderada y severa (esteatosis grado 2 y 3) + fibrosis.....	69
Tabla 15. Concentración de aminoácidos en grupos con y sin esteatosis hepática.....	76

RESUMEN.

Introducción: La infección VIH afecta a 36,9 millones de personas alrededor del mundo. Con la introducción de la terapia antirretroviral (TARV) la infección con el VIH, se considera una enfermedad crónica y manejable. Sin embargo, la presencia del VIH, la depleción de linfocitos T CD4⁺, el daño al GALT, así como la disbiosis y traslocación bacteriana inducen una activación inmune sistémica que resulta en una inflamación crónica de bajo grado, eventos que se han correlacionado al desarrollo de comorbilidades no SIDA entre ellas la esteatosis hepática no alcohólica, misma que se relaciona con un riesgo aumentado de CVD. NAFLD comprende una serie de alteraciones hepáticas en quienes no tienen un consumo significativo de alcohol, que abarca desde esteatosis y esteatohepatitis, hasta grados avanzados de fibrosis, cirrosis y HCC. Los factores metabólicos (obesidad, DM2, dislipidemia, etc.) son la base en la patogénesis. En quienes viven con VIH, la microbiota intestinal ha cobrado relevancia como factor asociado al desarrollo y progresión de enfermedad metabólica, NAFLD y CVD. En PVVIH, se ha reportado un aumento en el filo *Proteobacteria*, así como una alteración en la relación Firmicutes/Bacteroidetes. En pacientes NAFLD, se ha documentado un incremento en *Proteobacteria*, *Enterobacteria*, *Escherichia*, *Bacteroidetes* además de *Parabacteroidetes* y *Allisonela*, así como una disminución de *Firmicutes*. Los componentes funcionales de la microbiota como los SCFA (propionato, butirato, acetato, además de ácido valérico y capríco); tienen un impacto directo en el metabolismo humano y se asocian a un estado inflamatorio persistente. El proceso inflamatorio crónico presente en pacientes con VIH y NAFLD, aunado al proceso disbiótico, condicionan una desregulación en el metabolismo de los BCAAs (valina, leucina e isoleucina), aminoácidos que se han correlacionado negativamente con la sensibilidad a la insulina. Se han descrito numerosos biomarcadores, asociados con NAFLD, entre ellos se encuentra Ox-LDL, la forma soluble de CD36 y el dímero-D, mismos que se asocian al desarrollo de CVD en respuesta a la presencia de mediadores inflamatorios y metabólicos, vinculando así la infección por VIH con el desarrollo de NAFLD y CVD.

Objetivo: Determinar la asociación entre la composición de la microbiota intestinal y los metabolitos microbianos, con los niveles plasmáticos de citocinas proinflamatorias y marcadores de activación vascular en pacientes con VIH y con NAFLD.

Metodología: Estudio transversal, analítico. *Universo de estudio:* PVVIH >18 años, en TARV, carga viral indetectable, con síndrome metabólico y con atención médica en la Unidad de VIH/SIDA del Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde” (HCG-FAA). *Tamaño de muestra:* 118 PVVIH que con base en los resultados de fibrosis por ARFI y esteatosis por USG, se dividieron en 4 grupos: a) Grupo control de PVVIH, b) Fibrosis, c) Esteatosis y d) Esteatosis más fibrosis. *Tipo de Muestra:* Heces, suero y plasma. *Metodos:* Se realizó una historia médica, exploración física y medidas antropométricas. Se realizaron laboratoriales generales en el Laboratorio Central del HCG-FAA. En el InVIH, se realizó la cuantificación de citocinas séricas a través de un ensayo multiplex basado en perlas utilizando el citómetro de flujo Attune NXT. La IL-6, el TNF- α así como los marcadores de activación vascular se determinaron por ELISA siguiendo las instrucciones de cada fabricante y las absorbancias se leyeron en el equipo Synergy de Biotek. La caracterización y análisis de la microbiota intestinal se realizó siguiendo el protocolo Illumina 2013 utilizando la plataforma MySeq. Finalmente, los niveles plasmáticos de BCAAs se evaluaron por HPLC en tanto que los niveles de SCFAs en heces se evaluaron por cromatografía de gases. Los BCAAs se determinaron en la Universidad Autónoma de Nuevo Leon (UANL) por pago de servicio y la determinación de las concentraciones de SCFA se llevo a cabo en colaboración con el Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierias (CUCEI-UDG).

Resultados: La prevalencia de NAFLD fue de 50.84%. Al comparar los cuatro grupos de estudio, se presentaron diferencias significativas en el IMC, circunferencias de cintura y cadera presentando los valores más altos el grupo de esteatosis y fibrosis. Así como en los niveles de hemoglobina, leucocitos, neutrófilos, VLDL, GGT e insulina. En relación a las PFHs, niveles de GGT presentaron significancia estadística, con los niveles más altos en el grupo con esteatosis más fibrosis, seguido del grupo de esteatosis. Al analizar las citocinas en

los grupos, se obtuvieron diferencias significativas en las concentraciones de IL-18 e IL-6,. No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de Ox-LDL, sCD36 o el dímero D. Sin embargo, al comparar el grupo control vs. grupo esteatosis más fibrosis, hay una elevación significativa de dímero D en este último grupo. Los niveles de Ox-LDL son significativamente más elevados en aquellas PVVIH con mayor grado de esteatosis. No se encontraron diferencias significativas en la concentración de los BCAAs en el grupo control y el grupo con esteatosis; interesantemente, se observó una elevación en la concentración de ácido aspártico y ácido glutámico. El grupo de esteatosis mostró un aumento significativo en la cantidad de propionato en heces en relación al grupo control. Respecto a la microbiota intestinal, el análisis de beta diversidad indicó la presencia de 3 enterotipos predominantes: *Bacteroides* en un 5%, *Firmicutes* en un 15%, y un marcado predominio de *Prevotella* (caracterizando al 80% de las muestras). Mediante la prueba PERMANOVA, se distinguieron dos enterotipos: *Firmicutes* presente en el 90% y *Prevotella* presente en el 10% de las muestras. Por abundancia relativa, a nivel de filo predominaron *Firmicutes* y *Bacteroides*, seguidos de *Proteobacteria* en el total de las muestras. En tanto que a nivel de género, hay un predominio de *Prevotella*, *Blautia*, *Faecalibacterium* y *Succinivibrio*, este último abundante en el grupo de esteatosis y esteatosis más fibrosis. Posterior a la construcción de un core microbiano, se observó que en el grupo control, los géneros *Blautia*, *Ruminococcus* y *Dorea* fueron los más característicos. En el grupo con fibrosis, predominó *Ruminococcus*, *Faecalibacterium*, *Coprococcus* y *Blautia*; en el grupo con esteatosis se encontró principalmente *Blautia*, *Ruminococcus* y *Coprococcus*; mientras que en el grupo de esteatosis con fibrosis, predominaron *Blautia* y *Ruminococcus*.

Conclusión: Con base en nuestros resultados, es evidente la necesidad de una intervención clínica integral y oportuna para estos pacientes, en quienes coexisten dos condiciones clínicas caracterizadas por una inflamación crónica sistémica, un estado procoagulante, la presencia de una disbiosis intestinal caracterizada por

especies microbianas proinflamatorias a través de la producción de metabolitos microbianos con un impacto directo en salud intestinal.

ABSTRACT.

Introduction: HIV infection affects 36.9 million people around the world. With the introduction of antiretroviral therapy (ART), HIV infection is considered a chronic and manageable disease. However, the presence of HIV, depletion of CD4+ T lymphocytes, GALT damage, as well as dysbiosis and bacterial translocation induced systemic immune activation that results in chronic low-grade inflammation, events that have been correlated to the development of non-AIDS comorbidities, including non-alcoholic hepatic steatosis, which is associated with a high risk of CVD. NAFLD comprises a series of liver disorders in those who do not have significant alcohol consumption, ranging from steatosis and steatohepatitis to advanced degrees of fibrosis, cirrhosis and HCC. Metabolic factors (obesity, DM2, dyslipidemia, etc.) are the basis of pathogenesis. In those living with HIV, the intestinal microbiota has gained relevance as a factor associated with the development and progression of metabolic disease, NAFLD and CVD. In PLHIV, an increase in the Proteobacteria phylum has been reported, as well as an alteration in the Firmicutes/Bacteroidetes ratio. In NAFLD patients, an increase in Proteobacteria, Enterobacteria, Escherichia, Bacteroidetes in addition to Parabacteroidetes and Allisonella, as well as a decrease in Firmicutes, have been documented. The functional components of the microbiota such as SCFA (propionate, butyrate, acetate, as well as valeric and caproic acid); they have a direct impact on human metabolism and are associated with a persistent inflammatory state. The chronic inflammatory process present in patients with HIV and NAFLD, together with the dysbiotic process, condition a deregulation in the metabolism of BCAAs (valine, leucine, and isoleucine), amino acids that have been negatively correlated with insulin sensitivity. Numerous biomarkers associated with NAFLD have been described, including Ox-LDL, the soluble form of CD36 and the D-dimer, which are associated with the development of CVD in response to the presence of inflammatory and metabolic mediators, thus linking HIV infection with the development of NAFLD and CVD.

Objective: *To determine the association between the composition of the intestinal microbiota and microbial metabolites, with plasma levels of proinflammatory cytokines and markers of vascular activation in patients with HIV and NAFLD.*

Methodology: *Cross-sectional, analytical study. Universe of study: PLHIV >18 years old, on ART, undetectable viral load, with metabolic syndrome and with medical attention in the HIV/AIDS Unit of the Civil Hospital of Guadalajara “Fray Antonio Alcalde” (HCG-FAA). Sample size: 118 PLHIV who, based on the results of fibrosis by ARFI and steatosis by USG, were divided into 4 groups: a) Control group of PLHIV, b) Fibrosis, c) Steatosis and d) Steatosis plus fibrosis. Sample Type: Feces, serum and plasma. Methods: A medical history, physical examination and anthropometric measurements were performed. General laboratories were carried out in the Central Laboratory of the HCG-FAA. At InVIH, serum cytokine quantification was performed through a bead-based multiplex assay using the Attune NXT flow cytometer. IL-6, TNF- α as well as vascular activation markers were determined by ELISA following the instructions of each manufacturer and the absorbances were read in the Biotek Synergy equipment. The characterization and analysis of the intestinal microbiota was performed following the Illumina 2013 protocol using the MySeq platform. Finally, the plasmatic levels of BCAAs were evaluated by HPLC while the levels of SCFAs in faeces were evaluated by gas chromatography. The BCAAs were determined at the Autonomous University of Nuevo Leon (UANL) for service payment and the determination of SCFA concentrations was carried out in collaboration with the University Center for Exact Sciences and Engineering (CUCEI-UDG).*

Results: *The prevalence of NAFLD was 50.84%. When comparing the four study groups, there were significant differences in BMI, waist, and hip circumferences, with the highest values in the steatosis and fibrosis group. As well as in the levels of hemoglobin, leukocytes, neutrophils, VLDL, GGT and insulin. In relation to the PFHs, GGT levels presented statistical significance, with the highest levels in the group with steatosis plus fibrosis, followed by the group with steatosis. When analyzing the cytokines in the groups, significant differences were obtained in the concentrations of IL-18 and IL-6. No significant differences were found in the concentrations of Ox-*

LDL, sCD36 or D-dimer. However, when comparing the control group vs. steatosis plus fibrosis group, there is a significant elevation of D-dimer in the latter group. Ox-LDL levels are significantly higher in those PLHIV with a higher degree of steatosis. No significant differences were found in the concentration of BCAAs in the control group and the group with steatosis; interestingly, an elevation in the concentration of aspartic acid was observed

and glutamic acid. The steatosis group showed a significant increase in the amount of propionate in feces in relation to the control group. Regarding the intestinal microbiota, the beta diversity analysis indicated the presence of 3 predominant enterotypes: Bacteroides in 5%, Firmicutes in 15%, and a marked predominance of Prevotella (characterizing 80% of the samples). Using the PERMANOVA test, two enterotypes were distinguished: Firmicutes present in 90% and Prevotella present in 10% of the samples. By relative abundance, Firmicutes and Bacteroides predominated at the phylum level, followed by Proteobacteria in all the samples. While at the genus level, there is a predominance of Prevotella, Blautia, Faecalibacterium and Succinivibrio, the latter abundant in the group of steatosis and steatosis plus fibrosis. After the construction of a microbial core, it was observed that in the control group, the genera Blautia, Ruminococcus and Dorea were the most characteristic. In the group with fibrosis, Ruminococcus, Faecalibacterium, Coprococcus and Blautia predominated; in the group with steatosis, mainly Blautia, Ruminococcus and Coprococcus were found; while in the group of steatosis with fibrosis, Blautia and Ruminococcus predominated.

Conclusion: Based on our results, it is evident the need for a comprehensive and timely clinical intervention for these patients, in whom two clinical conditions coexist characterized by chronic systemic inflammation, a procoagulant state, the presence of an intestinal dysbiosis characterized by microbial species. proinflammatory through the production of microbial metabolites with a direct impact on intestinal health.

XV. INTRODUCCIÓN.

La infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) continúa siendo un problema de salud pública que afecta a 36,9 millones de personas alrededor del mundo. La Terapia Antirretroviral (TARV), ha cambiado el paradigma de la infección con VIH y ahora se considera una enfermedad crónica manejable. Sin embargo, la presencia de una activación inmune persistente, la presencia sistémica de reactantes de inflamación crónica, la toxicidad por el uso crónico de la TARV y la presencia de factores de riesgo tradicionales por envejecimiento, contribuyen al desarrollo de trastornos reconocidos como Enfermedades No Comunicables entre las cuales se incluyen: Obesidad, DM2, dislipidemia, enfermedad renal crónica, enfermedad por hígado graso no alcohólica (NAFLD), enfermedad cardiovascular (CVD), entre otras. Así, en personas que viven con VIH (PVVIH), los eventos descritos, sumados a factores metabólicos como obesidad, DM2, dislipidemia y síndrome metabólico contribuyen al desarrollo y progresión de NAFLD. En este sentido, las PVVIH presentan un estado disbiótico que perpetúa la inflamación crónica a nivel local y sistémica. La disbiosis, aumenta la permeabilidad intestinal y la liberación de productos bacterianos hacia la circulación sistémica, lo que aumenta la exposición hepática a sustancias nocivas que aumentan la inflamación y la fibrosis hepática. Los cambios en el microbioma también pueden causar dismotilidad, inflamación intestinal y otros cambios inmunológicos en el intestino que podrían contribuir a la lesión hepática. Por lo tanto, es necesario caracterizar la microbiota, la presencia de metabolitos microbianos y mediadores inflamatorios en el contexto del VIH-NAFLD con el fin de dilucidar la influencia del estado disbiótico y sus efectos a través de mediadores producidos e inducidos por la microbiota que contribuyen a la patogénesis de NAFLD. Además, esto podría ayudar a encontrar biomarcadores no invasivos, precisos y reproducibles para el diagnóstico precoz de NAFLD en pacientes con VIH, ya que actualmente no hay un marcador oportuno que alerte al clínico sobre un probable desarrollo y/o progresión de NAFLD y se inicie una intervención terapéutica oportuna. Considerando los antecedentes, el objetivo de este estudio es determinar si existe una asociación

entre la microbiota intestinal con los niveles de metabolitos microbianos y biomarcadores vasculares, metabólicos e inflamatorios en PVVIH con NAFLD.

XVI. MARCO TEÓRICO.

1. El virus de la inmunodeficiencia humana.

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es el agente causal del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). El virus fue identificado por primera vez en 1983, derivado del aislamiento del virus en un paciente por el grupo encabezado por Luc Montagnier aislaron el virus en un paciente (1). En 1984, Robert Gallo y sus colaboradores demostraron que un retrovirus era el causante de la infección y lo denominaron Virus Linfotrópico de células T III (HTLV III), y posteriormente fue denominado virus de la inmunodeficiencia humana (2). El VIH pertenece a la familia *Retroviridae* y al género *Lentivirus*, y existen dos especies: VIH-1 y VIH-2, que comparten un 40 a 50% de homología genética. El tipo 1 es el agente etiológico de la pandemia de SIDA, en tanto que, VIH-2 es menos patogénico, transmisible y se encuentra distribuido principalmente en África. Del VIH-1, se han identificado cuatro grupos: M, N, O y P, el grupo M es el causante de la pandemia de VIH (3).

El virus VIH-1 posee una forma esférica y mide de 80 a 100 nm de diámetro, tiene un núcleo de forma cilíndrica. Está envuelto por una bicapa lipídica tomada a partir de la membrana de la célula infectada. En la envoltura están inmersas las glicoproteínas 120 (gp120) en la parte externa, y en el centro una glicoproteína transmembranal formada por tres glicoproteínas 41 (gp41). La capa interna denominada nucleocápside de la matriz celular está formada por la proteína p17 (p17). Al interior de la partícula viral se encuentra la cápside, la cual está compuesta por las proteínas p24 y p9, esta estructura encierra al genoma viral y las proteínas enzimáticas como la transcriptasa reversa, integrasa y proteasa, este complejo también se denomina nucleoide. Finalmente, la nucleocápside está compuesta por la proteína estructural p7 la cual interacciona directamente con el RNA viral al interior de la cápside y protege al genoma viral de nucleasas celulares, Figura 1 (3,4).

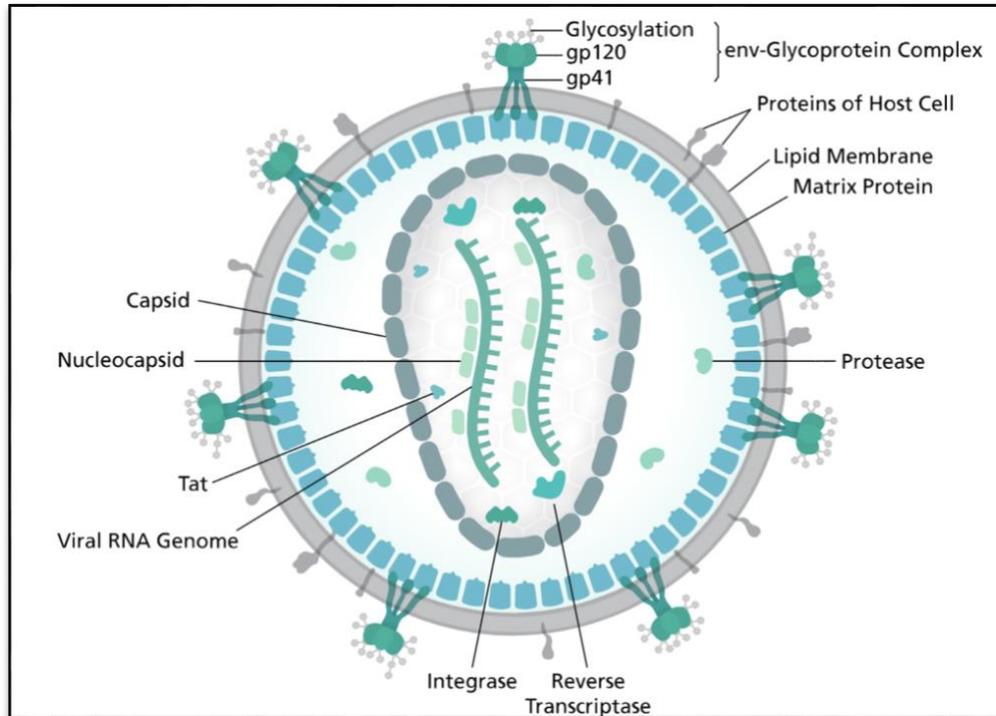


Figura 1. Estructura del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). Se visualiza la membrana lipídica del virus la cual contiene proteínas de la envoltura gp120 y gp41 y algunas proteínas de la célula del hospedero. Le continúa una estructura conformada por la proteína matriz p17, y al centro se observa la cápside compuesta por la proteína p24, estructura que encierra el genoma viral y proteínas como la integrasa, transcriptasa reversa y otras como Tat. Finalmente, se observa la interacción de la nucleocápside (p7) y el genoma viral. Tomado de scistyle, Thomas Spletstoeser 2014.

1.1. Epidemiología de la infección por VIH.

Desde el inicio de la epidemia de infección por VIH a la fecha, cerca de 77.3 millones de personas han sido infectadas a nivel mundial, de ellas, 35.4 millones han muerto por causas relacionadas a SIDA, de acuerdo con los últimos datos proporcionados por el Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA, alrededor de 37.7 millones de personas alrededor del mundo, viven con VIH (5,6).

Desde el inicio de la terapia antirretroviral altamente efectiva (TARV), ha marcado una diferencia en la esperanza y calidad de vida. Actualmente, 27.2 millones de personas que viven con VIH (PVVIH), tienen acceso a terapia antirretroviral (73%), el 80% de embarazadas con VIH en el mundo tienen acceso a tratamiento, lo que previene la transmisión neonatal (5).

En el 2021 se reportaron 1.5 millones de nuevas infecciones 680,000 muertes relacionadas a SIDA. (5) Sin embargo, las tasas de mortalidad se han reducido notablemente tras la implementación de TARV en el mundo, se calcula una reducción del 51% en las muertes relacionadas a SIDA, desde su pico más alto en el 2004. (3,5) También ha mejorado a través de los años el porcentaje de personas que conocen su enfermedad. Cifras al 2017 revelan que el 75% de las personas que viven con VIH conocen su estado serológico. (5) En México, hasta el primer trimestre del 2022, se tienen registrados 336,515 casos de infección por VIH; de los cuales, 208,697 se encuentran vivos. La tasa de mortalidad por VIH en México es de 3.82 por 100,000 habitantes. Actualmente en Jalisco, se tienen reportados 13,420 casos de infección por VIH/SIDA hasta el 2018, que representa el 6.6% de la población nacional (7).

1.2. Entrada y ciclo de replicación del VIH.

El VIH daña el sistema inmunológico y disminuye las defensas del hospedero al infectar a los Linfocitos T CD4⁺, que expresan el correceptor CCR5, sin embargo, en otros pacientes CXCR4 es el correceptor que facilita la unión al virus. Aunque los linfocitos T CD4⁺ son las principales células en orquestar la infección, otras células pueden expresar este receptor, como monocitos, macrófagos y las células dendríticas, siendo todas ellas susceptibles a la infección por el VIH (3,8).

Tras la entrada del virus, la glicoproteína gp120 interactúa con el receptor CD4⁺ en los linfocitos, lo que induce la formación de un puente entre los dominios internos y externos de gp120, con la consecuente exposición del sitio de unión al correceptor CCR5/CXCR4. La preferencia por uno u otro correceptor se denomina tropismo viral y es determinado por la variabilidad en la región V3 de gp120. El anclaje a este co-receptor genera la inserción del péptido de fusión, localizado en la región amino terminal de la glicoproteína gp41, a la membrana celular, y posteriormente ocurre una fusión de las dos membranas y entrada de la partícula viral. La liberación del ARN en el citoplasma, inicia la transcripción inversa; en el siguiente paso, se integra el ADN viral al ADN de la célula con ayuda de la integrasa (9).

El ADN viral integrado utiliza los recursos de transcripción celular del hospedero, para llevar a cabo la transcripción de diversos ARNm que generan las poliproteínas virales, las cuales son cortadas por la proteasa del VIH para dar origen a diversas proteínas que forman un nuevo virus, el cual sale de la célula por gemación llevándose parte de la membrana de la célula, madurando la partícula viral y haciéndola infecciosa, Figura 2 (9,10).

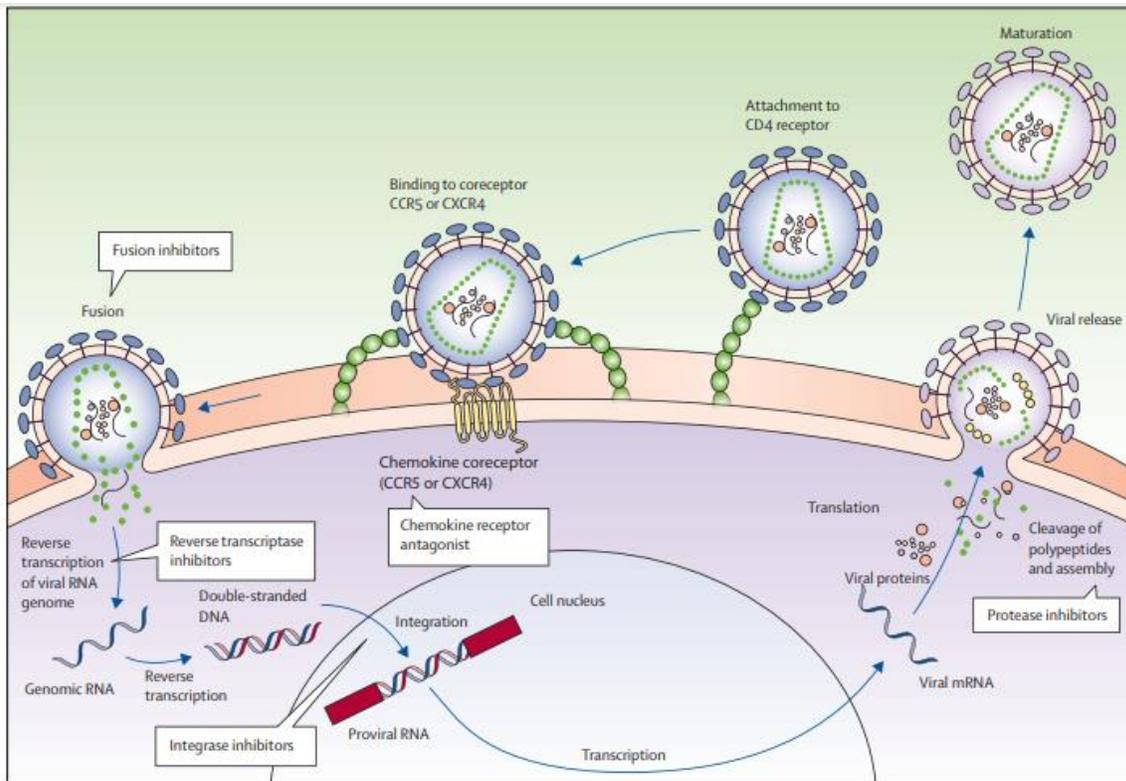


Figura 2. Entrada y ciclo de replicación del VIH. Se ilustra el proceso de entrada del virus, el cual requiere la expresión celular del receptor CD4 y los correceptores CXCR4 y CCR5. Una vez que se logra la fusión de membranas y la consecuente liberación del material genético viral en citoplasma se lleva a cabo el proceso de transcripción inversa. La molécula de ADN de doble cadena es después integrada al genoma del hospedero para posteriormente llevar a cabo la transcripción de diversos ARNm virales. Posterior al proceso de traducción se formarán diversas proteínas virales que se ensamblarán para dar origen a una nueva partícula viral que sale de la célula por gemación hacia el espacio extracelular, de ahí se inicia de nuevo el proceso de infección por entrada a otra célula. Tomada de Maartens G, Celum C, Lewin SR. *HIV infection: Epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention*, 384(9939):258–71, 2014 (9).

1.3. Patogénesis de la infección por VIH.

Uno de los eventos más notables durante la infección por VIH, es la disminución progresiva de los linfocitos T CD4⁺, la cual es secundaria a infección directa

(destrucción) e indirecta (formación de sincitios, activación inmune, proliferación y senescencia) .

Tras 3-4 días de infección se establece una diseminación local a través de los linfocitos T CD4⁺, que logra diseminarse a mucosas, submucosas y al tejido linforeticular. De esta forma, alcanza el tejido linfoide asociado a intestino (GALT), donde continua la replicación viral, con aumento en los niveles de ARN viral y respuesta inflamatoria, caracterizada por un aumento de citocinas, quimiocinas e interferones por parte del hospedero. Clínicamente, esta etapa se manifiesta como fiebre, linfadenopatía, faringitis, rash maculopapular, mialgias, artralgias, cefalea y hepatoesplenomegalia (11).

Días a semanas tras la infección, sobreviene la etapa de seroconversión, en la que es posible encontrar anticuerpos neutralizantes, lo que genera reducción de la viremia como resultado de la respuesta inmune y de la pérdida de células blanco, sobre todo, en el tracto gastrointestinal. Tras estos eventos, la viremia permanece estable durante años, sin síntomas clínicos pero como una infección crónica y destrucción continua de linfocitos T CD4⁺. Generalmente, hasta alcanzar un conteo de células T CD4⁺ por debajo de 200 células/ μ L sobrevienen síntomas constitucionales (fiebre, pérdida ponderal, diarrea, etc.) así como la infección por microorganismos oportunistas, descrita en pacientes con SIDA (9,12).

1.4. Tratamiento antirretroviral.

El objetivo principal del TARV es la supresión en la replicación del VIH, con lo cual evita la progresión en el daño al sistema inmunológica y tras lo cual sobreviene una reconstitución por aumento linfocitos T CD4⁺. Una vez recuperada la cuenta de linfocitos T CD4⁺, el riesgo de infecciones oportunistas y enfermedades definatorias de SIDA, disminuye (13).

Sin embargo, se ha asociado el uso de algunos grupos de antirretrovirales con el desarrollo de Resistencia a la Insulina (RI), aumento de grasa visceral y dislipidemia (14).

El uso de inhibidores de la transcriptasa reversa se asocia con desarrollo de disfunción mitocondrial con inhibición de la replicación de ADN mitocondrial por

unión a la polimerasa gamma, esto promueve el deterioro de la fosforilación oxidativa y causa formación de especies reactivas de oxígeno con daño al ADN mitocondrial, y contribuye a disfunción de este organelo celular. La disfunción mitocondrial hepática contribuye a la oxidación de ácidos grasos, de esta forma la mitocondria es incapaz de procesar esta oxidación y genera acumulación de triglicéridos. Este efecto sobre la mitocondria es evidente con los viejos inhibidores de transcriptasa reversa (15).

Por su parte, los inhibidores de proteasa (IP) se asocian con RI (sobre todo las primeras generaciones), dado que actúan como inhibidores potentes y específicos de transportadores del receptor GLUT4, lo cual conduce a hiperglicemia e hiperinsulinemia; además, tienen la capacidad de inhibir la secreción de insulina por parte de las células beta pancreáticas. Estudios recientes, parecen indicar que los inhibidores de proteasa contribuyen a la elevación de apolipoproteína B que se encarga de transportar lipoproteínas de baja densidad (LDL del inglés *low density lipoprotein*), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL del inglés *very low density lipoprotein*) y triglicéridos (TGL), así como la inhibición en el transporte de triglicéridos (16).

1.5. Enfermedades no definitorias de SIDA.

Tras el acceso al tratamiento antirretroviral, un buen número de pacientes ha logrado prolongar su esperanza de vida, con lo cual las enfermedades transmisibles y definitorias de SIDA han ido en descenso. De tal manera, que la infección por VIH se ha convertido en una enfermedad crónica, dando lugar a un incremento en el riesgo de comorbilidades por factores como:

- Activación inmune e inflamación crónica persistente
- Toxicidad a largo plazo por el uso de antirretrovirales
- Mayor prevalencia de factores de riesgo tradicionales por envejecimiento

Estos factores, contribuyen al desarrollo de otros trastornos, entre los que se incluyen: obesidad, Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), dislipidemia, Hipertensión Arterial (HTA), Enfermedad Cardiovascular (ECV), enfermedad cerebrovascular,

cáncer, enfermedad renal crónica, enfermedades óseas, enfermedad hepática, etc. Todas ellas son enfermedades no comunicables (17).

2. Enfermedad por hígado graso no alcohólico.

La enfermedad por hígado graso no alcohólico (NAFLD), hace referencia a las manifestaciones hepáticas de un grupo de condiciones que se asocian con disfunción metabólica. Se define por la presencia de esteatosis en al menos el 5% de los hepatocitos en aquellos pacientes sin consumo elevado de alcohol (≥ 30 mg/día para hombres y ≥ 20 mg/día para mujeres) y se suele acompañar de factores de riesgo metabólicos (particularmente, obesidad y DM2) (18).

NAFLD, involucra un espectro de cuadros clínicos y cambios histológicos que comprenden lesión directa a los hepatocitos por acumulación de gotas de triglicéridos, inflamación, activación de células estelares hepáticas y acumulación de matriz extracelular. Alrededor del 25% de los casos con hígado graso no alcohólico progresa a esteatohepatitis no alcohólica y desarrolla fibrosis. La persistencia de los factores metabólicos y la presencia de inflamación al inicio de la enfermedad son factores fuertemente asociados a la progresión de fibrosis. De aquellos pacientes con esteatohepatitis no alcohólica, el 40% permanecen con grados estables de fibrosis y el 35% progresa. El desarrollo de fibrosis es paulatino, con una media de 14 años para pacientes con hígado graso no alcohólico y 7 años para pacientes con esteatohepatitis no alcohólica; del 9 al 20% de los pacientes con NAFLD desarrollará cirrosis en un período de 5 a 10 años y, algunos de ellos desarrollarán Carcinoma Hepatocelular (HCC, del inglés: *Hepatocellular Carcinoma*), con una incidencia acumulativa de 20% cada 5 años, sin embargo, esta también puede ocurrir sin la presencia de cirrosis (19,20).

La evolución de la enfermedad hepática, puede explicarse por la "hipótesis del doble hit"; la cual considera dos eventos detonantes, en el primer insulto, hay una acumulación de lípidos en los hepatocitos generado por el consumo de grasas y el desarrollo de RI, estas alteraciones generarían una susceptibilidad hepática a factores dañinos como estrés oxidativo, polimorfismos genéticos, activación de vías inflamatorias (citocinas producidas por células de Kupffer o adipocinas producidas

por hepatocitos), desregulación de la apoptosis hepática, activación de células estelares hepáticas, todos estos factores constituirían el "segundo hit", que actuando de forma independiente generan progreso en la esteatosis macrovesicular y esteatohepatitis no alcohólica. La progresión incluye daño gradual al hígado, que se asocia a apoptosis, inflamación y fibrogénesis; la fibrosis progresa desde la zona periportal, hasta el desarrollo de cirrosis, falla hepática y hepatocarcinogénesis

2.1. Prevalencia e incidencia de NAFLD.

La prevalencia de NAFLD a nivel mundial es del 25.24% con una amplia distribución geográfica en todo el mundo. Las tasas de prevalencia más altas se reportan en Oriente Medio y América del Sur (alrededor del 30%), mientras que el número limitado de estudios de África informa una prevalencia mucho más baja con un 13%. La mayoría de los estudios sobre epidemiología de NAFLD se han realizado en Estados Unidos y América del Norte, regiones en donde se reporta una prevalencia de 21 al 24.7%, porcentaje de prevalencia muy similar al que se reporta en Europa (24%). A nivel mundial, el incremento en la prevalencia de HCC relacionado a NAFLD es concomitante a la epidemia global de obesidad, a su vez NAFLD es un causal directo de aumento de casos de HCC en EE. UU, Francia y Reino Unido. En Estados Unidos, NAFLD es la causa del 50-75% de la enfermedad hepática crónica, y se cree que se convertirá en la principal causa de cirrosis y HCC. En México, solo hay dos informes de la prevalencia de NAFLD; el primero, realizado en 2006, el cual detectó una prevalencia del 14.3% mediante ultrasonido hepático en adultos asintomáticos, mientras que el segundo, realizado en 2010, utilizó imágenes de resonancia magnética con espectroscopia y encontró una prevalencia del 45% (21,22)

Cabe destacar que personas obesas o delgadas con NAFLD reportan una incidencia para todas las causas de mortalidad de 12.1 por 1000 personas/año, 4.0 relacionada a la mortalidad por ECV y 4.1 para las enfermedades relacionadas a enfermedad hepática. Finalmente, los individuos delgados y obesos con NAFLD reportan una incidencia de 18.7 para el inicio de enfermedad cardiovascular y hasta un 56.1 para el inicio de hipertensión (23).

2.2. Prevalencia de NAFLD en grupos de alto riesgo.

- Obesidad, un índice de masa corporal elevado y la obesidad visceral parecen ser el factor de riesgo con más asociación a NAFLD, encontrando una prevalencia en algunas poblaciones de hasta 95%.
- Diabetes mellitus tipo 2, algunos estudios han mostrado que 1/3 a 2/3 de los pacientes diabéticos desarrollarán NAFLD, aunque la asociación parece ser bidireccional.
- Dislipidemia, la concentración elevada de triglicéridos y baja de lipoproteínas de alta densidad tienen una prevalencia de hasta el 50% en pacientes con NAFLD.
- La prevalencia de NAFLD en el sexo masculino es dos veces mayor que en las mujeres. La incidencia varía en el contexto mundial desde 28.01 a 52.34 por 1,000 personas (15).

Recientemente, se ha descrito que la población que vive con la infección con VIH y que se encuentra en un régimen de TARV, presenta un riesgo elevado para el desarrollo de NAFLD. En este sentido, se ha encontrado una prevalencia del 28-48% de NAFLD en pacientes que viven con VIH y las tasas son significativamente más elevadas en hombres. Aunque los factores de riesgo para NAFLD en los pacientes que viven con VIH son los mismos que para la población general, se ha propuesto que la etiología en este grupo varía (24).

En pacientes VIH, la patogénesis de NAFLD tiene de base los factores metabólicos (obesidad, DM2, dislipidemia, síndrome metabólico y ECV), además de los factores relacionados a la infección por VIH, como es la presencia del virus *per se*, el uso de la TARV (nucleósidos de primera generación e IP), el desarrollo de lipodistrofia, además del contexto de inflamación y activación inmunológica (asociados al desarrollo de IR), persistencia de infecciones virales (infección por virus de la hepatitis C y B, citomegalovirus), altamente prevalentes en pacientes infectados con VIH factores que pueden contribuir al desarrollo y progresión de NAFLD/NASH (del inglés, *non alcoholic steatohepatitis*), cirrosis y HCC (25).

La IR presenta una elevada prevalencia en la población que vive con VIH (alrededor del 35%). En VIH y en NAFLD se mantiene un estado de inflamación crónica en el cual destacan algunas citocinas como TNF- α e IL-6, y estas a su vez se han asociado a la presencia de IR. Sin embargo, aún es poco claro si otros marcadores de activación inmunológica característicos de ambas patologías como entidades separadas o en conjunto se asocian a IR (26).

La principal causa de muerte en pacientes con NAFLD, independientemente de la etapa, es la ECV. NAFLD aumenta hasta cuatro veces el riesgo de desarrollar depósitos de calcio en las arterias coronarias, por lo que los individuos con NAFLD tienen un riesgo incrementado de hasta seis veces más para ECV; por lo tanto, NAFLD debe considerarse como parte de la detección metabólica para la estratificación de ECV (25).

El gold estándar para el diagnóstico de NAFLD es la biopsia hepática, que permite distinguir entre esteatosis y esteatohepatitis no alcohólica, sin embargo, este procedimiento conlleva ciertas complicaciones (dolor, sangrado) por lo cual se prefiere adoptar algunos procedimientos no invasivos y con una buena sensibilidad, tales como tomografía computarizada o mejor aún, y con una sensibilidad del 100% la resonancia magnética con espectroscopia de protones con densidad de grasa (MRS-PDFF) (27).

Existen otros métodos para diagnóstico, Fibroscan, por ejemplo, permite medir de forma simultánea esteatosis y fibrosis, ayuda a determinar la atenuación ultrasónica a una frecuencia de 3.5 MHz, cuya sensibilidad aumenta de acuerdo al grado de esteatosis 78% para el estadio S1 y 86% para el estadio S3. (40)

Es importante, destacar que el único método útil para realizar una distinción entre NASH y NAFLD es la biopsia hepática, la importancia de esta diferenciación radica, en que el 25-35% de los pacientes con NASH progresarán a fibrosis hepática o cirrosis. Además, una buena proporción de pacientes en NASH tienen pruebas de función hepática en rangos normales. (40)

No existe un marcador de laboratorio, que por sí mismo pueda ser utilizado para el diagnóstico de NAFLD. Gamma-glutamil transferasa (GGT), frecuentemente se encuentra elevado en pacientes con NAFLD y se asocia a mortalidad. Alanina

aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) pueden tener elevación moderada. De modo que se han validado algunos puntajes, qué, considerando un conjunto de parámetros podrían predecir esteatosis hepática. A continuación, se describen algunos (28):

- NAFLD fibrosis score, se estima con la presencia de DM2, Índice de Masa Corporal (IMC), conteo de plaquetas, albúmina sérica, niveles de AST y el ratio AST/ALT. Un puntaje mayor a 0.675 tiene una sensibilidad del 86% y una especificidad del 71% para identificar esteatosis mayor al 5.56%, un resultado menor a -1.46 excluye fibrosis avanzada con un valor predictivo negativo del 88% (29).
- FIB-4, se calcula con los valores de transaminasas y plaquetas, un resultado menor a 1.45 tiene un valor predictivo negativo de 90% y sensibilidad del 70% para fibrosis avanzada, mientras que un valor mayor a 3.25 tiene una especificidad del 97% y un valor predictivo positivo de 65% para fibrosis avanzada por lo que FIB-4 resulta útil en la predicción de fibrosis y muerte (30).
- *Aspartate aminotransferase to platelet ratio index* (APRI), un valor mayor a 1.5% puede predecir fibrosis hepática con un valor predictivo positivo de 89%, y un valor menor al 0.5 excluye fibrosis hepática en un 80% (31).

Hasta el momento, la Sociedad Clínica Europea del SIDA, solo recomienda realizar ultrasonido hepático en aquellos pacientes que viven con VIH y que presentan Síndrome Metabólico (MS, del inglés *Metabolic Syndrome*) o alteraciones persistentes en los niveles de transaminasas (32). Es importante mencionar que estos scores no han sido validados en la población que vive con VIH.

2.3. Patogénesis de NAFLD.

La patogénesis de NAFLD es multifactorial, desde 1998 se planteó la hipótesis del doble hit, en la cual se consideraba la esteatosis como el primer *hit* o insulto al órgano hepático y este a su vez requería un segundo *hit* para progresar a NAFLD/fibrosis. Hoy en día, se considera la hipótesis de *multi-hit* lo que implica una

diversidad de factores que actúan en forma paralela y sinérgica en individuos con predisposición genética al desarrollo de NAFLD. Así, la patogenia de NAFLD, implica una interacción compleja entre diversos factores ambientales como son obesidad, cambios en la microbiota intestinal y variantes genéticas predisponentes que dan como resultado una homeostasis de lípidos alterada y una acumulación excesiva de triglicéridos y otras especies lipídicas en los hepatocitos. La IR es un mecanismo central que conduce a lipotoxicidad, estrés del retículo endoplásmico (ER), autofagia alterada y, en última instancia, lesión y muerte de los hepatocitos que desencadenan inflamación hepática, activación de células estelares hepáticas y fibrogénesis progresiva, lo que impulsa la progresión de la enfermedad (33), Figura 3.

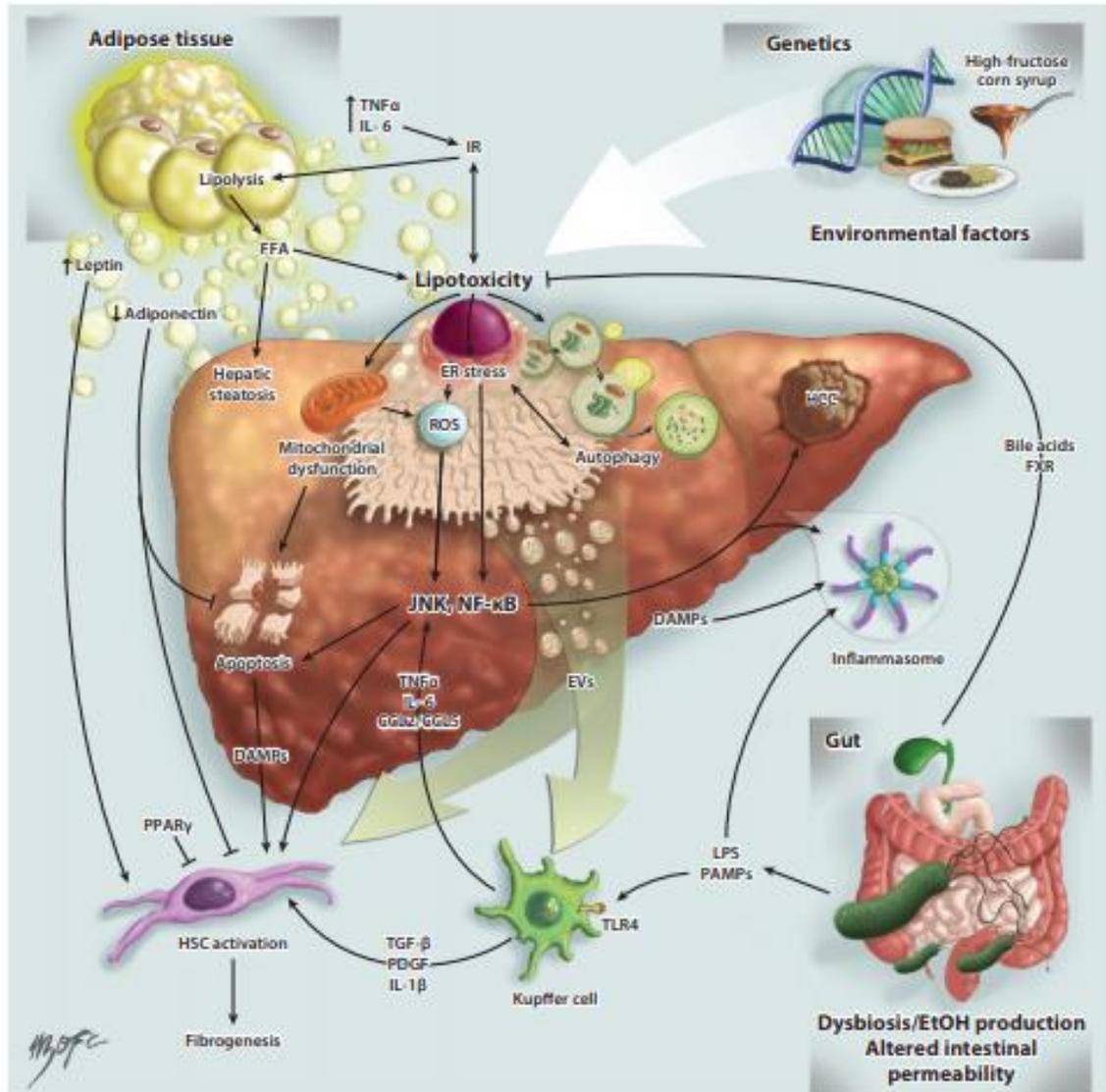


Figura 3. Patogénesis de NAFLD. Se visualiza como los principales componentes para el desarrollo y progresión de la enfermedad entre ellos, la dieta, los factores genéticos, la presencia de obesidad con expansión del tejido adiposo y aumento de la lipólisis debido a la resistencia a la insulina, resultando en lipotoxicidad, disfunción mitocondrial, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), estrés de ER, autofagia, apoptosis, activación del inflamasoma, liberación de vesículas extracelulares y, en última instancia, activación de células estelares hepáticas y fibrogenesis. Tomado de Arab, J. P., Arrese, M., & Trauner, M. *Recent Insights into the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease*, 13, 321–350, 2018 (33).

3. Microbiota intestinal en VIH-NAFLD.

La patogénesis de NAFLD es compleja e intervienen diversos factores que interactúan, resultando en un metabolismo lipídico alterado y un microambiente inflamatorio. La microbiota, está involucrada en la modificación del balance entre mediadores anti y proinflamatorios contribuyendo a la progresión a NASH. Se ha

demostrado, que los pacientes con NAFLD y NASH presentan permeabilidad intestinal alterada que se sustenta a nivel molecular con una disminución en la molécula de adhesión zonulina-1 (ZO-1). Las alteraciones en el eje intestino-hígado juegan un papel importante en la patogénesis de NAFLD, la disrupción en la barrera intestinal permite la translocación bacteriana que genera endotoxemia e induce la activación de las células de Kupffer así como de células estelares hepáticas lo que asienta una respuesta inflamatoria hepática vía activación de los receptores tipo Toll (TLRs, del inglés *Toll like Receptors*), y sensores, tales como el inflamasoma favoreciendo la síntesis de IL-1 β , Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α) y mediadores profibrogénicos como el Factor de Crecimiento Tisular- β (TGF β -1) y el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF, del inglés *Platelet-derived growth factor*), promoviendo una respuesta inflamatoria sostenida, así como cambios en la composición de la microbiota y productos bacterianos que colaboran en la inducción de esteatosis (33).

Específicamente, en pacientes con NAFLD se ha descrito una abundancia de especies como *Proteobacteria*, *Enterobacteria*, *Escherichia*, *Bacteroidetes*; *Parabacteroidetes* y *Allisonela* en pacientes con NASH, en tanto que estos pacientes muestran una baja concentración de *Faecalebacterium* y *Anaerosporobacter*. Además, se ha documentado un incremento en *Proteobacterias* y una disminución de *Firmicutes* durante la progresión de NAFLD. Los pacientes con NAFLD, tienen una mayor presencia de *Lactobacillus* en relación con controles sanos. En un estudio reciente, se reportó que pacientes NAFLD-cirrosis y NAFLD sin fibrosis están enriquecidos con *Streptococcus*; similar a lo encontrado en una cohorte italiana de pacientes con NAFLD-cirrosis con y sin HCC. Los pacientes NAFLD-cirrosis, mostraron un aumento en *Megasphaera*. Especies de la familia Enterobacteriaceae y los géneros *Streptococcus* y *Gallibacterium*. Las bacterias productoras de etanol tienen un papel esencial en la fisiopatología de la NAFLD. Se ha sugerido que la producción de etanol a partir de glucosa o fructosa, por microorganismos como *Escherichia*, *Lactobacillus fermentum* y *Weissella confusa*, aumenta el estrés oxidativo y la inflamación del hígado (34).

Una característica distintiva de las PVVIH es la disminución de la diversidad microbiana. A nivel de phylum se ha reportado un aumento en Proteobacteria, así como una alteración en la relación Firmicutes/Bacteroidetes. A nivel de clase, en PVVIH se incrementa *Gammaproteobacteria* y se reduce significativamente la clase *Clostridia*. Las familias *Prevotellaceae*, *Brucellaceae*, *Xanthomonadaceae*, y *Moraxellaceae* muestran una mayor abundancia en individuos VIH+ mientras que las familias *Lachnospiraceae*, *Christensenellaceae*, *Ruminococcaceae*, *Bacteroidaceae*, *Peptostreptococcaceae* y *Rhodospirillaceae* están disminuidas. Por otro lado, a nivel de género se reduce significativamente la abundancia de *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Faecalibacterium*, *Sutterella*, *Phascolarctobacterium*, *Roseburia*, *Lachnospira*, *Subdoligranulum*, *Ruminococcus*, *Blautia*, *Faecalibacterium*, y *Bifidobacterium* y se aumenta la presencia de *Citrobacter*, *Enterococcus* y *Prevotella*. Además, la infección con el VIH enriquece los géneros: *Proteobacteria*–*Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Ralstonia* y *Fusobacteria*–*Fusobacterium*, y se induce una depleción significativa de los géneros Firmicutes–*Lactobacillus*. Finalmente, a nivel de especie; *R. bromii*, *R. obeum*, *F. prausnitzii*, *B. luti*, *B. faecis* y *B. adolescentes* disminuyen mientras que se incrementa la abundancia de *Escherichia coli*, *E. faecalis* y *E. faecium* (35).

Con relación a la abundancia microbiana de PVVIH con TARV y sin TARV, se ha reportado que en aquellos individuos con infección crónica sin tratamiento se aumenta la abundancia relativa de *Prevotellaceae* (*Prevotella*), *Erysipelotrichaceae* (*Catenibacterium* y *Bulleidia*), *Veillonellaceae* (*Dialister* y *Mitsuokella*), *Clostridium* cluster XIII, y el género *Desulfovibrio* en comparación con pacientes VIH negativos. Otro estudio, remarca la abundancia de los géneros *Fusobacterium*, *Anaerococcus*, *Peptostreptococcus* and *Porphyromonas* así como la disminución en *Roseburia*, *Alistipes*, *Coprococcus*, *Eubacterium*, *Ruminococcus* y *Lachnospira* en pacientes infectados sin esquema de TARV. Finalmente, estudios de pacientes VIH+ con TARV reportan una disminución en la abundancia de *Proteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Enterobacteriales*, *Enterobacteriaceae*, *Erysipelotrichi*, *Erysipelotrichales*, *Erysipelotrichaceae*, y *Barnesiella*, mientras que *Rikenellaceae* y *Alistipes* son depletadas (36).

3.1. Metabolismo Microbiano en VIH-NAFLD.

Los componentes funcionales de la microbiota tienen un impacto directo en el metabolismo humano y se asocian a un estado inflamatorio persistente. Carbohidratos complejos como la fibra dietética y el almidón son digeridos por la microbiota intestinal, la cual produce ácidos grasos de cadena corta (SCFA, del inglés: *Short-chain fatty acids*): propionato, butirato, acetato, además de ácido valérico y caprónico; estos metabolitos se utilizan principalmente en intestino (como proveedores de energía, precursores de lipogénesis y gluconeogénesis), sin embargo, pueden ser transportados vía circulación portal hacia hígado a través de los receptores de monocarboxilato (MCT-1, SMCT-1), en donde pueden ingresar al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) como fuente de energía, y promover la gluconeogénesis (propionato), regular la síntesis de colesterol, y ser precursores de ácidos biliares. Los SCFAs, se unen a receptores como GPR41 (propionato), GPR43 (acetato) y GPR109A. La señalización mediada a través del GRP43 regula el gasto energético y la sensibilidad a la insulina, además de inhibir la acumulación de grasa en tejido adiposo y hepático. La activación de los receptores GRP41 y GRP43 estimula la secreción del péptido YY, del péptido- 1 tipo glucagón (GLP-1), el cual activa la β -oxidación y sensibilidad a la insulina en los hepatocitos lo que promueve la ocurrencia y progresión de NAFLD. El efecto de estos mediadores a nivel hepático podría aumentar en pacientes VIH con NAFLD, ya que presentan disbiosis, daño en la integridad de la barrera intestinal y alteraciones en el eje hígado-intestino promoviendo la lipogénesis hepática y esteatosis (37).

3.2. Eje intestino-hígado.

Las interacciones entre el intestino e hígado son íntimas y directas. Esta asociación se debe al origen común entre los hepatocitos y el epitelio intestinal del endodermo del intestino anterior ventral. El hígado funge como primer receptor de los productos derivados del intestino, sobre todo de los nutrientes de la dieta, pero también modula algunas funciones intestinales al producir bilis para su liberación en el intestino delgado. Por lo tanto, esta interacción bidireccional se centra en dos entidades principales: nutrientes y microorganismos (38).

El drenaje venoso directo al hígado a través de la vena porta permite la aparición rápida de bacterias y sus productos desde el intestino, ya sea por absorción pasiva o por translocación activa de las bacterias. En individuos sanos, las bacterias rara vez se detectan a nivel hepático, esto se debe a la integridad de la barrera intestinal, que es suficiente para prevenir la entrada de microorganismos a la circulación portal (33).

La integridad física de la barrera intestinal se encuentra activamente regulada, así que esta pérdida de regulación conlleva a la translocación bacteriana hacia el hígado. El TNF actúa como un regulador de las conexiones en el epitelio intestinal, por lo que un aumento de esta citocina se relaciona con pérdida de la barrera epitelial. Más allá de la barrera física, la superficie intestinal se encuentra protegida por otras defensas funcionales: una ellas es la membrana de moco que recubre el epitelio intestinal, otro mecanismo de defensa es la producción de moléculas antimicrobianas y péptidos antimicrobianos. Figura 4 (39).

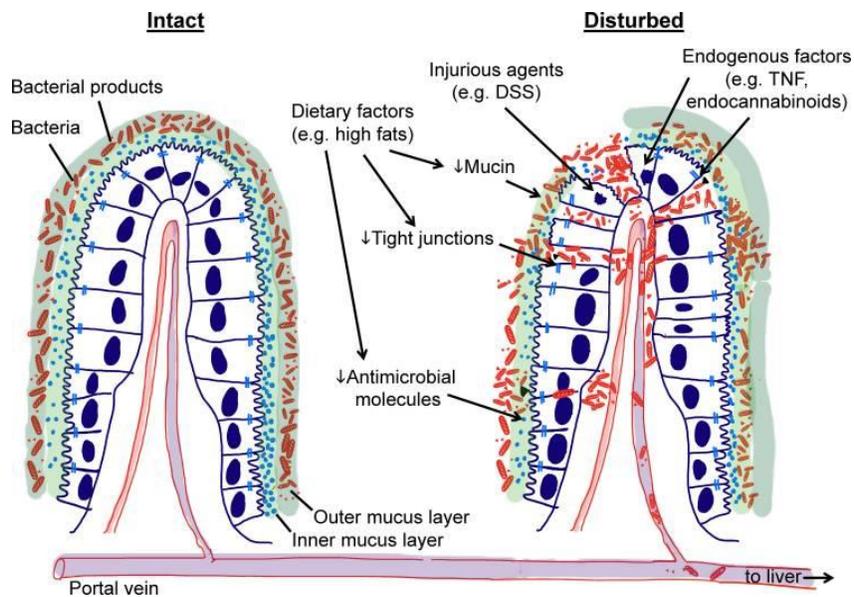


Figura 4. Barrera intestinal. Importancia de la barrera intestinal para prevenir la exposición hepática a microorganismos bacterianos y sus productos. El epitelio intestinal funciona como una barrera física y funcional. Hay múltiples mecanismos identificados en la protección, entre ellos la capa de moco, moléculas antimicrobianas y moléculas de unión estrecha. Estos mecanismos dependen de factores exógenos (dieta) y factores endógenos (TNF- α). Si la barrera intestinal sufre disrupción, las bacterias y sus productos son translocadas hacia la vena

4. Perfil inflamatorio en VIH-NAFLD.

En el contexto de la infección por VIH, la inflamación crónica juega un papel central en la patogénesis de la enfermedad. La fase temprana de la infección se caracteriza por la presencia de citocinas proinflamatorias como IFN- α , IFN- γ , proteína-10 inducible por IFN (IP-10), TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-15. Además, en las primeras etapas de la infección, otras proteínas como neopterina, β 2-microglobulina (β 2M), TNFRII soluble, sCD25 e incluso citocinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- β 1 e IP-10 se incrementan. Por otro lado, la activación inmune crónica en el VIH se caracteriza por altos niveles de IFN tipo I, IL-6, TGF- β , IL-8, IL-1 α , IL-1 β , MIP-1 α , MIP-1 β , y RANTES. El uso de la TARV, suprime la replicación viral y mejora el estado inmunológico de los pacientes ya que se disminuye, pero no restablece el nivel de inflamación a una condición sin VIH, dando como resultado un estado de inflamación residual y persistente de bajo grado y una activación inmunológica crónica que se asocia a la presencia de comorbilidades como NAFLD a través de la estimulación de la inflamación hepática, necrosis celular, apoptosis, e inducción de fibrosis así como el desarrollo de ECV (33).

En NAFLD se incrementan los niveles de IL-6, TNF- α y TGF- β 1, este incremento se asocia a su vez con la progresión de la enfermedad. Las citocinas mencionadas, son claves en la infección por VIH, de hecho la IL-6 se utiliza como uno de los predictores más sólidos de morbilidad y mortalidad en la infección por VIH. TNF- α e IL-6 inducen la producción de otras citocinas y promueven la fibrosis. TNF- α , y ciertos polimorfismos en esta proteína, se asocian fuertemente a la RI, y acumulación de grasa. El contexto de inflamación crónica induce la activación de factores transcripcionales como el NF- κ B, activación que induce muerte celular por apoptosis, un mecanismo de lesión hepática, y se induce además la expresión de TNF- α , TNFR1 y otros mediadores inmunes que inician un ciclo vicioso de inflamación crónica, apoptosis, RI y fibrosis (40).

El proceso inflamatorio crónico que se asienta en PVIH y NAFLD, aunado al proceso disbiótico, condicionan una desregulación en el metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs del inglés: *Branched Chain Amino Acids*) como Valina; Val, Leucina; Leu e Isoleucina; Ile, aminoácidos esenciales producidos por fermentación proteolítica en colón por especies como *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Actinomyces*, *Propionibacterium*, y *Peptostreptococci*. Los pacientes con NAFLD tienen niveles elevados de BCAAs plasmáticos los cuales se han correlacionado con RI; particularmente, la Val se considera un predictor de la acumulación de grasa hepática. Se ha reportado, que los BCAAs pueden preceder al desarrollo de NAFLD, ya que su concentración refleja el grado de esteatosis y además se han asociado a un elevado IMC y daño hepático con reducción de lipólisis (modelo murino de intervención). Los BCAAs, tienen efecto a nivel del sistema inmune, promueven la proliferación, maduración y actividad de diversos tipos celulares. Además, con base en el aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés: *Reactive oxygen species*), mejoramiento en la adhesión leucocitaria, inflamación y promoción de la disfunción endotelial, los BCAAs se han asociado a un mayor riesgo de ECV. Por otro lado, estudios de intervención han indicado el papel benéfico de estos metabolitos en NASH, con relación a inhibir la deposición hepática de triglicéridos, reducción de estrés oxidativo y del retículo endoplásmico (ER), promoción de crecimiento de bacterias intestinales benéficas y mejoramiento de la función de la barrera intestinal, previniendo así, la llegada de sustancias tóxicas provenientes de intestino hacia el hígado (38).

5. Marcadores vasculares en VIH-NAFLD.

Las alteraciones en el metabolismo lipídico y el estrés oxidativo son importantes en la patogénesis de NAFLD. La lipoproteína de baja densidad óxido-LDL (Ox-LDL), se considera una molécula aterogénica recientemente asociada a la patogénesis de NAFLD y NASH. Ox-LDL vía CD36 es engullido por los macrófagos lo que conlleva a una acumulación de colesterol y formación de células espumosas. Se ha

demostrado la presencia de Ox-LDL y colesterol en la vena porta, evento que fue asociado a la formación de placa, deformación del endotelio e inflamación venosa portal a través de la activación de células de Kupffer (internalización lisosomal medida por CD36), con inducción en la secreción de IL-1 β (activación del inflammasoma), TGF- β y TNF- α , activación de células estelares hepáticas y amplificación de la inflamación, retención de colesterol, estrés mitocondrial y de ER, además de muerte celular; todos, eventos asociados al desarrollo de fibrosis en NAFLD (41).

Otro biomarcador es la forma soluble de CD36 (sCD36), mismo que se ha asociado al desarrollo de enfermedades metabólicas, así como al desarrollo de aterosclerosis, RI, ECV y NAFLD en pacientes VIH negativos. Se ha demostrado un aumento en la expresión de sCD36 en NAFLD lo que puede ser un reflejo de su aumentada expresión en la membrana celular (incluida la expresión hepática) y se ha relacionado al grado de esteatosis hepática, severidad de la IR, aterosclerosis por lo que se ha sugerido como un biomarcador que se correlaciona con el índice de grasa hepática. Los factores solubles derivados del hígado juegan un papel importante en el inicio de la vasculopatía, una de las principales complicaciones de NAFLD ya que desencadena un mayor riesgo al desarrollo de trombosis venosa y de CVD (42).

El dímero D, se ha asociado al riesgo de desarrollar ECV en respuesta a la presencia de mediadores inflamatorios y metabólicos, vinculando así la infección con el VIH y el desarrollo de NAFLD y ECV. En modelos *in vitro* se ha demostrado que el desarrollo de daño hepático induce un incremento en la producción de fibrinógeno y al ser el dímero D un producto del mismo, también sus concentraciones se elevarían en relación al daño hepático. Es por esto, que pacientes con NAFLD, fibrinógeno y dímero D elevados tendrían un mayor riesgo de desarrollar eventos trombóticos. Los pacientes con VIH desde la fase aguda de la infección aumentan la concentración de dímero D lo que los condiciona a un mayor riesgo al desarrollo de CVD (43).

Considerando lo anterior, se sabe que los pacientes VIH + presentan un estado disbiótico que perpetúa la inflamación crónica a nivel local y sistémica. La disbiosis, aumenta la permeabilidad intestinal y la liberación de productos bacterianos hacia la circulación sistémica, lo que aumenta la exposición hepática a sustancias nocivas que aumentan la inflamación y la fibrosis hepática. Los cambios en el microbioma también pueden causar dismotilidad, inflamación intestinal y otros cambios inmunológicos en el intestino que dada la relación directa entre GALT y el sistema inmunológico hepático podrían contribuir en el desarrollo y exacerbación de NAFLD en las PVVIH. Sin embargo, se desconoce las PVVIH con NAFLD puede existir asociación entre la microbiota intestinal y sus metabolitos, con citocinas proinflamatorias y marcadores de activación vascular.

XVII. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La infección por VIH es un problema de salud pública que afecta a 37.7 millones de personas alrededor del mundo. La introducción del TARV ha modificado el paradigma de la infección dado que ha pasado a ser una enfermedad crónica, de modo que quienes viven con VIH tienen una mayor esperanza y calidad de vida. Sin embargo, la presencia crónica del VIH, la depleción de linfocitos T CD4+, el daño al GALT, así como la disbiosis y traslocación bacteriana que experimentan estas personas, inducen una activación inmune sistémica que resulta en una inflamación crónica de bajo grado.

La presencia del virus *per se*, el estado inflamatorio persistente, y el uso crónico de TARV se han correlacionado al desarrollo de comorbilidades no SIDA, entre ellas la enfermedad grasa hepática no alcohólica (NAFLD). NAFLD es una condición que abarca diferentes entidades y grados de daño hepático. Además, es altamente prevalente en pacientes infectados por VIH, en quienes, parece cursar con mayor severidad. Finalmente, NAFLD se asocia al desarrollo de ECV y muerte por esta causa.

Actualmente, se reconocen diversos factores que actúan de manera sinérgica en individuos con predisposición genética al desarrollo y progresión de NAFLD. La coexistencia de NAFLD y VIH se asocia con mecanismos de daño al GALT, eventos disbióticos, y al efecto de metabolitos microbianos, como BCAAs y SCFAs, presencia de moléculas inflamatorias y algunos marcadores de activación vascular. Sin embargo, los reportes son controversiales, la información es limitada y más aún, no se ha descrito la asociación que puede existir entre la microbiota intestinal y sus metabolitos con los niveles de citocinas proinflamatorias y marcadores de activación vascular en las PVVIH y esteatosis hepática no alcohólica.

XVIII. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Existe asociación entre la composición de la microbiota intestinal y sus metabolitos, con citocinas proinflamatorias y marcadores de activación vascular en pacientes con VIH y enfermedad por hígado graso no alcohólico?

XIX. JUSTIFICACIÓN.

La infección con el VIH se considera uno de los principales problemas de salud a nivel mundial. La implementación de la TARV ha mejorado la morbimortalidad asociada a enfermedades defensorias de SIDA, sin embargo, la prevalencia de enfermedades metabólicas y sus complicaciones cardiovasculares se han incrementado.

De entre ellas, la enfermedad por hígado graso no alcohólico, que tiene una prevalencia de hasta 65% en la población que vive con VIH, y cuyas fases avanzadas (que implican un grado importante de fibrosis) se asocian a múltiples ingresos hospitalarios y aumento en los costos de los servicios de salud, así como a una mayor mortalidad. Actualmente, NAFLD ocupa el 3er lugar como causa de carcinoma hepatocelular. Por lo que, sin duda el estudio y ponderación de los factores que contribuyen al daño hepático en la población que vive con VIH es fundamental.

Respecto al conocimiento básico y clínico de esta patología, algunos reportes son controversiales y existe limitada información en relación a una gran diversidad de factores que se consideran y se hipotetiza son elementos clave en el diagnóstico oportuno, seguimiento y la intervención terapéutica especializada y eficaz, como es el caso de las alteraciones en la microbiota intestinal, así como los metabolitos producto de esta (como BCAAs y SCFAs), que han demostrado tener relación con citocinas proinflamatorias y marcadores de activación vascular y cuya relación parece ser más intensa en la población que vive con VIH y representa un riesgo agregado para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

La realización de este estudio permitirá caracterizar la microbiota intestinal de los PVVIH, cuantificará la presencia de metabolitos microbianos y mediadores inflamatorios en el contexto del VIH-NAFLD con el fin de dilucidar la influencia del estado disbiótico y sus efectos a través de mediadores producidos e inducidos por la microbiota que contribuyen a la patogénesis de NAFLD.

XX. HIPOTESIS.

- **Hipótesis nula.**

En PVVIH con NAFLD no existe asociación entre la composición de la microbiota intestinal y los metabolitos con las citocinas proinflamatorias y marcadores de activación vascular.

- **Hipótesis alterna.**

En PVVIH con NAFLD existe asociación entre la composición de la microbiota intestinal y los metabolitos con las citocinas proinflamatorias y marcadores de activación vascular.

XXI. OBJETIVOS.

Objetivo general. Determinar la asociación entre la composición de la microbiota intestinal y los metabolitos microbianos, con los niveles plasmáticos de citocinas proinflamatorias y marcadores de activación vascular en PVVIH y NAFLD.

Objetivos específicos.

1. Evaluar y analizar las características sociodemográficas, clínicas, antropométricas y parámetros de laboratorio de los pacientes VIH+ con y sin NAFLD.
2. Cuantificar los niveles de citocinas séricas proinflamatorias en suero en pacientes VIH+ con y sin NAFLD.

3. Determinar la concentración de biomarcadores vasculares séricos (Dímero D, Ox-LDL, sCD36, PCR y fibrinógeno) en PVVIH con y sin NAFLD.
4. Evaluar los niveles plasmáticos de BCAAs y SCFAs en heces de PVVIH con y sin NAFLD.
5. Caracterizar y analizar la composición de la microbiota intestinal en pacientes con VIH con y sin NAFLD.

XXII. DISEÑO METODOLÓGICO.

- **Diseño del estudio.**

Transversal, analítico.

- **Universo del estudio.**

Pacientes adultos con infección por VIH, en diferentes estadios de la enfermedad, que reciben TARV y se encuentran en control virológico, que cumplen definición de síndrome metabólico, que reciben atención en la Unidad de VIH/SIDA del Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”.

- **Tamaño de la muestra**

Obteniendo una “n” de 118 pacientes a estudiar considerando un 15% de pérdida, 58 personas VIH+ y 60 personas VIH+ con NAFLD con un nivel de confianza de 95%, bilateral y un poder estadístico del 95%.

- **Periodo de estudio.**

El estudio se realizó en el periodo comprendido de enero de 2020 a enero del 2022.

- **Sede del estudio.**

La Unidad de VIH/SIDA del Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde” y el Instituto de Investigación en Inmunodeficiencias y VIH (InVIH) del Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara.

- **Financiamiento.**

Financiamiento obtenido con base a la convocatoria 2019 Fondo de Desarrollo Científico de Jalisco (FODECIJAL) para atender Problemas Estatales, con clave de proyecto 8106.

- **Tipo de muestra.**

Heces, suero y plasma.

- **Consideraciones éticas.**

De acuerdo con el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, en el Título Segundo (De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos), artículo 17, esta investigación se considera de riesgo mínimo.

El estudio se realizará de acuerdo con las normas y principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos establecidos en la Declaración de Helsinki, adoptada por la 18ª Asamblea Médica Mundial Helsinki, Finlandia, en junio de 1964 y revisados en la 64ª Asamblea General de la Asociación Médica Mundial en el año 2013 en Fortaleza, Brasil.

Las muestras de heces, sangre y orina se codificaron para salvaguardar la confidencialidad de los pacientes, esta clave se encuentra en la hoja de llenado de datos correspondiente y se utilizó para el análisis de datos.

El presente proyecto de investigación se sometió a evaluación por parte del Comité de Ética en Investigación y Comité de Investigación del Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde” y del Centro Universitario de Ciencias de la Salud. A los sujetos candidatos al estudio se les invitó a participar de forma voluntaria, se explicaron los procedimientos a realizar, riesgos y beneficios de participar en el estudio. Al aceptar su participación en el estudio, firmaron el formato de consentimiento informado.

- **Bioseguridad.**

Los tubos de sangre, suero, plasma, así como los frascos de recolección de heces, y todo material desechable que contuvo residuos biológicos infecciosos fueron inactivados y desechados en bolsa de plástico roja para su incineración. La capacitación, asesoramiento y supervisión de los experimentos realizados estuvieron a cargo del responsable del proyecto. El InVIH, del Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara cuenta con un Nivel 2 de Bioseguridad.

- **Criterios de selección:**

- Criterios de inclusión:**

- Pacientes con infección por VIH.
 - Adultos entre 18 y 65 años.
 - Cualquier género.
 - Pacientes con tratamiento antirretroviral por al menos 2 años, en control virológico por >6 meses (carga viral <40 copias/mL).
 - Pacientes que cumplan criterios para síndrome metabólico.
 - Pacientes que deseen participar de manera voluntaria en el estudio y den su consentimiento informado por escrito.

- Criterios de exclusión:**

- Uso de antibióticos dentro de 90 días previos a la toma de la muestra de heces.
 - Uso de prebióticos o probióticos dentro de 90 días previos a la toma de muestra de heces.
 - Mujeres embarazadas o en lactancia.
 - Pacientes con alguna infección definitoria de SIDA activa.
 - Infección por virus de Hepatitis B o C.
 - Enfermedad hepática crónica (hepatitis autoinmune, enfermedad de Wilson, hemocromatosis, etc.).

- Consumo de alcohol >20 gr/día en las mujeres y >30 gr/día en los hombres en el último año.
- Daño en la función renal, definido como una tasa de filtrado glomerular (TFG) < 60mL/min/1.73m².
- Uso de estatinas en los últimos 90 días previos al enrolamiento en el estudio.
- Uso de inmunosupresores, corticosteroides y antiinflamatorios no esteroideos dentro de los últimos 30 días del reclutamiento.
- Pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad celíaca, trastornos tiroideos.
- Pacientes con historia de cirugía de intestinal (excepto apendicectomía y colecistectomía).
- Pancreatitis crónica o cualquier síndrome de malabsorción.
- Pacientes que esté participando en un ensayo clínico.
- Pacientes privados de su libertad, o que permanecen en algún reclusorio.
- Diagnóstico de NAFLD, establecido por espectroscopia por resonancia magnética.

Criterios de eliminación

- Pacientes en los que no se puedan realizar los exámenes completos para el análisis de todas las variables.
- Muestra degradada o insuficiente para las mediciones laboratoriales.
- Pacientes que decidan retirarse del estudio.

• Variables

Variables independientes

- Enfermedad hepática no alcohólica
- Infección por VIH

Variables dependientes

- Composición de la microbiota intestinal

- Metabolitos microbianos
- Citocinas proinflamatorias
- Marcadores de activación del endotelio vascular

Tabla 1. Operacionalización de variables.

Niveles séricos de BCAA (valina, leucina e isoleucina)	Aminoácidos ramificados básicos y esenciales, como marcador de disbiosis	Cuantitativo	μmol/L	Razón	Mediana, RIQ
Niveles séricos de SCFA (acetato, propiomato y butirato)	Ácidos grasos de cadena corta	Cuantitativo	mg/g	Razón	Mediana, RIQ
IL-1β	Citocina producida, principalmente por macrófagos activados. Como marcador de inflamación	Cuantitativo	pg/mL	Razón	Mediana, RIQ
IFN-α	Citocina producida por fibroblastos y monocitos. Como marcador de inflamación	Cuantitativo	pg/mL	Razón	Mediana, RIQ
IFN-γ	Citocina liberada por linfocitos T colaboradores. Como marcador de inflamación	Cuantitativo	pg/mL	Razón	Mediana, RIQ
TNF-α	Citocina que interviene en los procesos de inflamación y apoptosis. Como marcador de inflamación	Cuantitativo	pg/mL	Razón	Mediana, RIQ
MCP-1 (CCL2)	Proteína quimioatrayente de monocitos. Como marcador de inflamación	Cuantitativo	pg/mL	Razón	Mediana, RIQ
IL-6	Proteína secretada por macrófagos, linfocitos T, células endoteliales y fibroblastos. Como marcador de inflamación	Cuantitativo	pg/mL	Razón	Mediana, RIQ
IL-8 (CXCL8)	Quimiocina proinflamatoria sintetizada en fibroblastos, células endoteliales, monocitos, macrófagos y DC's. Como marcador de inflamación	Cuantitativo	pg/mL	Razón	Mediana, RIQ
IL-10	Citocina antiinflamatoria. Como marcador de inflamación	Cuantitativo	pg/mL	Razón	Mediana, RIQ
IL-12p70	Citocina proinflamatoria producida por macrófagos, monocitos y células presentadoras de antígeno. Como marcador de inflamación	Cuantitativo	pg/mL	Razón	Mediana, RIQ
IL-17	Citocina proinflamatoria producida por células Th17. Como marcador de inflamación	Cuantitativo	pg/mL	Razón	Mediana, RIQ
IL-18	Citocina proinflamatoria que activa células NK y linfocitos T para	Cuantitativo	pg/mL	Razón	Mediana, RIQ

IL-23	producir IFN- γ . Como marcador de inflamación Citocina proinflamatoria que participa en el mantenimiento y expansión de Th17. Como marcador de inflamación	Cuantitativo	pg/mL	Razón	Mediana, RIQ
IL-33	Citocina que induce células Th, mastocitos, eosinófilos y basófilos.	Cuantitativo	pg/mL	Razón	Mediana, RIQ
Dímero D	Producto de degradación de fibrina al ser proteolizada por plasmina. Como marcador de activación vascular	Cuantitativo	ng/mL	Razón	Mediana, RIQ
Ox-LDL	Producto de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad por parte de los macrófagos y células epiteliales. Como marcador de activación vascular	Cuantitativo	U/mL	Razón	Mediana, RIQ
sCD36	Fracción soluble de CD36 que se relaciona con hemostasis, trombosis y metabolismo lipídico. Como marcador de activación vascular	Cuantitativo	ng/mL	Razón	Mediana, RIQ
PCR	Proteína sintetizada por el hígado, que se eleva ante la respuesta inflamatoria y se ha postulado como marcador de enfermedad cardiovascular	Cuantitativo	(mg/dL)	Razón	Mediana, RIQ
Fibrinógeno	Proteína sintetizada en el hígado, factor predictivo de mortalidad por causa cardiovascular	Cuantitativo	(mg/dL)	Razón	Mediana, RIQ

- **Material y métodos.**

- **Valoración clínica completa.**

Historia médica. Se cuestionó sobre antecedentes patológicos y no patológicos. Se recabaron datos sobre la infección por VIH (tiempo de diagnóstico, esquema antirretroviral, cuenta de CD4⁺, CD8⁺, así como nadir de linfocitos T CD4⁺).

Exploración física. Se realizó la toma de medidas antropométricas, como se describe a continuación:

Talla: la estatura fue tomada de la báscula con tallímetro, previamente calibrada, marca Seca y modelo 700 (7001021994). El sujeto en posición de pie con los talones juntos y las puntas de los pies ligeramente separadas; talones, glúteos, la parte superior de la espalda, y el occipital en contacto con el estadímetro o pared. La cabeza cuando está en el plano de Frankfort no necesita estar tocando la escala. El plano de Frankfort se obtiene cuando el orbital (borde inferior de la cuenca del

ojo) está en el mismo plano horizontal del tracion (protuberancia superior del tragus del oído). Cuando están alineados, el vértex es el punto más alto del cráneo. Se le indica al paciente que tome y sostenga una inspiración profunda; el anotador ubica la escuadra firmemente sobre el vértex, comprimiendo el cabello lo más posible. Peso: se estableció con la báscula, previamente calibrada, de la marca Seca, modelo 700 (7001021994). La báscula tiene un rango entre 0 y 150 Kg, con una precisión menor de 100 g. El paciente fue pesado con ropa ligera y sin zapatos, corroborando que la báscula se encontraba en 0 al comenzar la medición, posteriormente el paciente se coloca en el centro de la báscula con su peso distribuido equitativamente en ambos pies. El IMC fue calculado de acuerdo con la clasificación de referencia de la Organización Mundial de la Salud (OMS); Bajo peso/Desnutrición Leve <18.5 Kg/m²; Normopeso de 18.5-24.9 Kg/m²; Sobrepeso >25 -29.9 Kg/m²; Obesidad tipo I >30 -34.9 Kg/m²; Obesidad Tipo II >35 -39.9 Kg/m²; Obesidad tipo III >40 Kg/m². Circunferencia de cintura: se determinó con una cinta métrica flexible, con el paciente colocado de pie y en espiración, tomando en consideración tres sitios anatómicos: justo por debajo de las últimas costillas inferiores, en la parte más estrecha de la cintura y justo arriba de la cresta iliaca. Con puntos de corte clasificados por la OMS mediciones mayores a 88 cm en mujeres y 102 cm en hombres.

Circunferencia de cadera: en posición de pie, con la cinta métrica flexible totalmente horizontal rodeando la máxima protrusión de los glúteos a nivel del trocánter mayor del fémur a cada lado, que en general coincide con la sínfisis pubiana, con los pies ligeramente abiertos en posición paralela.

Índice de cintura cadera, se determinó al dividir la circunferencia de cintura entre la circunferencia de cadera, tomando como punto de corte, de acuerdo a la OMS >0.95 en hombres y >0.85 .

- **Toma de muestras de laboratorio.**

Los sujetos proporcionaron una muestra de heces en frasco estéril para análisis de la microbiota intestinal y 4 muestras de sangre periférica, dos muestras se enviaron

al Laboratorio Central de Antiguo Hospital Civil “Fray Antonio Alcalde” de Guadalajara donde se procesaron estudios de laboratorio generales, que incluyó biometría hemática, química sanguínea, perfil de lípidos, pruebas de función hepática, hemoglobina glicosilada y niveles de insulina. Las muestras restantes se destinaron a la obtención de suero y plasma que se alicuotaron y almacenaron a -80 °C hasta su uso.

- **Cuantificación de citocinas séricas.**

Se utilizó el panel LEGENDplex Human Inflammation: IL-1 β , IFN- α , INF- γ , TNF- α , MCP-1 (CCL2), IL-6, IL-8 (CXCL8), IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-18, IL-23 e IL-33 (No. Catálogo: 740118; BioLegend, San Diego CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. A través de este ensayo multiplex basado en perlas se cuantificaron las citocinas utilizando el citómetro de flujo Attune NXT (Life Technologies).

En el caso de IL-6 esta se evaluó con el Kit de ELISA Human IL-6 *ELISA Kit High Sensitivity* (Abcam, Cambridge, Reino Unido), se siguieron las indicaciones del fabricante y la lectura de la placa se llevó a cabo en el equipo Synergy H1 de Biotek. De igual manera, la citocina TNF- α se evaluó con el Kit de ELISA: *Human Tumor Necrosis factor alpha*, TNF- α ELISA KIT 96T (CUSABIO Houston, Tx), se siguieron las indicaciones del fabricante y la lectura de la placa se llevó a cabo con el equipo Synergy H1 de Biotek.

- **Determinación de los biomarcadores vasculares.**

Los biomarcadores vasculares, se midieron en suero a través de ELISA para cada uno de los analitos, utilizando los siguientes kits: *Human D-Dimer*, D2D ELISA Kit 96T para el Dimero D, (catalogo CSB-E05175h), *Human oxidized low density lipoprotein*, OxLDL ELISA Kit 96T para el ox-LDL (catálogo CSB-E07931h), y CD36 soluble ELISA Kit (for serum and plasma) Size:96 T Nordic Biosite Inc para sCD36 (cat: ABE-196-02), se siguieron las especificaciones del fabricante. Las lecturas se realizaron en el equipo Synergy HT de Biotek.

- **Evaluación plasmática de BCAAs.**

Los niveles plasmáticos de BCAAs (valina, leucina e isoleucina) se evaluaron con la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, *high-performance liquid chromatography*) en la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) por pago de servicio. Previo análisis de presencia o no de Esteatosis por Ultrasonografía (USG), se envió a la UANL un *pool* (mezcla homogénea de plasma) de 5 pacientes VIH+ sin esteatosis y un *pool* de 5 pacientes VIH+ con esteatosis, (aquellos con USG grado 3 o grado 4); las concentraciones se reportarán en $\mu\text{mol/L}$.

- **Cuantificación de SCFAs en heces.**

A las muestras de heces, se le añadió 200 μL de agua y se agitó hasta su homogenización, se añadió 200 μL de la solución reactivo compuesta por N-butanol, tetrahidrofurano y acetonitrilo en una relación 50:30:20, 40 μl HCl 0.1 M, 20 mg ácido cítrico y 40 mg NaCl, se agitó con vortex durante 1 minuto, después se centrifugo a temperatura ambiente durante 10 minuto a 13 000 g. Se obtuvo el sobrenadante y se filtró con Whatman GD/X syringe filter 0.2 μm de PVDF y se analizó en el cromatógrafo de gases Shimadzu GC (Shimadzu Scientific Instruments, Kyoto Japón). Los datos se analizaron con el software Labsolutions-Chromatography Data System (Shimadzu Scientific Instruments, Kyoto Japón). La cuantificación de los ácidos grasos se calculó mediante interpolación con curvas estándar de cada uno de los ácidos grasos de interés (Ácido acético, propiónico y butírico) en un rango de 3.125-400 ppm considerando 8 puntos en la recta (400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125), graficando área bajo la curva vs. concentración. Las concentraciones se reportaron en mg/g de heces.

- **Caracterización de la microbiota intestinal.**

Para caracterizar la microbiota intestinal se extrajo el ADN (ácido desoxirribonucléico) genómico de heces con el kit QIAmp DNA Stool Mini (No. Catálogo: 51504; QIAGEN), posteriormente, se cuantificó con la plataforma GEN5 de BioTek, con el programa Nucleic Acid Quantification. Para la secuenciación de la microbiota intestinal, se preparó una biblioteca de DNA del 16S rRNA siguiendo

el protocolo de preparación de Illumina (Illumina, 2013); la secuenciación del 16S rRNA se realizó en la plataforma Miseq utilizando el kit Miseq Reagent v3 (600-cycle) de Illumina con primers universales dirigidos a la región V3-V4:

Forward= 5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3'

Reverse= 5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'

Se analizaron los amplicones para la asignación de OTU's por medio de la base de datos GreenGenes.

- **Análisis estadístico.**

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico GraphPad Prism versión 9.3. De manera inicial, se aplicará la prueba de Kolmogorov-Smirnov a todas las variables, con el fin de verificar si los datos se distribuyen normalmente. Todas las variables con comportamiento normal se compararon mediante pruebas paramétricas, mientras que las variables que no mostraron una distribución normal se compararon con pruebas no paramétricas.

Se llevó a cabo un análisis descriptivo e inferencial, considerando un nivel de significancia de $p < 0.05$.

- Análisis descriptivo, se utilizaron las siguientes pruebas: medidas de tendencia central (media aritmética, mediana) y medidas de dispersión (desviación y error estándar).
- Análisis inferencial, se utilizaron las siguientes pruebas: paramétricas (t de Student para muestras independientes, ANOVA) y pruebas no paramétricas (X^2 , correlación de Spearman, prueba de Kruskal-Wallis, y U de Mann-Whitney).

XXIII. RESULTADOS.

Fueron reclutados 118 PVVIH con probable presencia de NAFLD, los cuales se dividieron en 4 grupos de acuerdo con los hallazgos de la Ultrasonografía (USG) y elastografía hepática por ARFI (*Acoustic Radiation Force Impulse*), el algoritmo de distribución de los grupos se muestra en la Figura 5 y en la Tabla 2 se observan los valores de USG y ARFI de cada grupo:

- Grupo control, incluyó a 45 pacientes VIH+, sin evidencia de esteatosis por USG ni fibrosis por índice ARFI.
- Grupo con fibrosis, incluyó 13 pacientes VIH+, con algún grado de fibrosis por índice ARFI pero sin evidencia de esteatosis por USG.
- Grupo con esteatosis, incluyó a 39 pacientes VIH+, quienes tuvieron algún grado de esteatosis por USG pero sin fibrosis por índice ARFI.
- Grupo con esteatosis + fibrosis, incluyó a 21 pacientes, que presentaron algún grado de esteatosis por USG y fibrosis por índice ARFI.

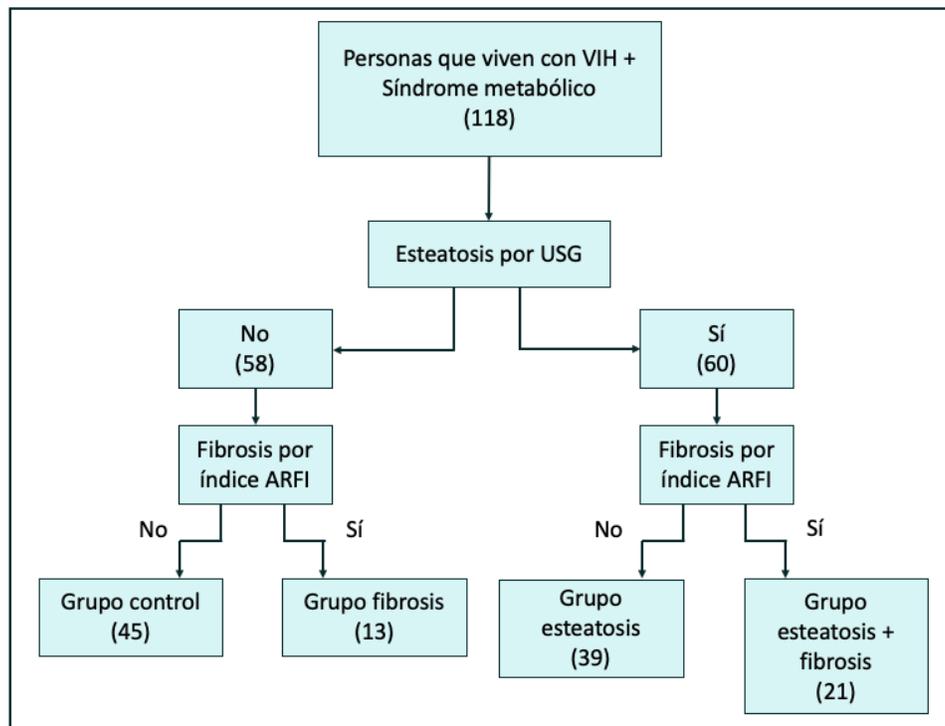


Figura 5. Algoritmo de distribución de los pacientes por grupos. De acuerdo a la presencia de esteatosis por USG y fibrosis por índice ARFI.

Tabla 2. Distribución de las PVVIH por grupos. Valores del grado de esteatosis por USG y ARFI fueron considerados para realizar los diferentes grupos de estudio.

Característica	Control (n=45)	Fibrosis (n=13)	Esteatosis (n=39)	Esteatosis + fibrosis (n=21)
Grado de esteatosis por USG				
Ausente	45 (100%)	13 (100%)	0	0
Medio	0	0	20 (51.28%)	7 (33.33%)
Moderado	0	0	15 (38.46%)	11 (52.38%)
Severo	0	0	4 (10.25%)	3 (14.28%)
ARFI m/s Promedio±DE	1.04±0.13	1.64±0.57	1.05±0.13	1.87±0.50
ARFI				
<1.34 m/s, F0-F1	45 (100%)	0	39 (100%)	0
1.34-1.54 m/s, F2	0	8 (61.53%)	0	6 (28.57%)
1.55-1.8 m/s, F3	0	4 (30.76%)	0	4 (19.04%)
>1.81 m/s, F4	0	1 (7.69%)	0	11 (52.38%)

Características sociodemográficas, clínicas, antropométricas y parámetros de laboratorio.

Se recabaron los datos sociodemográficos de las 118 personas que viven con VIH, la información se representan en la Tabla 3, en la cual se puede observar que 96 fueron del género masculino y 22 del género femenino, lo que corresponde al 81.35% y 18.64%, respectivamente y con una edad promedio de 45.38 años considerando los 4 grupos.

Se realizaron mediciones antropométricas, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre grupos en los siguientes parámetros: estatura, IMC, así como circunferencias de cintura y cadera ($p= 0.006, 0.02, 0.0002$ y 0.0016 , respectivamente). Los pacientes en el grupo de esteatosis + fibrosis tuvieron el IMC más alto (30.26 ± 6.26 Kg/m²), seguidos por el grupos con esteatosis (29.57 ± 3.93 Kg/m²). Estos datos concuerdan con las circunferencias de cintura y cadera, donde el grupo de esteatosis + fibrosis tuvo las mediciones más altas, seguido por el grupo con esteatosis. Estos resultados se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Características demográficas y medidas antropométricas.

Característica	Control (n=45)	Fibrosis (n=13)	Esteatosis (n=39)	Esteatosis + fibrosis (n=21)	Valor de p
Edad (años) Promedio±DE	42.98±11.39	46.69±9.5	46.44±9.74	45.43±10.01	0.42
Género	Hombres 41 (91.11%) Mujeres 4 (8.88%)	Hombres 8 (61.53%) Mujeres 5 (38.46%)	Hombres 35 (89.74%) Mujeres 4 (10.25%)	Hombres 12 (57.14%) Mujeres 9 (42.85)	0.90
Estatura (metros) Promedio±DE	1.70±0.07	1.62±0.10	1.69±0.07	1.66±0.09	0.006**
Peso (kg) Promedio±DE	78.65±12.45	72.58±11.54	84.48±13.72	81.81±15.58	0.07
IMC (Kg/m²) Promedio±DE	26.86±3.05	27.69±4.80	29.57±3.93	30.26±6.28	0.02*
IMC (Kg/m²) Bajo peso <18.5 Normal 18.5 – 24.9 Sobrepeso 25.0 – 29.9 Obesidad >30	0 13 (28.88%) 26 (57.77%) 6 (13.33%)	0 2 (15.38%) 9 (69.23%) 2 (15.38%)	0 1 (2.56%) 24 (61.53%) 14 (35.89%)	0 4 (19.04%) 7 (33.33%) 10 (47.61%)	0.51
Circunferencia de cintura (cm) Mediana (RIQ)	96 (90-101.5)	98 (91.25-101)	99.9 (95-105.5)	104 (98-113)	0.0002***
Circunferencia de cadera (cm) Mediana (RIQ)	96 (88.5-104.5)	97 (90.5-100)	100 (96-106)	105 (95.75-112)	0.0016**
Índice cintura/cadera (ICC) Promedio±DE	0.99±0.06	0.96±0.09	1±0.05	0.99±0.08	0.58

Se calcularon, la media ± la Desviación Estándar (DE) o bien la Mediana y el Rango Intercuartil (RIQ). Se realizó el análisis de normalidad, y de acuerdo a la distribución de los datos se aplicó la prueba ANOVA o bien, Kruskal-Wallis para realizar comparación entre los cuatro grupos. Se consideró un nivel de significancia de $p < 0.05$.

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana, NAFLD: Enfermedad por Hígado Graso No Alcohólico, IMC: Índice de Masa Corporal, ICC: Índice Cintura/Cadera. $p < 0.05^*$ $p < 0.01^{**}$ $p < 0.001^{***}$.

Las 118 PVVIH incluidas en el estudio se encontraban bajo TARV durante al menos 6 meses y en todos se corroboró una carga viral menor a 40 copias/μL. Se recabó información sobre la infección por VIH, su evolución, esquema de tratamiento, conteo de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, entre otros parámetros clínicos que se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Datos sobre la infección por VIH.

Característica Clínica	Control (n=45)	Fibrosis (n=13)	Esteatosis (n=39)	Esteatosis + fibrosis (n=21)	Valor de <i>p</i>
Años de infección con VIH (Mediana, RIQ)	7 (3.5-12)	8 (5-15)	10.03 (6-14)	10 (5-13.5)	0.23
Backbone No backbone TDF+FTC ABC+3TC TAF+FTC Otras combinaciones	2 (4.44%) 29 (64.44%) 4 (8.88%) 10 (22.22%) 1 (2.22%)	1 (7.69%) 5 (38.46%) 1 (7.69%) 6 (46.15%) 0	3 (7.69%) 26 (66.66%) 4 (10.25%) 5 (12.82%) 1 (2.56%)	1 (4.76%) 16 (76.19%) 2 (9.52%) 2 (9.52%) 0	0.48
ESQUEMA TARV ITRNN IP INSTI Otros	16 (35.55%) 10 (22.22%) 18 (40%) 1 (2.22%)	4 (30.76%) 2 (15.38%) 6 (46.15%) 1 (7.69%)	20 (51.28%) 11 (28.20%) 5 (12.82%) 3 (7.69%)	10 (47.61%) 4 (19.04%) 5 (23.80%) 2 (9.52%)	0.20
Linfocitos T CD4⁺ (cél/s/μL) Mediana (RIQ)	682 (440.5-846.5)	527 (261.5-925.5)	518 (412-642)	662 (489.5-1027)	0.09
Linfocitos T CD8⁺ (cél/s/μL) Mediana (RIQ)	779 (620-1096)	706 (372-1015)	782 (571-1052)	693 (547.5-863)	0.62
Nadir de Linfocitos T CD4⁺ (cél/s/μL) Mediana (RIQ)	217 (57.5-349)	100 (57.5-397.5)	111 (35-239)	206 (124.5-416)	0.12
Radio CD4⁺/CD8⁺ Mediana (RIQ)	0.82 (0.55-1.23)	0.93 (0.56-1.11)	0.76 (0.39-0.98)	0.99 (0.67-1.44)	0.08
Se calcularon, la media ± la Desviación Estándar (DE) o bien la Mediana y el Rango Intercuartilar (RIQ). Se realizó el análisis de normalidad, y considerando la distribución de los datos se aplicó prueba ANOVA o bien, Kruskal-Wallis para realizar comparación entre los cuatro grupos. Se consideró un nivel de significancia de $p < 0.05$. VIH: virus de inmunodeficiencia humana, NAFLD: enfermedad por hígado graso no alcohólico, TDF: tenofovir disoproxilfumarato, FTC: emtricitabina, ABC: abacavir, 3TC: lamivudina, TAF: tenofovir alafenamida, TARV: terapia antirretroviral, ITRNN: inhibidor no nucleósido de la transcriptasa reversa, IP: inhibidor de proteasa, INSTI: inhibidor de la transferencia de las cadenas de la integrasa. $p < 0.05^*$ $p < 0.01^{**}$ $p < 0.001^{***}$.					

No encontramos diferencias significativas en el tiempo de evolución en la infección por VIH, así como en la cuenta de linfocitos T CD4⁺, T CD8⁺ o en el nadir de linfocitos T CD4⁺.

En cuanto al TARV, una mayor proporción de pacientes en los grupos control y fibrosis se encontraba bajo tratamiento con inhibidores de integrasa (40 y 46.15%, respectivamente), en tanto que los grupos con esteatosis y esteatosis + fibrosis se encontraban bajo esquemas a base de inhibidores no nucleósidos de transcriptasa

reversa (51.28 y 47.61%, respectivamente); sin embargo, esta variable no tuvo significancia en el análisis estadístico entre grupos. Respecto al esquema de backbone, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro grupos.

A todos los participantes en este protocolo se les realizaron estudios generales de laboratorio y considerando los resultados de glucosa e insulina se calculó el índice HOMA-IR. En la Tabla 5, se resumen estos resultados así como el análisis estadístico entre grupos.

Tabla 5. Estudios de laboratorio e índice HOMA.

Característica	Control (n=45)	Fibrosis (n=13)	Esteatosis (n=39)	Esteatosis + fibrosis (n=21)	Valor de p
Hemoglobina (g/dL) Promedio±DE	15.63±1.21	15.10±1.51	16.06±1.11	14.87±2.34	0.02*
Plaquetas (10³/μL) Mediana (RIQ)	238000 (190950-283500)	254300 (210900-315850)	231000 (202700-256400)	271000 (216950-299650)	0.28
Leucocitos (10³/μL) Mediana (RIQ)	6040 (4890-7140)	6860 (5950-8915)	6380 (5410-7180)	7140 (6275-8350)	0.01*
Neutrófilos totales (10³/μL) Mediana (RIQ)	3270 (2835-4100)	4440 (3635-6125)	3570 (2980-4640)	4020 (3465-5060)	0.01*
Linfocitos (10³/μL) Mediana (RIQ)	1850 (1230-2325)	2070 (1660-2485)	1790 (1410-2570)	2340 (1865-2645)	0.08
Índice neutrófilo/linfocito Mediana (RIQ)	1.96 (1.42-2.77)	2.25 (1.52 -3.82)	2 (1.41-2.76)	1.75 (1.37-2.51)	0.54
Glucosa (mg/dL) Mediana (RIQ)	96 (87.5-104)	93 (84.5-100.5)	94 (88-107)	97 (87-109.5)	0.69
Urea (mg/dL) Promedio±DE	32.17±10.04	37.085±11.35	31.79±11.58	31.33±14.29	0.15
Creatinina (mg/dL) Promedio±DE	0.88±0.17	0.85±0.22	0.83±0.21	0.75±0.23	0.06
BUN (mg/dL) Mediana (RIQ)	15.25 (11.68-18.73)	16.9 (12.55-21.15)	13.8 (11-16.2)	11.8 (10.8-15.25)	0.11
Ácido úrico (mg/dL) Mediana (RIQ)	6 (5.25-6.6)	6.6 (6-7.3)	6.3 (5.55-7.35)	6.1 (5.3-7.77)	0.08
Colesterol total (mg/dL) Mediana (RIQ)	187 (158.5-219)	195 (178.5-216)	185 (164-210)	188 (167-212.5)	0.91

LDL (mg/dL) Mediana (RIQ)	123 (97-150.5)	111 (75.5-131.5)	112.5 (90.5-137)	99.5 (75.25-118.3)	0.16
HDL (mg/dL) Mediana (RIQ)	35 (30-43)	33 (27.5-38.5)	33.5 (28-36.25)	33.5 (29.25-34.75)	0.51
VLDL (mg/dL) Mediana (RIQ)	33 (25.5-40.5)	33 (24-58.5)	41 (28.5-49)	42 (32-70)	0.03*
Triglicéridos (mg/dL) Mediana (RIQ)	165 (131.5-202.5)	165 (135.5-238)	197 (143-246)	205 (132-291.5)	0.16
Fibrinógeno (mg/dL) Mediana (RIQ)	405.5 (356-426.8)	427 (354-521.5)	398 (355-430)	434.5 (391.3-489.8)	0.10
PCR (mg/dL) Mediana (RIQ)	2.6 (1.9-4.2)	3.25 (1.72-5.75)	3.4 (1.42-5.4)	5 (2-15.5)	0.17
Bilirrubina total (mg/dL) Mediana (RIQ)	0.52 (0.41-0.62)	0.49 (0.36-0.59)	0.54 (0.43-0.64)	0.47 (0.39-0.59)	0.45
AST (UI/L) Mediana (RIQ)	21 (17.5-29)	20 (14-23)	21 (17-32)	21 (17.5-43.5)	0.33
ALT (UI/L) Mediana (RIQ)	28 (21.5-37.5)	20 (14.5-39)	25 (18-49)	32 (20.5-71)	0.15
RATIO AST/ALT Promedio±DE	0.80±0.26	0.93±0.38	0.81±0.23	0.75±0.22	0.53
GGT (UI/L) Mediana (RIQ)	32 (23.25-51.75)	32.5 (21.75-50)	40 (30.75-67.5)	46 (35.75-99.25)	0.02*
Fosfatasa alcalina (UI/L) Promedio±DE	93.93±28.39	99.08±27.46	95.24±31.08	96.2±26.84	0.91
DHL (UI/L) Mediana (RIQ)	163 (141.5-195.5)	163 (147-191.5)	161 (139-178)	165 (136.5-199.5)	0.86
Albúmina (g/L) Promedio±DE	4.42±0.26	4.20±0.31	4.41±0.26	4.37±0.33	0.08
Insulina (μU/mL) Mediana (RIQ)	8.43 (4.27-12.07)	8.81 (5.52-18.06)	11.07 (8.56-18.21)	13.4 (11.43-18.38)	0.03*
HbA1c (%) Promedio±DE	5.78±1.08	5.55±1.00	5.58±1.08	5.86±1.12	0.39
ÍNDICE HOMA-IR Mediana (RIQ)	2.28 (1.14-3.32)	1.82 (1.31-4.3)	2.65 (2.12-4.92)	2.99 (2.73-4.35)	0.16

Se calcularon, la media ± la Desviación Estándar (DE) o bien la Mediana y el Rango Intercuartilar (RIQ). Se realizó un análisis de normalidad y de acuerdo a la distribución de los datos se aplicó prueba ANOVA o bien, Kruskal-Wallis para realizar comparación entre los cuatro grupos. Se consideró un nivel de significancia de $p < 0.05$. VIH: virus de inmunodeficiencia humana, NAFLD: enfermedad por hígado graso no alcohólico, LDL: lipoproteína de baja densidad, HDL: lipoproteína de alta densidad, VLDL: lipoproteína de muy baja densidad, PCR: proteína C reactiva, AST: aspartato aminotransferasa, ALT: alanina aminotransferasa, GGT: gamma-glutamilttransferasa, DHL: deshidrogenasa láctica, HbA1c: hemoglobina glicosilada. $p < 0.05^*$ $p < 0.01^{**}$ $p < 0.001^{***}$.

En la Tabla 5, se puede observar que los niveles de hemoglobina, fueron significativamente diferentes entre grupos ($p= 0.02$), con los valores más elevados en el grupo con esteatosis (16.06 g/dL), en tanto que los niveles más bajos se encontraron en el grupo con esteatosis + fibrosis (14.87 g/dL). Cabe mencionar, que en los cuatro grupos los niveles de hemoglobina se encuentran dentro de parámetros normales. La cuenta de plaquetas no resultó una variable significativa entre los cuatro grupos.

Las cuentas de leucocitos y neutrófilos tuvieron diferencia estadísticamente significativa entre grupos ($p= 0.01$ y 0.01 , respectivamente), manteniéndose en todos los casos, dentro de parámetros normales.

Los niveles de glucosa en ayuno, BUN y ácido úrico no tuvieron diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

En cuanto al perfil de lípidos, se midieron niveles de colesterol total, LDL, HDL, VLDL y TGL, encontrando diferencias significativas únicamente en los niveles de VLDL con un valor de $p= 0.03$. Los niveles más altos se observan en el grupo de esteatosis + fibrosis (42 mg/dL), seguido del grupo con esteatosis (41 mg/dL) y finalmente los grupos control y fibrosis tuvieron los niveles menores (33 mg/dL).

En relación a las pruebas de función hepática, no se encontraron diferencias entre los 4 grupos en cuanto a niveles de transaminasas (AST o ALT), fosfatasa alcalina, DHL o albúmina. Los niveles de GGT sí presentaron significancia estadística ($p= 0.02$), con los niveles más altos en el grupo con esteatosis + fibrosis (de 46 UI/L), seguido del grupo con esteatosis (de 40 UI/L) y finalmente, los grupos control y fibrosis tuvieron medianas de 32 UI/L y 32.5 UI/L, respectivamente. Cabe mencionar que en todos los casos, esta determinación se encuentra dentro de los parámetros de normalidad de acuerdo al laboratorio (0-50 UI/L).

Los niveles de proteína C reactiva, fibrinógeno, hemoglobina glicosilada y el cálculo de índice HOMA tampoco mostraron diferencia significativa entre grupos.

Finalmente, los niveles de insulina más elevados se encontraron en el grupo de pacientes con esteatosis + fibrosis (13.4 μ U/mL), seguido del grupo con esteatosis (11.07 μ U/mL) y los niveles más bajos se registraron en el grupo control y grupo con fibrosis, 8.43 μ U/mL y 8.41 μ U/mL, respectivamente ($p= 0.03$).

De acuerdo a las medidas antropométricas, estudios de laboratorio y datos clínicos de los pacientes, se calculó el riesgo cardiovascular por dos métodos: índice cadera cintura y escala Framingham. Además, se calcularon los índices predictivos de fibrosis (FIB-4, NAFLD fibrosis score y APRI). Estos resultados, así como la clasificación de esteatosis por USG y el grado de fibrosis hepática por elastografía (ARFI, *Acoustic Radiation Force Impulse*) se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Índices predictivos de esteatosis, fibrosis y riesgo cardiovascular.

Índice evaluado	Control (n=45)	Fibrosis (n=13)	Esteatosis (n=39)	Esteatosis + fibrosis (n=21)	Valor de <i>p</i>
Riesgo cardiovascular (ICC) Bajo Moderado Alto	9 (20%) 7 (15.55%) 29 (64.44%)	3 (23.07%) 2 (15.38%) 8 (61.53%)	3 (7.69%) 8 (20.51%) 28 (71.79%)	1 (4.76%) 4 (19.04%) 16 (76.19%)	0.54
Escala de Framingham Promedio±DE	6.82±5.71	5.99±7.28	7.28±5.84	7.18±7.50	0.56
Riesgo cardiovascular (Framingham) Bajo Moderado Alto	31 (70.45%) 9 (20.45%) 4 (9.09%)	9 (75%) 2 (16.66%) 1 (8.33%)	27 (71.05%) 9 (23.68%) 2 (5.26%)	14 (70%) 3 (15%) 3 (15%)	0.58
Grado de esteatosis por USG Ausente Medio Moderado Severo	45 (100%) 0 0 0	13 (100%) 0 0 0	0 20 (51.28%) 15 (38.46%) 4 (10.25%)	0 7 (33.33%) 11 (52.38%) 3 (14.28%)	0.57
ARFI m/s Promedio±DE	1.04±0.13	1.64±0.57	1.05±0.13	1.87±0.50	<0.0001***
ARFI <1.34 m/s, F0-F1 1.34-1.54 m/s, F2 1.55-1.8 m/s, F3 >1.81 m/s, F4	45 (100%) 0 0 0	0 8 (61.53%) 4 (30.76%) 1 (7.69%)	39 (100%) 0 0 0	0 6 (28.57%) 4 (19.04%) 11 (52.38%)	0.75
FIB-4 <1.3, sin fibrosis 1.3-2.67, Indeterminado >2.67, fibrosis significativa	43 (95.55%) 2 (4.44%) 0	12 (92.3%) 1 (7.69%) 0	34 (87.17%) 5 (12.82%) 0	20 (95.23%) 1 (4.75%) 0	0.27

ÍNDICE NAFLD <-1.455, sin fibrosis -1.455-0.675, indeterminado >0.675, con fibrosis	36 (82.75%) 9 (18.96%) 0	11 (92.3%) 2 (7.69%) 0	28 (71.79%) 11 (28.20%) 0	13 (61.90%) 8 (38.09%) 0	0.63
ÍNDICE APRI <0.7, sin fibrosis 0.7-1, fibrosis significativa >1, cirrosis	42 (93.33%) 2 (4.44%) 1 (2.22%)	13 (100%) 0 0	37 (94.87%) 2 (5.12%) 0	18 (85.71%) 0 3 (14.28)	0.77

Se calcularon, la media \pm la Desviación Estándar (DE). Se realizó el análisis de normalidad y de acuerdo a la distribución de los datos, se aplicó prueba ANOVA o bien, Kruskal-Wallis para realizar comparación entre los cuatro grupos. Se consideró un nivel de significancia de $p < 0.05$. VIH: virus de inmunodeficiencia humana, NAFLD: enfermedad por hígado graso no alcohólico, USG: ultrasonografía, FIB-4: indicador de fibrosis hepática, APRI: AST to Platelet Ratio Index, ICC: Índice Cadera Cintura, ARFI: Acoustic Radiation Force Impulse. $p < 0.05^*$ $p < 0.01^{**}$ $p < 0.001^{***}$.

El riesgo cardiovascular, calculado por el ICC y escala de Framingham, no tuvo resultados estadísticamente significativos entre grupos. En tanto que los resultados de APRI, FIB-4 y NAFLD fibrosis score, tampoco mostraron diferencia significativa entre los grupos.

El 100% de los pacientes en los grupos control y fibrosis, tuvo ausencia de esteatosis por USG; en el grupo con esteatosis, 20 pacientes (51.28%) tuvieron esteatosis media, 15 moderada (38.46%) y 4 severa (10.25%), en tanto que en el grupo con esteatosis + fibrosis, 11 pacientes presentaron esteatosis moderada (52.38%), 7 media (33.33%) y solo 3 severa (14.28%).

La fibrosis hepática, detectada a través de elastografía y clasificada de acuerdo a ARFI, fue estadísticamente significativa entre grupos ($p = 0.0001$), en el grupo de fibrosis, 8 en el grupo de fibrosis leve (61.53%), 4 con fibrosis moderada (30.78%) y 1 con fibrosis grave (7.69%); por otra parte, el grupo de esteatosis + fibrosis, con 11 pacientes con fibrosis grave (52.38%), 6 en el grupo de fibrosis leve (28.57%) y 4 en el grupo de fibrosis moderada (19.04%).

Niveles sericos de de citocinas proinflamatorias.

En todos los pacientes se cuantificaron citocinas séricas, los resultados y análisis estadístico se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7 . Niveles séricos de citocinas.

Citocina Mediana (RIQ) en pg/mL	Control (n=45)	Fibrosis (n=13)	Esteatosis (n=39)	Esteatosis + fibrosis (n=21)	Valor de p
IL-1β	79.7 (26.9-263.2)	35.4 (30.1-269.2)	81.1 (27.46-2703.4)	79.7 (30.1-332.4)	0.78
IFN- α	209.7 (80.4-1487)	80.4 (21.75-2127)	180.5 (31.18-554.7)	62.4 (31.2-209.7)	0.08
IFN- γ	128.7 (78.9-1328)	78.9 (59.01-12327)	593 (73.93-11598)	662.4 (78.9-1328)	0.91
TNF-α	28 (12.2-79.5)	49.8 (19.5-79.5)	25 (7.35-79.5)	79.5 (9.8-79.5)	0.87
MCP-1	632.2 (469.2-852.8)	884.7 (680.2-1138)	655.3 (478.5-799.1)	675 (518.2-876.6)	0.41
IL-6	1.7 (0.88-2.36)	4.11 (2.79-6.96)	2.8 (1.15-3.75)	2.57 (1.8-4.64)	0.003**
IL-8	14.2 (5.7-28.5)	13.6 (5.7-34.4)	13.2 (5.7-21.15)	13.6 (5.7-21.2)	0.87
IL-10	6.9 (4.4-14.5)	14.5 (5.2-54.6)	7.4 (4.4-18.08)	7.8 (6-14.5)	0.68
IL-12p70	7.29 (1.78-29.36)	7.29 (1.78-29.36)	8.35 (5.48-11.41)	8.35 (5.48-10.54)	0.99
IL-17	139.4 (139.4-139.4)	139.4 (139.4-139.4)	139.4 (67.33-139.4)	139.4 (102-139.4)	0.90
IL-18	303.6 (181.3-449.7)	325.4 (192.9-901.3)	139.4 (67.33-139.4)	139.4 (102-139.4)	<0.0001***
IL-23	90.9 (47.4-228.7)	47.4 (40.4-106.2)	91.56 (63.7-176)	63.7 (42.8-115.8)	0.15
IL-33	7.29 (3.06-29.36)	21.44 (1.78-47.67)	29.36 (5.59-66.65)	7.29 (1.78-67.33)	0.69

Se calcularon la Mediana y el Rango Inter cuartil (RIQ). Se realizó la prueba de normalidad y de acuerdo a la distribución de los datos se aplicó prueba ANOVA o bien, Kruskal-Wallis para realizar comparación entre los cuatro grupos. Se consideró un nivel de significancia de $p < 0.05$. VIH: virus de inmunodeficiencia humana, IL: interleucina, IFN: interferón, TNF: Factor de Necrosis Tumoral, MCP: Proteína Quimiotáctica de Monocitos. . $p < 0.05$ * $p < 0.01$ ** $p < 0.001$ ***.

Los niveles de IL-6 fueron estadísticamente significativos entre grupos ($p= 0.003$), los niveles más elevados se encontraron en el grupo con fibrosis (4.11 pg/mL), seguido por el grupo con esteatosis y esteatosis + fibrosis (2.8 y 2.57 pg/mL, respectivamente). Por otro lado, los niveles de IL-18 se encuentran significativamente más elevados ($p= <0.0001$) en el grupo con fibrosis (mediana de 325.4 pg/mL), Figura 6.

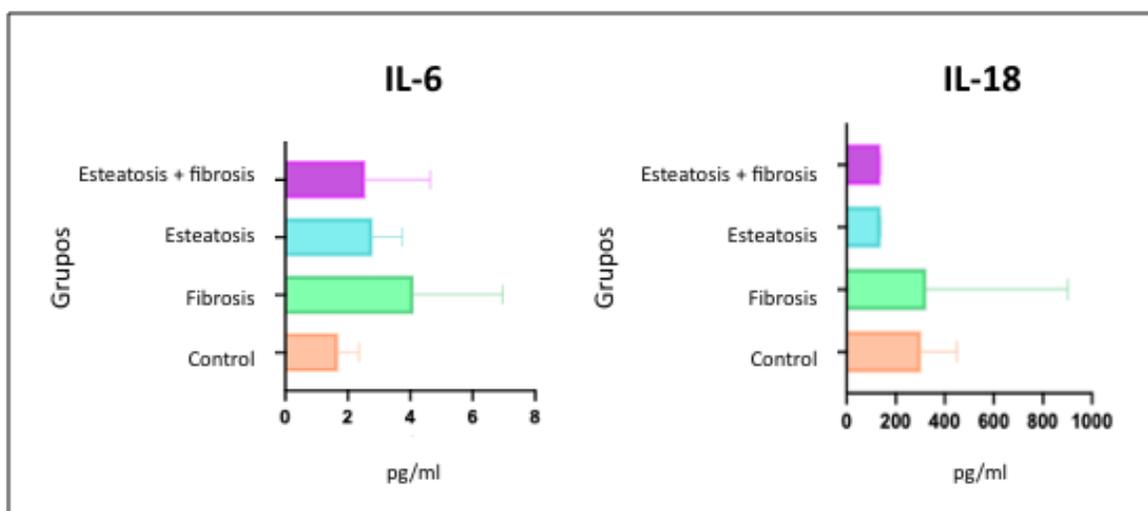


Figura 6. Niveles de IL-6 e IL-18. Las citocinas se evaluaron en suero, la IL-18 se midió por citometría de flujo en tanto que la IL-6 por ELISA. Se representan únicamente las citocinas en las

que se presentaron diferencias significativas. Se graficó la mediana y el rango Intercuartilar (RIQ), las concentraciones se encuentran en pg/mL.

Concentración sérica de biomarcadores vasculares: Dímero D, Ox-LDL, sCD36, PCR y fibrinógeno.

Se cuantificaron niveles de tres marcadores séricos de activación vascular: Ox-LDL, sCD36 y Dímero D, los resultados y análisis estadístico se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8. Niveles séricos marcadores de activación vascular.

Marcadores de activación vascular	Control (n=45)	Fibrosis (n=13)	Esteatosis (n=39)	Esteatosis + fibrosis (n=21)	Valor de p
Ox-LDL (mU/mL)	2780 (2430-4150)	3270 (2525-3970)	2720 (2557-2907)	2686 (2562-3285)	0.68
sCD36 (ng/mL)	180.2 (17.12-1322)	47.76 (10.16-221)	129.8 (12-195.3)	144.9 (19.76-2296)	0.61
Dímero D (ng/mL)	152.7 (91.27-286.2)	213.4 (111.6-285.1)	173.2 (97.05-305.7)	181.6 (94.14-265.8)	0.94
Fibrinógeno (mg/dL)	405.5 (356-426.8)	427 (354-521.5)	398 (355-430)	434.5 (391.3-489.8)	0.10
PCR (mg/dL)	2.6 (1.9-4.2)	3.25 (1.72-5.75)	3.4 (1.42-5.4)	5 (2-15.5)	0.17

Se calcularon, la Mediana y el Rango Intercuartilar (RIQ). Se aplicó el análisis de normalidad y de acuerdo a la distribución de los datos se aplicó prueba ANOVA o bien, Kruskal-Wallis para realizar comparación entre los cuatro grupos. Se consideró un nivel de significancia de $p < 0.05$. Ox-LDL: lipoproteína de baja densidad oxidada. $p < 0.05$ * $p < 0.01$ ** $p < 0.001$ ***.

Como se puede observar en la Tabla 8, no encontramos diferencias significativas en los marcadores séricos de activación vascular entre los cuatro grupos. Respecto al Ox-LDL la mayor concentración se encontró en el grupo de Fibrosis, en tanto que el sCD36 es más elevado en aquellas PVVIH sin esteatosis o fibrosis y finalmente el Dímero D es más elevado en aquellas PVVIH que presentan fibrosis o esteatosis más fibrosis.

Sub-análisis de comparación entre dos grupos.

Una vez realizado el análisis anterior entre los cuatro grupos, fue de nuestro interés comparar las variables analizadas entre dos grupos, tomando como referencia el grupo Control (PVVIH): a) Grupo Control vs Esteatosis, b) Grupo Control vs Fibrosis más Esteatosis y finalmente c) Grupo Control vs Fibrosis.

Cabe mencionar que las diferencias significativas que se describieron anteriormente se preservan, sin embargo, al llevar a cabo estos análisis se suman otras diferencias significativas interesantes. De manera particular, al comparar el grupo Control vs

Esteatosis se presenta una diferencia estadísticamente significativa en el Nadir de CD4⁺ con un valor de $p=0.04$ (Tabla 9).

Tabla 9. Comparación entre el grupo control vs. esteatosis.

Parámetro	Control (n=45)	Esteatosis (n=39)	Valor de p
Nadir de Linfocitos T CD4⁺ (céls/ μ L) Mediana (RIQ)	217 (57.5-349)	111 (35-239)	0.04*
Se calculó la Mediana y el Rango Intercuartilar (RIQ). Se realizó un análisis de normalidad y de acuerdo a la distribución de los datos se aplicó la prueba no paramétrica U de Mann Whitney para la comparación entre grupos. Se consideró un nivel de significancia de $p<0.05$. $p <0.05^*$.			

Por otro lado, al comparar el grupo Control vs. el grupo de Esteatosis más Fibrosis, resultó interesante que se observan diferencias significativas en la cantidad de Linfocitos, el IFN- α así como los marcadores inespecíficos de inflamación, el Fibrinógeno y la PCR. Por otro lado, con base en las diferencias encontradas al comparar los cuatro grupos, en este sub-análisis se pierde la diferencia significativa que se observaba para la Hemoglobina, Tabla 10.

Tabla 10. Comparación entre el grupo control vs. esteatosis + fibrosis.

Parámetro	Control (n=45)	Esteatosis + Fibrosis (n=21)	Valor de p
Fibrinógeno (mg/dL) Mediana (RIQ)	405.5 (356-426.8)	434.5 (391.3-489.8)	0.04*
PCR (mg/dL) Mediana (RIQ)	2.6 (1.9-4.2)	5 (2-15.5)	0.03*
IFN-α (pg/mL) Mediana (RIQ)	209.7 (80.4-1487)	62.4 (31.2-209.7)	0.007**
Se calculó la Mediana y el Rango Intercuartilar (RIQ). Se realizó un análisis de normalidad y de acuerdo a la distribución de los datos se aplicó la prueba paramétrica t de student o no paramétrica U de Mann Whitney para la comparación entre grupos. Se consideró un nivel de significancia de $p<0.05$. . $p <0.05^*$ $p <0.01^{**}$ $p <0.001^{***}$.			

Finalmente, el realizar la comparación entre el grupo Control vs. Fibrosis, no se encuentra la diferencia estadística que se observaba al comparar los leucocitos totales entre los cuatro grupos; se preserva la diferencia significativa en el caso de los neutrófilos totales y los niveles de IL-6 e interesantemente, se observan diferencias significativas entre los niveles de ácido urico y albumina, Tabla 11.

Tabla 11. Comparación entre el grupo control vs. fibrosis.

Parámetro	Control (n=45)	Fibrosis (n=13)	Valor de p
Neutrófilos totales (10 ³ /μL) Mediana (RIQ)	3270 (2835-4100)	4440 (3635-6125)	0.002*
Ácido úrico (mg/dL) Mediana (RIQ)	6 (5.25-6.6)	6.6 (6-7.3)	0.03*
Albúmina (g/L) Promedio±DE	4.42±0.26	4.20±0.31	0.02*
IL-6 (pg/mL) Mediana (RIQ)	1.7 (0.88-2.36)	4.11 (2.79-6.96)	0.0003***
Se calculó la Media y Desviación Estándar (DE) o bien la Mediana y el Rango Intercuartil (RIQ). Se realizó un análisis de normalidad y de acuerdo a la distribución de los datos se aplicó la prueba paramétrica t de student o no paramétrica U de Mann Whitney para la comparación entre grupos. Se consideró un nivel de significancia de p<0.05. . p <0.05* p <0.01** p <0.001***.			

Sub-análisis de comparación entre dos grupos, considerando elevados puntajes de Esteatosis por USG y Fibrosis por Grados ARFI.

Con los analisis previos, fue de nuestro interes realizar un subanalisis considerando elevados puntajes de Esteatosis (USG=2 y USG=3) y de Fibrosis por Grados ARFI; comparandolos con el grupo de referencia control (PVVIH). En este analisis, se consideraron unicamente aquellas variables para las que se ha descrito alguna relación con la presencia de NAFLD. En este sentido, se consideraron los datos antropométricos (IMC, C. cadera, C. cintura), estudios de laboratorio (PCR, Fibrinógeno, AST, ALT, Radio AST/ALT, Insulina, HbA1c, Índice HOMA), niveles de citocinas y los marcadores de activación vascular.

Se realizó la comparación entre el grupo de PVVIH como Grupo Control vs. el grupo de Esteatosis con un puntaje de 2 y 3 (moderado y severo), los resultados se representan en la Tabla 12.

Tabla 12. Comparación entre el grupo control vs. esteatosis moderada y severa (grados 2 y 3).

Característica	Control (n=45)	Esteatosis (n=19)	Valor de p
IMC Kg/m² Mediana (RIQ)	27.36 (23.78-29.41)	28.73 (25.90-32.79)	0.003*‡
C. cintura cm Mediana (RIQ)	96 (90-101.5)	100.5 (95-110)	0.002**†
C. cadera cm Mediana (RIQ)	96 (88.5-104.5)	102 (96-106)	0.03*†

Fibrinógeno (mg/dL) Mediana (RIQ)	405.5 (356-426.5)	387 (343-415)	0.44‡
PCR (mg/dL) Mediana (RIQ)	2.6 (1.9-4.2)	2.9 (1.8-5.0)	0.62‡
ALT (UI/L) Mediana (RIQ)	28 (21.5-37.5)	46 (25-68)	0.03*‡
AST (UI/L) Mediana (RIQ)	21 (17-31)	24 (18-39)	0.22‡
RATIO AST/ALT Promedio±DE	0.80±0.26	0.67±0.16	0.03*‡
GGT (UI/L) Mediana (RIQ)	32 (23.2-51.7)	54 (36-83.5)	0.009***‡
Insulina (μU/mL) Mediana (RIQ)	8.4 (4.2-12)	13.4 (9.6-18.2)	0.003***‡
HbA1c (%) Promedio±DE	5.8±1.1	5.7±1.0	0.85‡
ÍNDICE HOMA Mediana (RIQ)	2.2 (1.1-3.3)	3.6 (2.3-4.9)	0.06‡
IFN- α (pg/mL) Mediana (RIQ)	209.7 (80.4-1487)	80.4 (31.15-209.7)	0.03*‡
IL-18 (pg/mL) Mediana (RIQ)	303.6 (181.3-449.7)	139.4 (67.3-139.4)	0.003***‡
Se calculó la Media ± la Desviación Estandar (DE) o bien la Mediana y el Rango Intercuartilar (RIQ). Se realizó un análisis de normalidad y de acuerdo a la distribución de los datos se aplicó la prueba paramétrica t de student o prueba no paramétrica U de Mann Whitney para la comparación entre grupos. Se consideró un nivel de significancia de p<0.05. p <0.05* p <0.01** p <0.001***.			

Como se puede observar, hay diferencia significativa en las medidas antropométricas, siendo estas más elevadas en pacientes con Esteatosis grado 2 y 3. En relación a las transaminasas solo hay diferencia significativa en los niveles de ALT y GGT las cuales se encuentran más elevadas en pacientes con Esteatosis; a su vez el radio AST/ALT es significativamente más elevado en PVVIH como Grupo Control. Por otro lado, es evidente el aumento significativo de Insulina en PVVIH y Esteatosis grado 2 y 3, sin diferencias en la HbA1c o el Índice HOMA. Finalmente, las PVVIH tienen niveles significativamente más elevados de IFN-α e IL-18 vs. aquellas PVVIH y Esteatosis. No se presentaron diferencias en relación a los marcadores de activación vascular Dimero-D, sCD-36 y Ox-LDL.

Siguiendo la estrategia de análisis, se realizó la comparación entre las PVVIH como Grupo Control y aquellas con Esteatosis y Fibrosis severa (aquellos con un valor ARFI-4), los resultados se presentan en la Tabla 13.

Tabla 13. Comparación entre el grupo control vs. esteatosis + fibrosis severa (ARFI-4).

Característica	Control (n=45)	Esteatosis + fibrosis (ARFI-4) (n=11)	Valor de p
IMC Kg/m² Mediana (RIQ)	27.36 (23.78-29.41)	31.25 (29.86-35.8)	0.0001***
C. cintura cm Mediana (RIQ)	96 (90-101.5)	111 (104-115)	<0.0001****
C. cadera cm Mediana (RIQ)	96 (88.5-104.5)	107 (98-116)	0.0007***
Fibrinógeno (mg/dL) Mediana (RIQ)	405.5 (356-426.8)	454 (376-528)	0.04*
PCR (mg/dL) Mediana (RIQ)	2.6 (1.9-3.6)	8.3 (3.4-18.7)	0.0006***
IFN- α (pg/mL) Mediana (RIQ)	209.7 (80.4-1487)	58.65 (58.65-296)	0.04*
IL-8 (pg/mL) Mediana (RIQ)	57.3 (9.79-79.5)	13.6 (12.18-14.15)	0.02*
IL-18 (pg/mL) Mediana (RIQ)	303.6 (181.3-449.7)	139.4 (93.35-139.4)	0.001**
IL-6 (pg/mL) Mediana (RIQ)	1.7 (0.88-2.36)	4.16 (1.29-6.51)	0.03*
Dímero D (ng/mL) Mediana (RIQ)	152.7 (91.27-286.2)	221.6 (187.9-330.5)	0.03*
Se calculó la Mediana y el Rango Intercuartilar (RIQ). Se realizó un análisis de normalidad y de acuerdo a la distribución de los datos se aplicó la prueba paramétrica t de student o no paramétrica U de Mann Whitney para la comparación entre grupos. Se consideró un nivel de significancia de p<0.05. p <0.05* p <0.01** p <0.001***.			

En este análisis, fue relevante la diferencia en el IMC entre los grupos, con una mediana en el grupo esteatosis + fibrosis severa de 31.25 Kg/m² y una p de 0.0001, lo cual se corresponde con las circunferencias de cintura y cadera significativamente mayores en este grupo. Además, encontramos marcadores pro inflamatorios (PCR, fibrinógeno e IL-6) más elevados en el grupo esteatosis + fibrosis severa. Importantemente todos los niveles de PCR en este grupo se encuentran dentro del valor considerado como punto de corte para el riesgo de desarrollo de ECV (>3.3 mg/mL) en PVVIH. Interesantemente, el Dímero-D como marcador de activación vascular tiene una elevación significativa (p=0.03) en el grupo con Esteatosis y

Fibrosis severa. Por ultimo, los niveles de IFN- α , IL-18 e IL-8 fueron mayores en el grupo control de PVVIH.

Finalmente, realizamos un subanálisis de comparación entre el grupo Control y el grupo Esteatosis + Fibrosis con los grados más importantes de esteatosis por USG (grado moderado y severo). Los parámetros con significancia estadística se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Comparación entre el grupo control vs. esteatosis moderada y severa (grados 2 y 3) + fibrosis.

Característica	Control (n=45)	Esteatosis (Grados 2 y 3) + Fibrosis (n=19)	Valor de p
IMC m ² /kg Promedio \pm DE	26.86 \pm 3.50	29.83 \pm 4.28	0.005**
C. cintura cm Promedio \pm DE	95.51 \pm 7.52	103 \pm 11.11	0.002**
C. cadera cm Promedio \pm DE	96.59 \pm 9.85	102.3 \pm 8.4	0.03*
ALT (UI/L) Mediana (RIQ)	28 (21.5-37.5)	46 (25-68)	0.03*
Ratio AST/ALT Promedio \pm DE	0.80 \pm 0.26	0.67 \pm 0.16	0.03*
GGT (UI/L) Mediana (RIQ)	32 (23.25-51.75)	57 (33.25-83.5)	0.03*
Insulina (μ U/mL) Mediana (RIQ)	8.43 (4.27-12.07)	13.92 (9.58-18.65)	0.01*
HOMA Mediana (RIQ)	2.28 (1.14-3.32)	3.67 (2.26-4.94)	0.03*
IFN- α (pg/mL) Mediana (RIQ)	209.7 (80.4-1487)	80.4 (31.15-209.7)	0.03*
IFN- γ (pg/mL) Mediana (RIQ)	128.7 (78.9-1328)	1328 (78.9-11598)	0.04*
IL-18 (pg/mL) Mediana (RIQ)	303.6 (181.3-449.7)	139.4 (67.33-139.4)	0.0015**
Se calculó la Media \pm la Desviación Estandar (DE) o bien la Mediana y el Rango Intercuartilar (RIQ). Se realizó un análisis de normalidad y de acuerdo a la distribución de los datos se aplicó la prueba paramétrica t de student o no paramétrica U de Mann Whitney para la comparación entre grupos. Se consideró un nivel de significancia de p<0.05. p <0.05* p <0.01** p <0.001***			

Al realizar este análisis, encontramos un IMC y circunferencias de cintura y cadera mayores en el grupo con esteatosis + fibrosis ($p= 0.005$, 0.002 y 0.03 , respectivamente). En relación a las transaminasas, el grupo con esteatosis + fibrosis, registró valores más elevados de ALT (46 vs. 28 UI/L) y GGT (57 vs. 32 UI/L). Los niveles de insulina fueron significativamente más elevados en el grupo con esteatosis y fibrosis ($p= 0.01$), así como el índice HOMA ($p= 0.03$). Finalmente, las citocinas IFN- α e IL-18 ($p= 0.03$ y 0.0015 , respectivamente) se encontraron más elevados en el grupo control, siguiendo el comportamiento que se observó en los análisis previos.

Análisis de correlación entre variables.

Adicionalmente, se realizaron pruebas de correlación entre las variables de interés (citocinas como IL-6 e IL-18, CD36s, Ox-LDL y Dímero D) con el grado de esteatosis o fibrosis hepática y se realizaron también correlaciones entre las mismas variables de interés o bien, entre estas y algunas características clínicas y medidas antropométricas en cada uno de los grupos de estudio.

En este sentido, al evaluar los niveles de IL-18 en suero y el grado de esteatosis por USG se observó que los niveles de esta citocina son más elevados en las PVVIH y que estos niveles disminuyen significativamente cuando estos pacientes tienen una valoración de esteatosis hepática en grado 1 ($p= <0.05$), grado 2 ($p= <0.0001$) o grado 3 ($p=0.0004$). Al comparar todos los grupos y aplicando Kruskal Wallis se obtuvo una diferencia significativa con un valor de $p= <0.0001$, Figura 7.

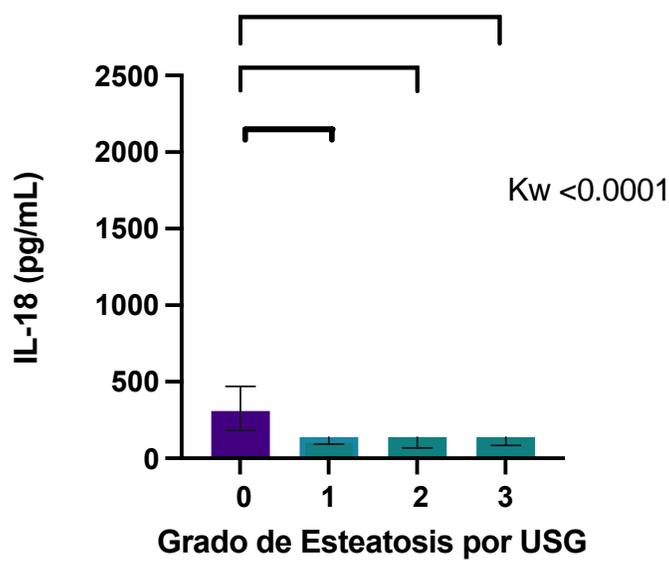


Figura 7. Niveles de IL-18 en relación a los grados de esteatosis por USG. Se graficaron los niveles de IL-18 en pg/mL de acuerdo a la presencia o ausencia de Esteatosis. Se realizó un análisis de normalidad y de acuerdo a la distribución de los datos se aplicó Kruskal Wallis para la comparación de todos los grupos ($p < 0.0001$) y adicionalmente la prueba paramétrica t de student o no paramétrica U de Mann Whitney para la comparación entre grupos. Se consideró un nivel de significancia de $p < 0.05$. $p < 0.05^*$ $p < 0.01^{**}$ $p < 0.001^{***}$.

Por otro lado, los niveles de Ox-LDL son significativamente más elevados en aquellas PVVIH con USG=3 vs. aquellos con USG=2 ($p = < 0.05$) y con USG=1 ($p = < 0.01$). Es decir, entre mayor es el grado de esteatosis más elevados son los niveles de Ox-LDL en PVVIH, Figura 8.

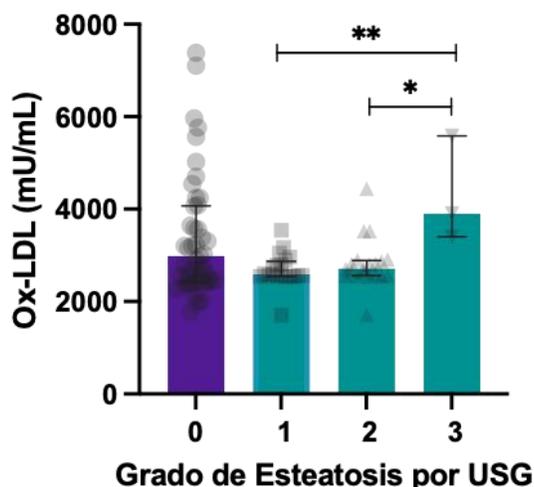


Figura 8. Niveles de Ox-LDL en relación a los grados de esteatosis por USG. Se graficaron los niveles de Ox-LDL en mU/mL de acuerdo a la presencia o ausencia de Esteatosis. Se realizó un análisis de normalidad y de acuerdo a la distribución de los datos se aplicó ANOVA o Kruskal Wallis para la comparación de todos los grupos, adicionalmente se aplicó la prueba paramétrica t de student o no paramétrica U de Mann Whitney para la comparación entre grupos. Se consideró un nivel de significancia de $p < 0.05$. $p < 0.05^*$ $p < 0.01^{**}$.

De manera inicial, se realizaron correlaciones entre las variables de interés en los diferentes grupos. En la Figura 9, se puede observar que en las PVVIH como Grupo Control existe una correlación positiva entre el Dímero D y los niveles de Ox-LDL ($r = 0.37$ $p = 0.024$) así como con el ICC ($r = 0.36$ $p = 0.012$). La IL-18 se correlaciona positivamente con la IL-6 ($r = 0.43$ $p = 0.009$) y con la concentración sérica de ALT ($r = 0.34$ $p = 0.034$) pero negativamente con el Ox-LDL ($r = -0.36$ $p = 0.033$). Por otro lado, el sCD36 tiene una correlación positiva con el IMC y la Circunferencia de Cintura ($r = 0.46$ $p = 0.043$, $r = 0.48$ $p = 0.036$; respectivamente), sin embargo, se correlaciona negativamente con los niveles de LDL ($r = -0.50$ $p = 0.043$).

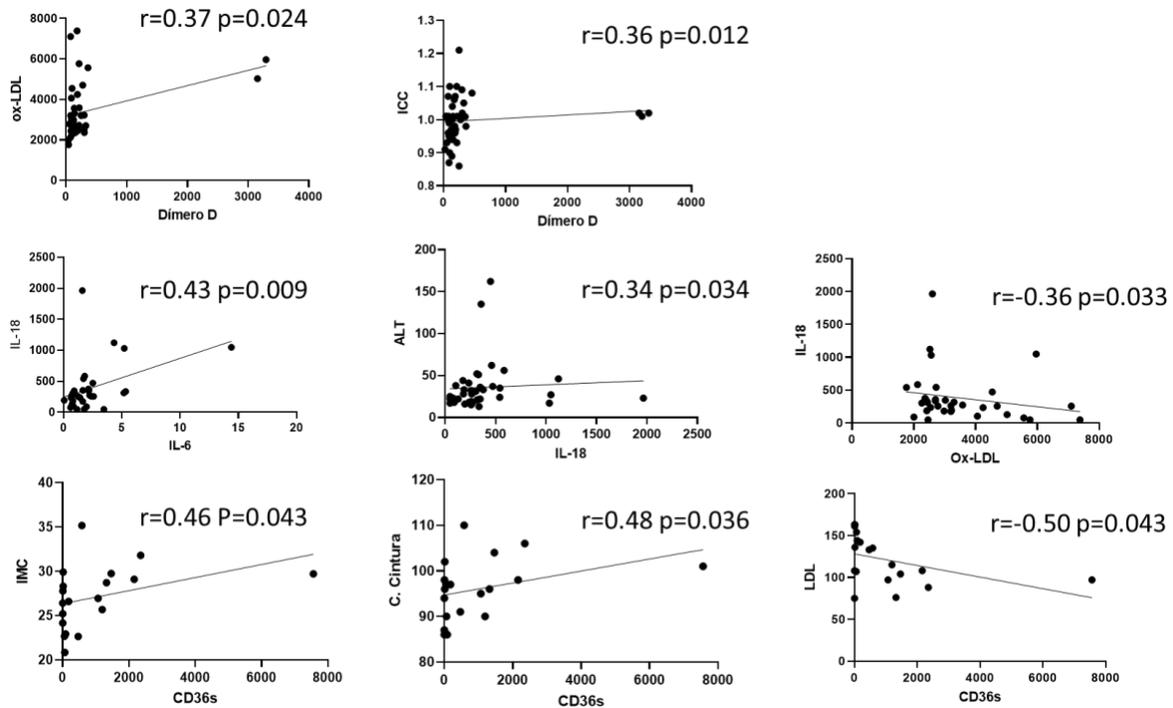


Figura 9. Analisis de correlaciones entre las variables de interes en el grupo control.

Se representan las correlaciones positivas y negativas entre las variables de interes de las personas que viven con VIH (PVVIH) como grupo Control. Se realizó la prueba de normalidad y dependiendo de la distribución de los datos se realizó la prueba de Correlación de Pearson o de Spearman, se consideró significativo un valor de $p < 0.05$.

En las PVVIH y adicionalmente con algún grado de Esteatosis, el Ox-LDL tiene una correlación positiva con la PCR, con la HbA1c, por el contrario muestra una correlación negativa con la IL-18 ($r = 0.46$ $p = 0.19$, $r = 0.41$ $p = 0.027$, $r = -0.48$ $p = 0.035$; respectivamente). Por otro lado, el Dimero D se correlaciona positivamente con la PCR y el IMC ($r = 0.37$ $p = 0.025$ y $r = 0.43$ $p = 0.006$) y negativamente con el CD36s y los niveles de triglicéridos ($r = -0.54$ $p = 0.039$, $r = -0.32$ $p = 0.05$). Finalmente, en este grupo la IL-18 tiene una relación positiva con las concentraciones séricas de HDL ($r = 0.41$ $p = 0.046$), Figura 10.

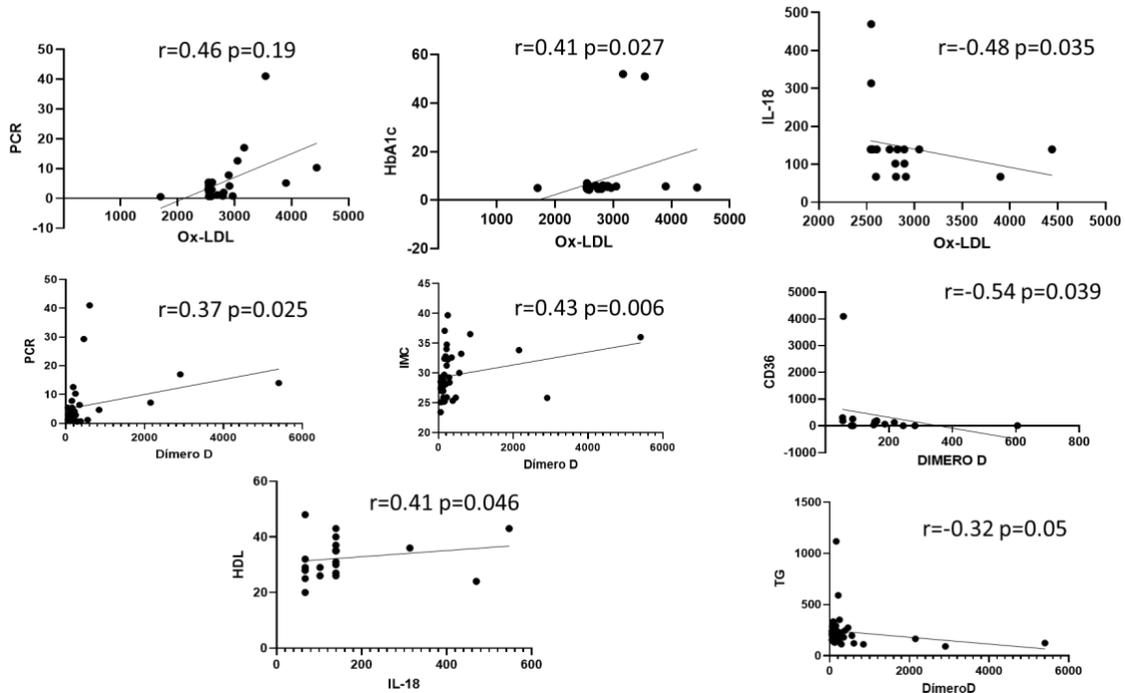


Figura 10. Analisis de correlaciones entre las variables de interes en el grupo Esteatosis. Se representan las correlaciones positivas y negativas entre las variables de interes en las PVVIH y con algún grado de Esteatosis por USG. Se realizó la prueba de normalidad y dependiendo de la distribución de los datos se realizó la prueba de Correlación de Pearson o de Spearman, se consideró significativo un valor de $p < 0.05$.

En la Figura 11, se puede observar que en aquellos PVVIH y cursan con algún grado de Fibrosis, la IL-18 tiene una correlación positiva con la PCR ($r = 0.76$ $p = 0.021$) pero negativa con las concentraciones de colesterol ($r = -0.68$ $p = 0.042$). De igual manera, existe una correlación negativa entre los niveles de sCD36 y la HbA1c ($r = -0.93$ $p = 0.005$).

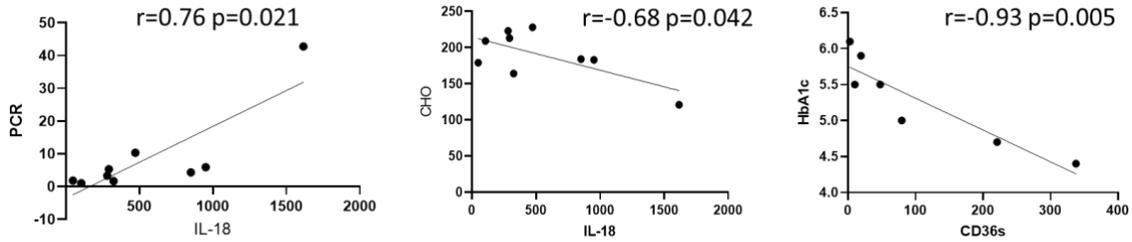


Figura 11. Análisis de correlaciones entre las variables de interés en el grupo control y grupo fibrosis. Se representan las correlaciones positivas y negativas entre las variables de interés de los pacientes VIH+ y algún grado de Fibrosis por ARFI. Se realizó la prueba de normalidad y dependiendo de la distribución de los datos se realizó la prueba de Correlación de Pearson o de Spearman, se consideró significativo un valor de $p < 0.05$.

Finalmente, en aquellas PVVIH que cursan con algún grado de Esteatosis más Fibrosis existe una correlación negativa entre el Dímero D y la IL-18 así como con las concentraciones de GGT ($r = -0.59$ $p = 0.012$, $r = -0.52$ $p = 0.022$), Figura 12.

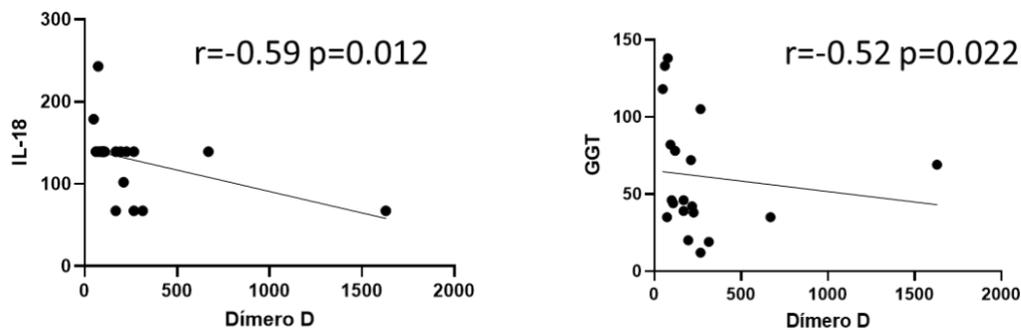


Figura 12. Analisis de correlaciones entre las variables de interés en grupo control vs. el grupo con esteatosis más fibrosis. Se representan las correlaciones positivas y negativas entre las variables de interés en las PVVIH con algún grado de Esteatosis más Fibrosis. Se realizó la prueba de normalidad y dependiendo de la distribución de los datos se realizó la prueba de Correlación de Pearson o de Spearman, se consideró significativo un valor de $p < 0.05$.

Niveles plasmáticos de BCAAs.

En un primer acercamiento a la cohorte de las 118 PVVIH, se realizó una subclasificación de los mismos considerando únicamente la presencia o no de esteatosis hepática por USG. A los dos grupos así divididos, se les realizó la evaluación de aminoácidos en plasma a través de Cromatografía Líquida De Alta

Resolución (HPLC por sus siglas en inglés) en la UANL, institución que ofrece la evaluación de 17 aminoácidos entre los que se incluyen los BCAAs de interés particular para este protocolo.

Para este análisis, se dividieron los pacientes en dos grupos:

- El grupo PVVIH **sin** esteatosis, que incluyó a 58 pacientes (45 paciente del grupo control y 13 pacientes del grupo fibrosis).
- El grupo PVVIH **con** esteatosis, que incluyó a 60 pacientes (39 del grupo de esteatosis y 21 del grupo esteatosis + fibrosis).

Se envió un *pool* (mezcla homogénea de plasma) de 5 pacientes sin esteatosis y un *pool* de 5 pacientes con esteatosis, (aquellos con USG grado 3 o grado 4), por lo tanto, como se puede observar en la Tabla 15 y en la Figura 13 solo se reporta un valor de cada aminoácido para cada grupo.

Tabla 15. Concentración de aminoácidos en grupos con y sin esteatosis hepática.

Aminoácidos	PVVIH n=5 en pool ($\mu\text{mol/L}$)	PVVIH con Esteatosis n=5 en pool ($\mu\text{mol/L}$)	Valor de Referencia ($\mu\text{mol/L}$)
Ác. Aspártico	12	13	2-9
Ac. Glutámico	295	229	6-62
Serina	101	82	89-165
Histidina	24	13	72-108
Arginina	82	82	28-96
Glicina	277	205	147-299
Treonina	71	67	92-180
Citrulina	46	55	19-47
Alanina	481	330	146-494
Ornitina	32	33	55-135
Tirosina	64	52	37-77
Lisina	85	74	135-243
Metionina	26	25	13-37
Valina	234	170	179-335
Fenilalanina	68	43	46-74
Isoleucina	80	54	46-90
Leucina	160	120	113-205

Concentraciones de aminoácidos en $\mu\text{mol/L}$ para cada grupo. En negritas se señalan las concentraciones de aminoácidos que se encuentran fuera de los rangos de referencia.

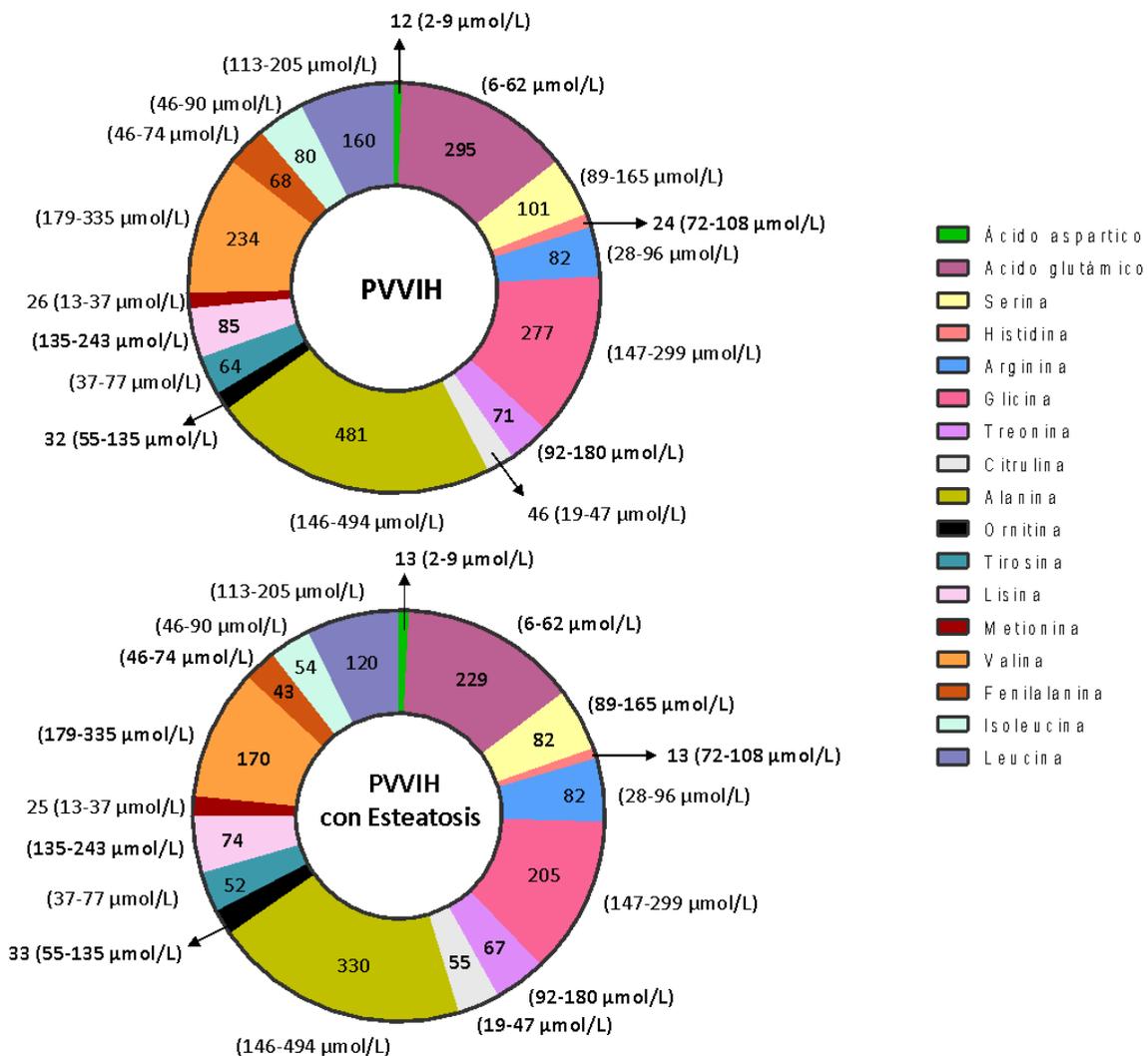


Figura 13. Concentración de aminoácidos plasmáticos en grupos con y sin esteatosis. En negritas se señalan los aminoácidos que se encuentran fuera del valor de referencia. La determinación fue realizada por HPLC y las concentraciones se expresan en µmol/L.

Considerando los valores de referencia para los aminoácidos, se puede observar que algunos aminoácidos están aumentados en ambos grupos, en este sentido, ambos grupos muestran una elevación en la concentración de ácido aspártico y ácido glutámico, este último destaca, dado que para ambos grupos se cuadruplica el límite superior y la concentración es más elevada aún PVVIH sin esteatosis. En el caso de citrulina, este aminoácido solo se encuentra elevado en el grupo de PVVIH con esteatosis (Figura 14).

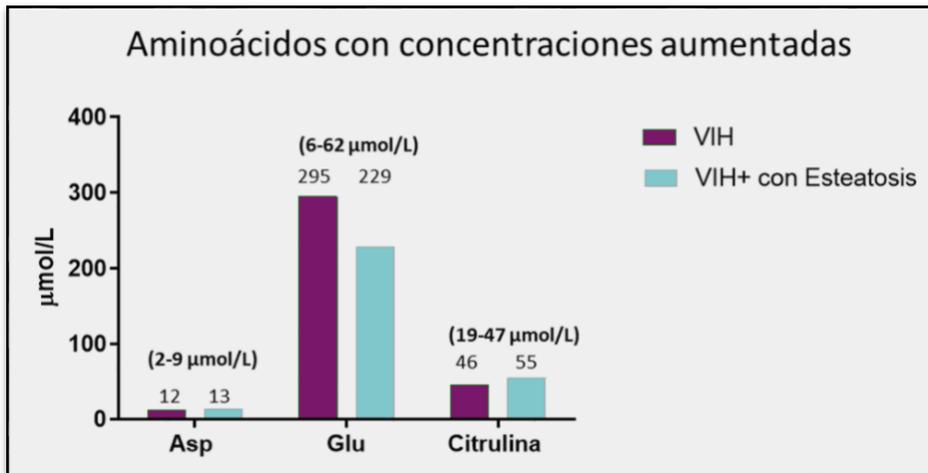


Figura 14. Perfil de aminoácidos con concentraciones por encima de los valores de referencia en PVVIH con y sin esteatosis. La determinación fue realizada por HPLC. El número sobre cada barra indica la concentración del aminoácido para cada grupo. En el paréntesis se expresa el rango de referencia normal para cada aminoácido. Las concentraciones se expresan en $\mu\text{mol/L}$. Asp: ácido aspártico, Glu: ácido glutámico.

Los aminoácidos histidina, lisina, teonina y ornitina tuvieron concentraciones bajas en ambos grupos. Interesantemente el grupo de PVVIH con Esteatosis mostró concentraciones disminuidas de serina, valina y fenilalanina (Figura 15).



Figura 15. Perfil de aminoácidos con concentraciones por debajo de los valores de referencia en PVVIH con y sin esteatosis. La determinación fue realizada por HPLC. El número sobre cada barra indica la concentración del aminoácido para cada grupo. En el paréntesis se expresa el rango de referencia normal para cada aminoácido. Las

concentraciones se expresan en $\mu\text{mol/L}$. Ser: serina, His: histidina, Tre: treonina, Orn: ornitina, Lis: lisina, Val: valina, Fen: fenilalanina.

En relación a los aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs): valina, leucina e isoleucina, se encuentran dentro del rango de referencia para ambos grupos, sin embargo, como se observa en la Figura 16, las concentraciones son más elevadas en PVIH sin esteatosis.

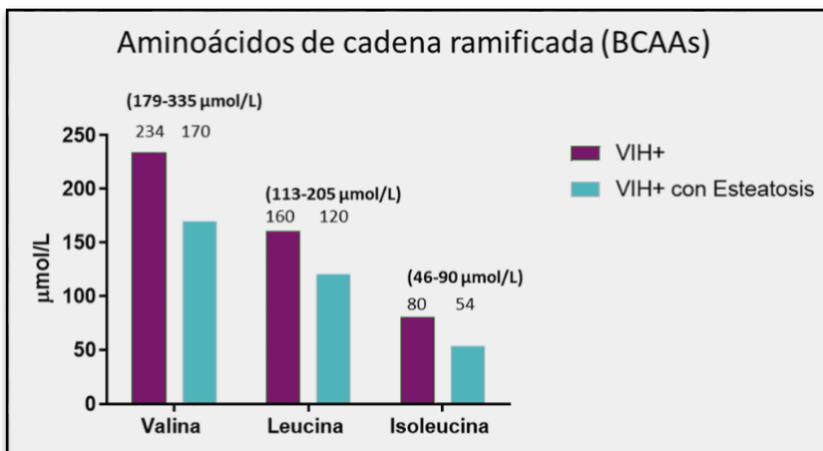


Figura 16. Perfil de aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs) en PVIH con y sin esteatosis. La determinación fue realizada por HPLC. El número sobre cada barra indica la concentración del aminoácido para cada grupo. En el paréntesis se expresa el rango de referencia normal para cada aminoácido. Las concentraciones se expresan en $\mu\text{mol/L}$.

Acidos grasos de cadena corta (SCFAs) en heces.

Se determinó la concentración de SCFAs (acetato, propionato y butirato) en heces de los pacientes en cada uno de los grupos. Los resultados se muestran en la Figura 17.

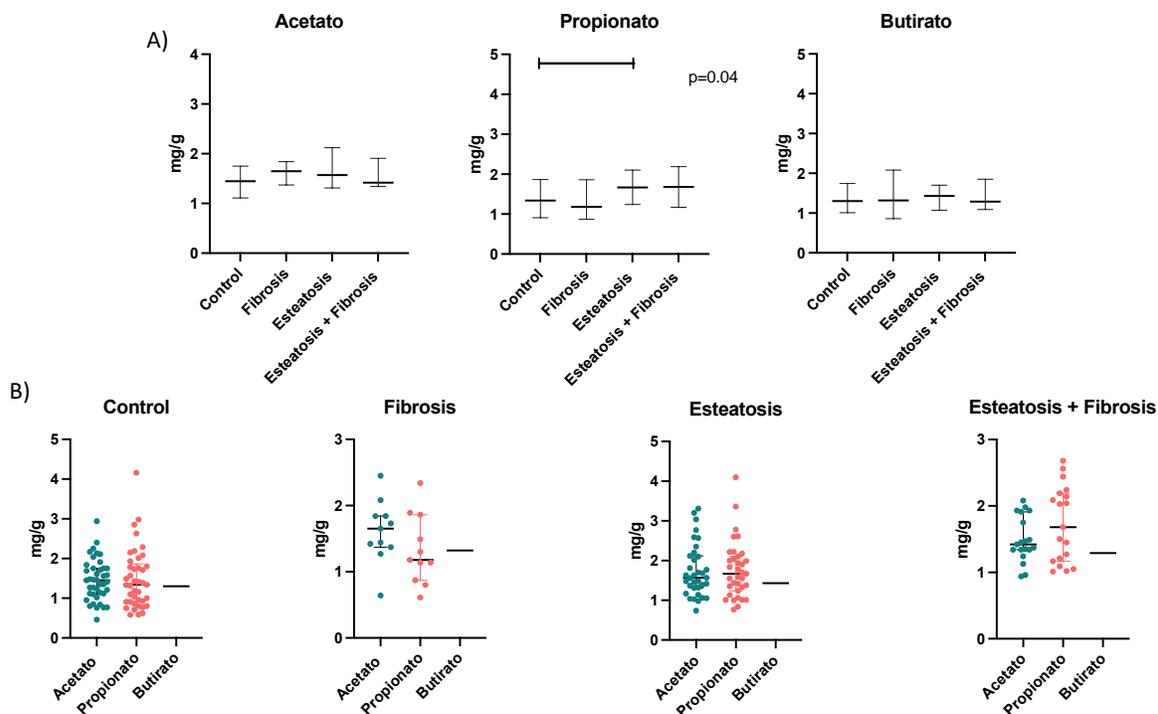


Figura 17. Evaluación de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) en heces de pacientes de los cuatro grupos de estudio. La determinación fue realizada por HPLC. En A) se visualizan los SCFAs por separado en cada uno de los gráficos así como la concentración medida de cada grupo; en B) se visualizan cada grupo de estudio por separado en cada uno de los gráficos, y la cantidad encontrada de acetato, propionato y butirato en cada grupo. Se realizó un análisis de normalidad y de acuerdo a la distribución de los datos, se aplicó ANOVA o Kruskal Wallis o bien, t de student o U de Mann Whitney para la comparación entre grupos. Se consideró un nivel de significancia de $p < 0.05$. Se grafican la Mediana y el Rango Intercuartilar (RIQ). Las concentraciones son expresadas en mg/g.

Al realizar el análisis estadístico correspondiente, solo se observó diferencia significativa ($p=0.04$) en la concentración del Propionato entre el grupo Control de PVVIH con una mediana de 1.34 (0.91,1.86) vs. aquellas PVVIH con Esteatosis con una mediana de 1.67 (1.24,2.1); es evidente una mayor concentración de propionato en el grupo con Esteatosis.

Caracterización de la microbiota intestinal.

De los 118 pacientes incluidos en el estudio, fue posible llevar a cabo el análisis de microbiota intestinal en 61 de ellos mediante secuenciación de las regiones hipervariables V3-V4 (se elige esta región ya que se considera una región que contiene un máximo de heterogeneidad de nucleótidos mostrando así el máximo

poder de discriminación) del gen 16S correspondiente a la subunidad menor del ribosoma de los organismos procariontes mediante *MiSeq-Illumina system*.

Se obtuvieron 2,188,968 amplicones durante el proceso de secuenciación, de los cuales, después de la limpieza y filtrado de los datos mediante los programas bioinformáticos descritos en la metodología, se obtuvo un promedio por muestra de 27,277 amplicones. De dichos amplicones, fue posible conformar 544 OTU's (Unidades Taxónomicas Operativas utilizadas para individualizar categorías taxónomicas y poder ordenarlos en una clasificación y en la construcción de un árbol filogenético), de los cuales 513 se encontraron en dos o más muestras procesadas.

- **Curva de rarefacción.**

Las curvas de rarefacción se utilizan para saber si se obtuvieron suficientes OTUs o número de secuencias, y si estas representan una fracción significativa del total de especies en una muestra. Se obtuvieron las curvas de rarefacción para los OTU's asignados. Como se muestra en la Figura 18, todas las muestras, con excepción de la N107 obtuvieron una profundidad de análisis superior a las 15,000 lecturas, por lo tanto, en los análisis posteriores se descarta esta muestra, con un total global de 60 muestras para el análisis de secuenciación de microbiota (Figura 18).

En la Figura 18 se muestra la curva de rarefacción de las 60 muestras analizadas. Una vez eliminada la muestra N107, las curvas de rarefacción en el análisis, a nivel género sobrepasaron la profundidad de las 15,000 lecturas. Como se observa en la Figura 18, la normalización y filtrado de datos se realizó mediante la Media \pm Desviación Estándar, lo que permitió una mayor detección de amplicones con la suficiente confiabilidad para ser analizados, resultando en 272 OTU's.

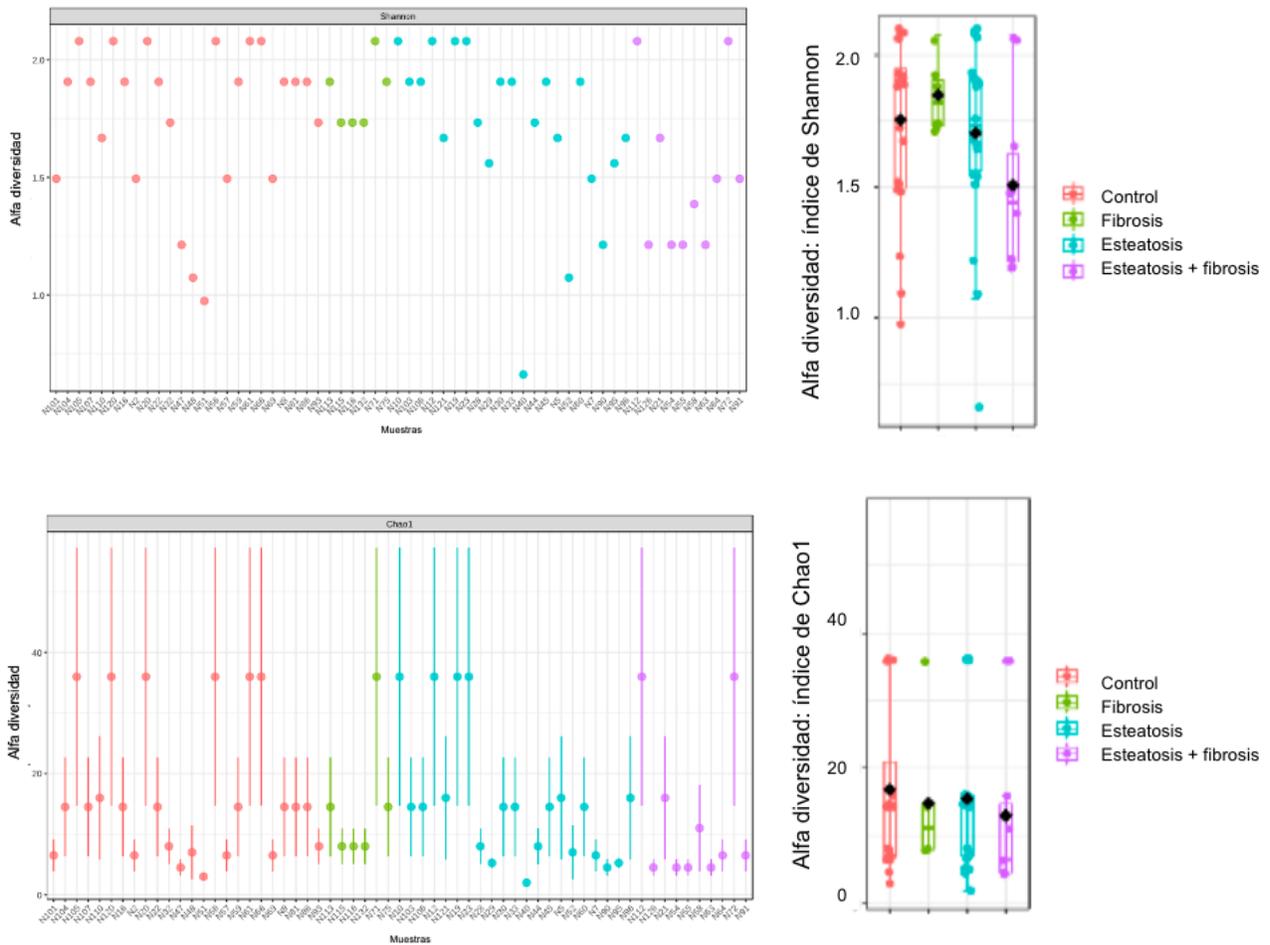


Figura 19. Diversidad alfa de la microbiota intestinal. Se analizó la diversidad o riqueza microbiana (eje de las Y) en cada una de las muestras (eje de las X) con la finalidad de poder definir el número de taxones en cada una de las muestras evaluadas y evaluar si había diferencia significativa en la diversidad de taxones en cada grupo. Se calcularon el Índice de Shannon y de Chao1 sin obtener diferencias significativas ($p= 0.16$) y Chao1 ($p= 0.84$); respectivamente.

- **Diversidad beta de la microbiota intestinal.**

La beta diversidad hace referencia a la abundancia y las similitudes/disimilitudes, o, dicho en otras palabras, la presencia/ausencia de los distintos géneros y especies presentes en cada grupo; así la diversidad beta compara muestras y responde a la pregunta ¿Cuáles son las diferencias en la composición microbiana entre las muestras?. Se estimaron los índices de Bray Curtis el cual, se considera una medida cuantitativa de la diferencia entre las abundancias de cada especie presente; los

valores van de 0 a 1, en donde un valor de 0 significa que dos muestras comparten exactamente la misma especie y en la misma abundancia y un valor de 1 significa que dos muestras tienen abundancias de especies completamente diferentes. Por otro lado, el índice cualitativo de Jaccard hace referencia a la presencia/ausencia ignorando la información de abundancia; los valores van de 0 a 1 en donde; un valor de 0 significa que ambas muestras comparten la misma especie y un valor de 1 significa que las muestras comparadas no tienen especies en común. Finalmente, la divergencia de Jensen-Shannon indica las similitudes entre dos comunidades o muestras.

Así, con el análisis de diversidad beta, se estimó la abundancia y la presencia o ausencia de los distintos géneros y especies en cada grupo, este análisis se esquematiza en la Figura 20. Se utilizó un Análisis de Coordenadas Principal (*PCA*, *Principal Coordinate Analysis* por sus siglas en inglés) para determinar los enterotipos (forma predominante de un tipo de bacterias a nivel de género, que caracteriza a la microbiota intestinal de cada individuo) presentes en nuestra población de estudio a través del índice Jaccard y Bray.

En total, el 5% se clasificó con un enterotipo *Bacteroides*, el 15% como *Firmicutes* y finalmente el 80% se clasificó como *Prevotella* (Figura 20).



Figura 20. Diversidad beta de la microbiota intestinal. Se presenta la diversidad beta estimada mediante el índice de Bray-Curtis, divergencia de Jensen-Shannon, así como el índice de Jaccard para calcular las abundancias relativas de cada enterotipo encontrado.

Mediante la prueba PERMANOVA (*Permutational multivariate analysis of variance*), se observaron dos enterotipos claramente diferenciados: *Firmicutes* y *Prevotella* ($p=0.001$), siendo el más frecuente *Firmicutes*, presente en el 90% de las muestras analizadas, mientras que *Prevotella* predominó en el 10%.

Posteriormente, se estimó la abundancia de cada enterotipo por grupo.

- En el grupo Control se encontraron pacientes con enterotipos *Firmicutes* y *Prevotella*, con mayor abundancia de *Firmicutes* (87%).
- En el grupo Fibrosis, 5 de los 6 casos que lo conforman se clasificaron como *Prevotella* y un único caso como *Bacteroides*.
- En el grupo Esteatosis, se detectaron los 3 enterotipos, con *Prevotella* como el más abundante (81% de los casos), seguido por *Firmicutes* (14%).
- En el grupo Esteatosis + Fibrosis, se detectaron los 3 enterotipos, el más abundante fue *Prevotella* en un 60% seguido de *Firmicutes* con un 30%.

- **Abundancia relativa a nivel de filo y género de la microbiota intestinal en los diferentes grupos de estudio.**

La abundancia relativa se refiere a la composición porcentual de un microorganismo con relación al total de microorganismos presentes en la muestra. La abundancia relativa general y por grupos en los niveles filo y género se presentan en la Figura 21. Como se puede observar a nivel de Filo predominan *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, seguidos de *Proteobacterias* en el total de las muestras c), y cuando se ordenan dependiendo el grupo d). Por otro lado, a nivel de genero, se puede observar como hay un predominio del genero *Prevotella*, *Blautia*, *Faecalibacterium* y *Succinivibrio*, este ultimo sobretodo en el grupo de Esteatosis y algunos pacientes del Grupo de Esteatosis más Fibrosis, Figura 21 a) en el total y b) cuando se ordenan dependiendo el grupo.

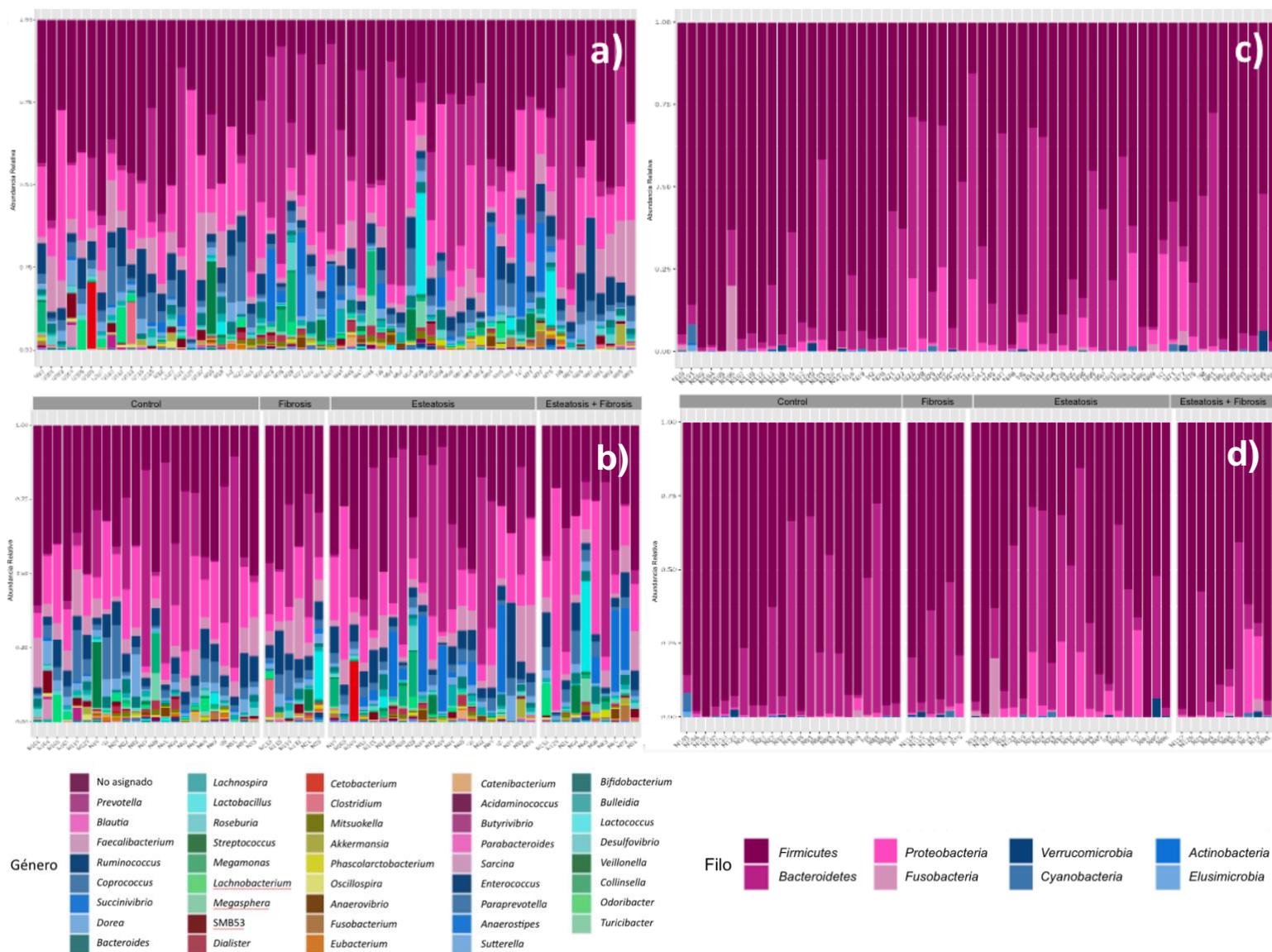


Figura 21. Abundancia relativa a nivel de filo y género de la microbiota intestinal de pacientes con la población total y los diferentes grupos analizados. a) Abundancia relativa de las muestras analizadas a nivel género. b) Abundancia relativa de las muestras analizadas a nivel género por grupo. c) Abundancia relativa de las muestras analizadas a nivel filo por grupo. d) Abundancia relativa de las muestras analizadas a nivel filo por grupo.

Se construyó un core microbiano para cada grupo, que se representó mediante un heatmap a nivel género; dichos core se muestran en la Figura 22. En el grupo Control, los géneros *Blautia*, *Ruminococcus* y *Dorea* fueron los más característicos. En el grupo con Fibrosis predominó *Ruminococcus*, *Faecalibacterium*, *Coprococcus* y *Blautia*; en el grupo con Esteatosis se encontró principalmente *Blautia*,

Ruminococcus y *Coprococcus*; mientras que para el grupo Esteatosis + Fibrosis, predominaron *Blautia* y *Ruminococcus*.

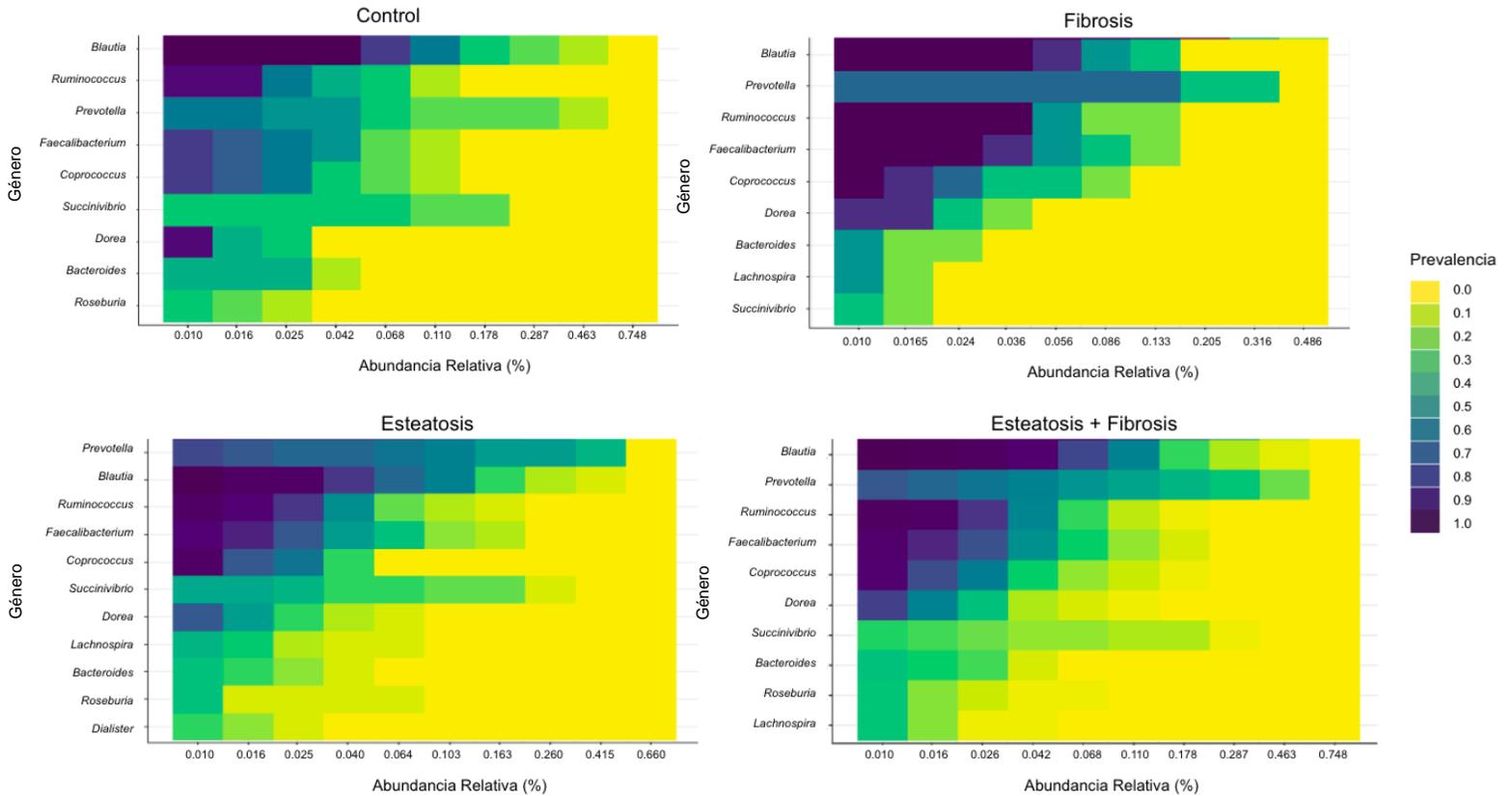


Figura 22. Heatmaps del core microbiano a nivel género para cada grupo. Se representan cuatro heatmaps a nivel de género para cada grupo. La gama de color va de morado intenso, pasando por verde y terminando en una tonalidad amarilla, siendo el morado intenso un indicativo de mayor abundancia relativa (eje de las X) y a medida que se difumina hacia el tono amarillo se pierde la abundancia del género bacteriano en particular (eje de las Y).

En el diagrama Krona cada uno de los círculos representan los diferentes niveles de clasificación taxónomicos: reino, *phylum*, clase, orden, familia, género y especie, los cuales se representan de adentro hacia fuera, respectivamente. Adicionalmente, el tamaño de cada sector representa la abundancia relativa en porcentaje. Así, en el Diagrama de Krona de la Figura 23 se presenta la composición microbiana de los grupos analizados en diversos niveles filogenéticos. Resalta que, en el grupo de PVVIH como grupo Control (color aqua) hay un predominio de *Prevotella* (6%), género que también predominó de manera importante en el grupo de Estatosis (color ladrillo) con un 11%, seguido de *Blautia* en un 3% así como *Succinivibrio* y *Faecalibacterium* en un 2%. El grupo de Fibrosis se observa una mayor abundancia

de *Firmicutes* y esta presente *Prevotella* en un 4% seguido de *Blautia* 2% y *Lactobacillales* en un 1%; finalmente en el grupo de Esteatosis + Fibrosis (color verde) hay una mayor abundancia de *Blautia* (5%), *Prevotella* (4%) y *Succinivibrio* (2%), Figura 23.

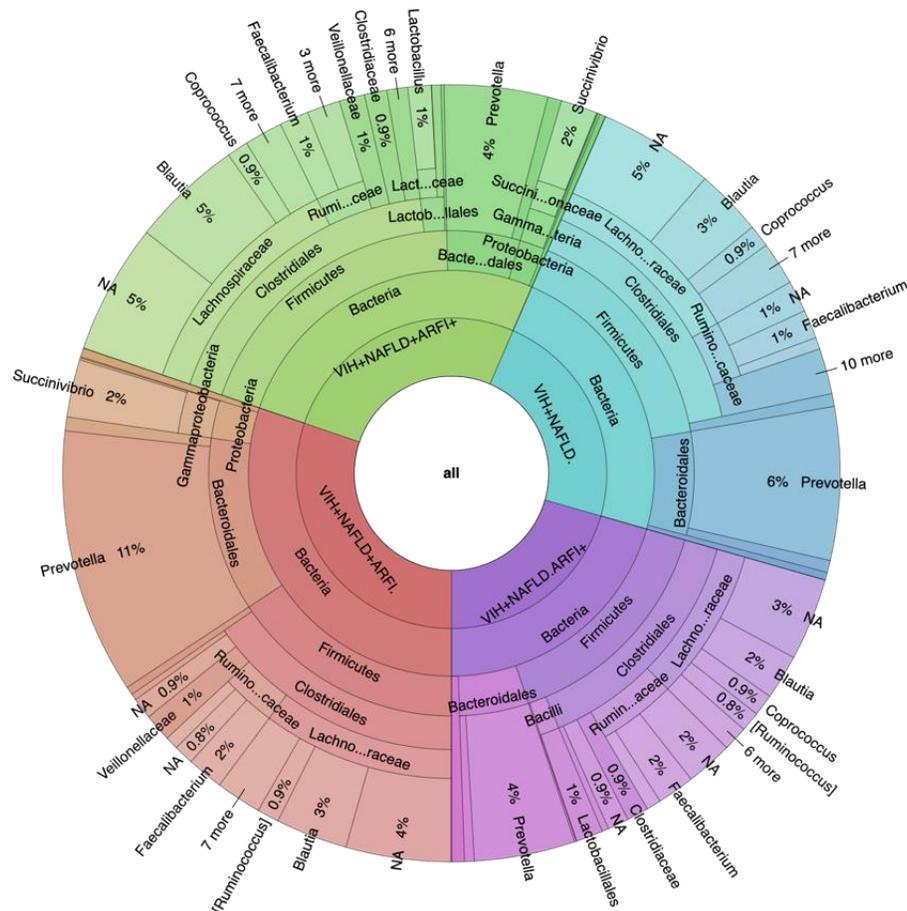


Figura 23. Diagrama de Krona de la composición microbiana en los diferentes grupos de estudio. Los círculos representan los diferentes niveles de clasificación taxónomica: reino, *phylum*, clase, orden, familia, género y especie, los cuales se representan de adentro hacia fuera, respectivamente. Adicionalmente, el tamaño de cada sector representa la abundancia relativa en porcentaje para cada uno de los grupos de estudio. En color verde se representa el grupo Esteatosis + Fibrosis, el color azul representa el grupo de PVVIH o Control, el color morado representa el grupo de Fibrosis y finalmente, el color ladrillo representa el grupo de Esteatosis.

- **Comparación y clasificación de la microbiota intestinal.**

Se realizó también una comparación entre los diferentes grupos de estudio y la abundancia de enterotipos: *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Prevotella* y se destacan los siguientes puntos que a su vez se representan en la Figura 24. Cada uno de los gráficos representa uno de los 3 enterotipos, en cada gráfico en el eje de las Y se destacan los géneros que se están correlacionando para cada enterotipo, y en el eje de las X se representa la escala del Coeficiente de correlación o bien la medida o fuerza de la correlación (del 0 hacia los negativos, indica una correlación negativa y es graficada en color azul, por otro lado del 0 hacia los positivos indica una correlación positiva que es graficada en color rojo). Adicionalmente, a la derecha de cada enterotipo se encuentran los cuatro grupos de estudio en donde puede observarse que para cada uno de los géneros representados en el eje de las Y se les asigna un cuadro de color el cual indica abundancia y va de un color azul intenso (muy baja) a rojo (muy alta). De esta manera, cuando se observa un color rojo intenso indica que ese género que se está correlacionando (positiva o negativamente) con el enterotipo es muy abundante en ese grupo de manera particular, y contrariamente cuando se observa un cuadro de color azul intenso en un grupo, indica que ese género bacteriano que se está correlacionando (positiva o negativamente) con el enterotipo es muy poco abundante en ese grupo de manera particular.

- *Bacteroidetes* presentó una fuerte correlación negativa con la abundante presencia de *Firmicutes* en el grupo de Esteatosis ($p = <0.0001$).
- *Firmicutes* se relacionó negativamente con *Bacteroidetes* en el grupo Esteatosis + Fibrosis ($p = <0.0001$) y con *Proteobacteria* en el grupo Control ($p = 0.002$).
- *Prevotella* se correlacionó positivamente ($p = 0.009$) con *Lactococcus* ($p = 0.009$), *Megamonas* y *Mitsuokella*, y negativamente con *Blautia*, siendo característico en el grupo Esteatosis + Fibrosis y, por el contrario, muy poco abundante en el grupo esteatosis ($p = <0.0001$);

- *Bacteroides*, *Dorea*, *Ruminococcus*, *Veillonella*, *Coprococcus*, *Clostridium*, *Acidaminococcus*, *Akkermansia*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Faecalibacterium* fueron los géneros corelacionados negativamente a *Prevotella*.

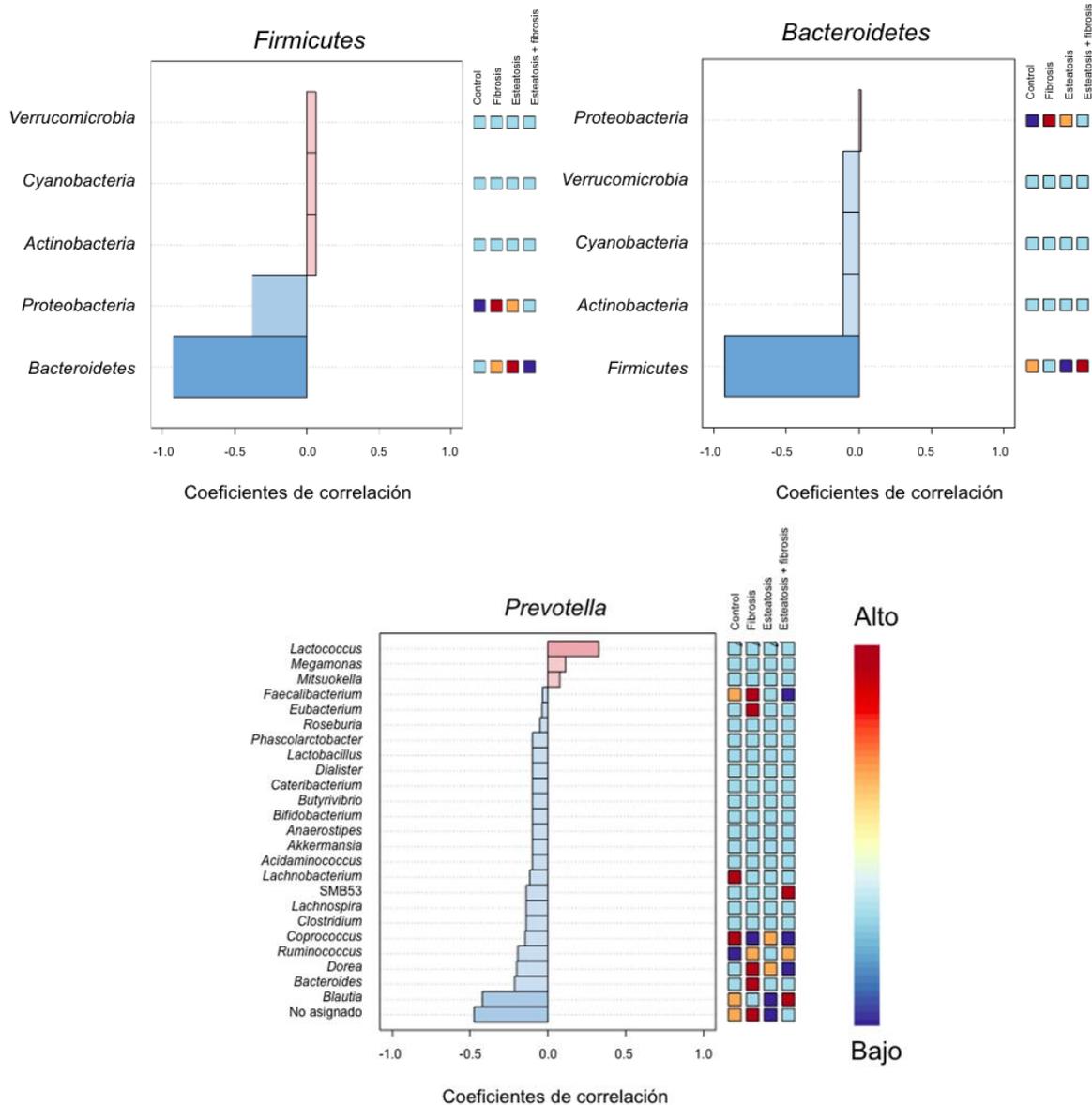


Figura 24. Patrón presente de microbiota intestinal según enterotipo y grupo de pacientes para *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Prevotella*. Se representan los tres enterotipos y cada uno de los generos (eje de las Y) con los que se existe una correlacion negativa es decir del 0 y hacia los negativos (barras de color azul) o positiva del 0 y hacia los positivos (barras de color ladrillo). Al lado derecho de cada enterotipo se encuentran los cuatro grupos de estudio a los

cuales se les asigna un cuadro de color para cada uno de los generos que se estan correlacionando con el enterotipo. El color del cuadro indica abundancia, un color rojo indica alta abundancia del genero que se esta correlacionando y un color azul intenso indica una baja abundancia del genero que se correlaciona al enterotipo.

El análisis *MetagenomaSeq* esta diseñado para determinar características (como las OTUs) que son diferencialmente abundantes entre dos o más grupos de múltiples muestras. Así mediante el análisis *Metagenomeseq*, se buscó una correlación funcional de la abundancia relativa de género y filo entre grupos. Al realizar la prueba de comparación entre los grupos a nivel filo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. 17 géneros bacterianos se observaron de manera diferenciada entre los grupos de estudio, los cuales se representan en la Figura 24 en donde también se destacan los diferentes valores de p obtenidos. En este análisis se corrobora el papel importante que desempeñan los géneros *Anaerovibrio*, *Lactococcus*, *Veillonella* y *Parabacteroides* descritos en el análisis anterior, Figura 25.

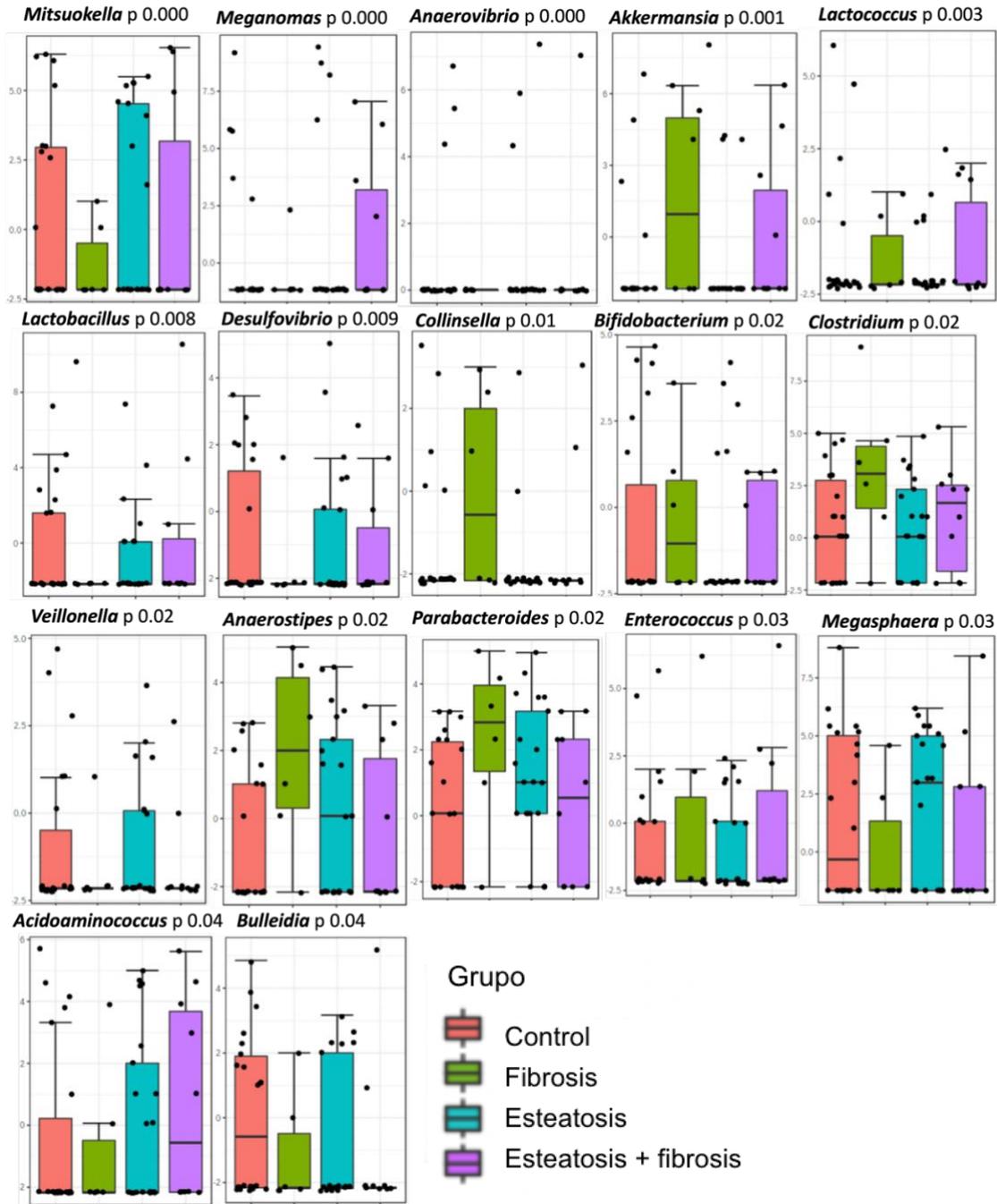
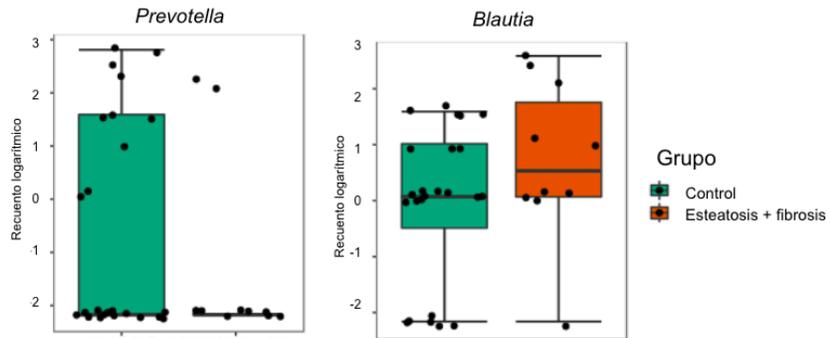
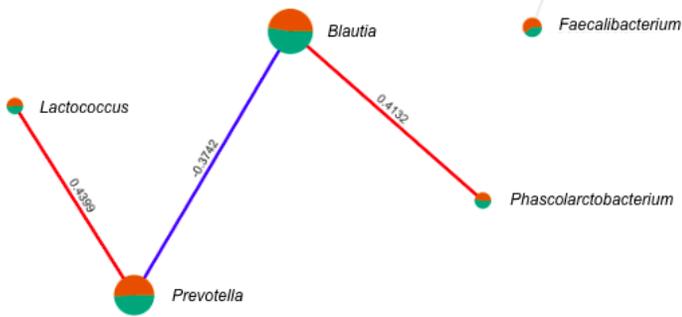


Figura 25. Análisis estadístico *Metagenomaseq* para la asociación de la comunidad microbiana en los diferentes grupos. Mediante el análisis *Metagenomeseq*, se buscó una correlación funcional de la abundancia relativa de género y filo entre grupos. A nivel de género, 17 géneros bacterianos que son representados graficamente se observaron de manera diferenciada en los grupos de estudio, para cada uno de ellos se representa en valor de *p* obtenido.

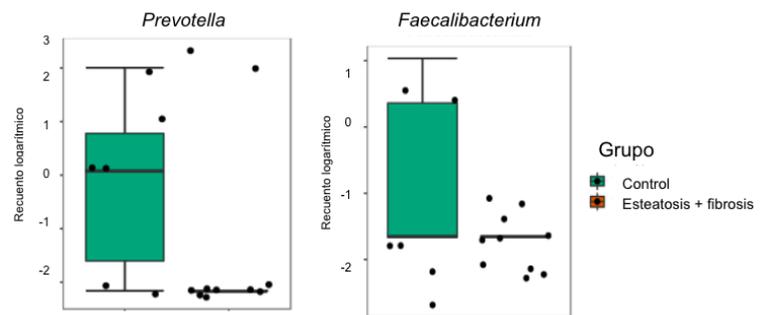
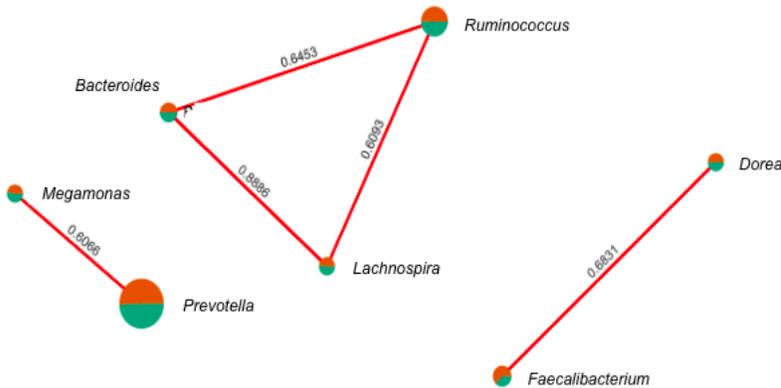
Mediante el análisis de correlación, se buscaron aquellos géneros y/o filos característicos de cada grupo y sus posibles correlaciones. En este tipo de analisis

las líneas de color rojo indican una correlación positiva en tanto que las azules una correlación negativa, el grosor de la línea indica una mayor fuerza de correlación, y sobre las líneas se indica el valor de la correlación. En la comparación de los grupos de PVVIH como grupo Control (color verde) vs. Esteatosis + Fibrosis (color rojo), se encontró abundancia de *Blautia* y *Prevotella* en ambos grupos, con una correlación negativa entre *Blautia* y *Prevotella*, y positiva con *Phascolactobacterium*, correlaciones que se repiten al analizar grupo Esteatosis vs. Esteatosis + Fibrosis. Finalmente al comparar el grupo de Fibrosis vs. Fibrosis + Esteatosis se observan correlaciones positivas entre *Faecalibacterium* con *Dorea*, *Prevotella* con *Megamonas* y una interesante red de correlaciones positivas entre los generos *Ruminococcus*, *Lachnospira* y *Bacteroides*, Figura 26.

Control vs Esteatosis + fibrosis



Fibrosis vs Esteatosis + fibrosis



Esteatosis vs Esteatosis + fibrosis

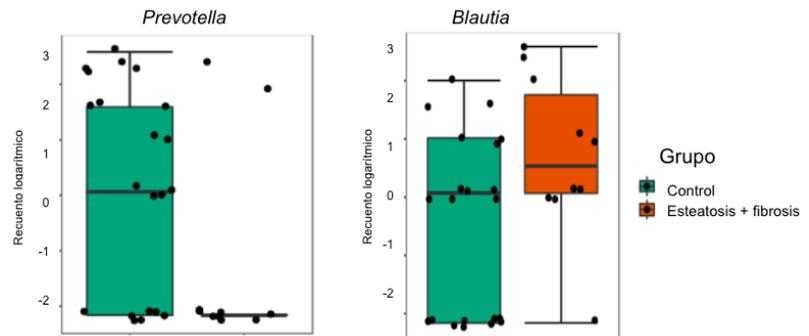
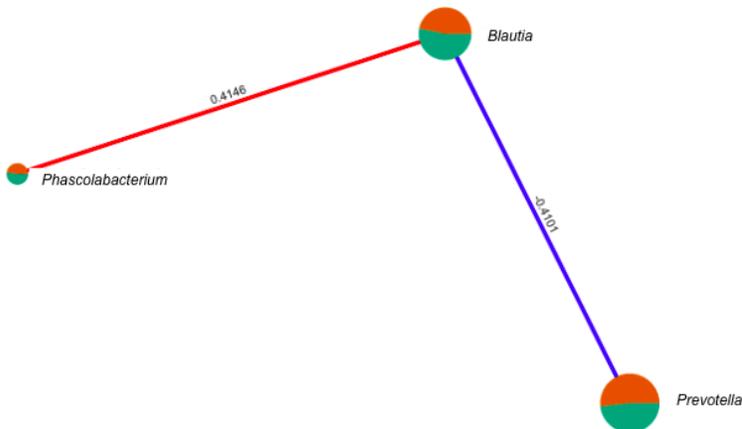


Figura 26. Redes de correlación de condición más relevantes presentes entre los diferentes grupos. En las gráficas de la derecha se representa el recuento logarítmico de los géneros bacterianos en el grupo Control (color verde) y el grupo de Esteatosis + Fibrosis (color naranja-rojo). En las redes de correlación las líneas de color rojo indican una correlación positiva en tanto que las azules una correlación negativa, el grosor de la línea indica una mayor fuerza de correlación, y sobre las líneas se indica el valor de la correlación.

Finalmente, en el intento de identificar posibles taxones como biomarcadores para las PVVIH y/o su tratamiento, se realizó un análisis de “bosque aleatorios”, (del inglés “*random forests*”) que realiza combinaciones aleatorias entre los mismos taxones no correlacionados y posteriormente los promedia. En la parte superior de la Figura 27 se representa a nivel Filo y la parte inferior género. En la izquierda de la figura se representan los grupos de estudio, al centro se considera la clasificación de grados ARFI y a la derecha el riesgo cardiovascular. En cada gráfico en el eje de las Y se encuentran los filios o géneros respectivamente. En el eje de las x se representa la escala numérica de correlación y a la derecha de cada gráfico los diferentes grupos de estudio, la clasificación de grados ARFI o bien el riesgo cardiovascular. Si los Filios o los géneros están más hacia la izquierda se considera un mejor biomarcador, así en la Figura 27, se esquematizan los resultados obtenidos más prometedores como biomarcadores.

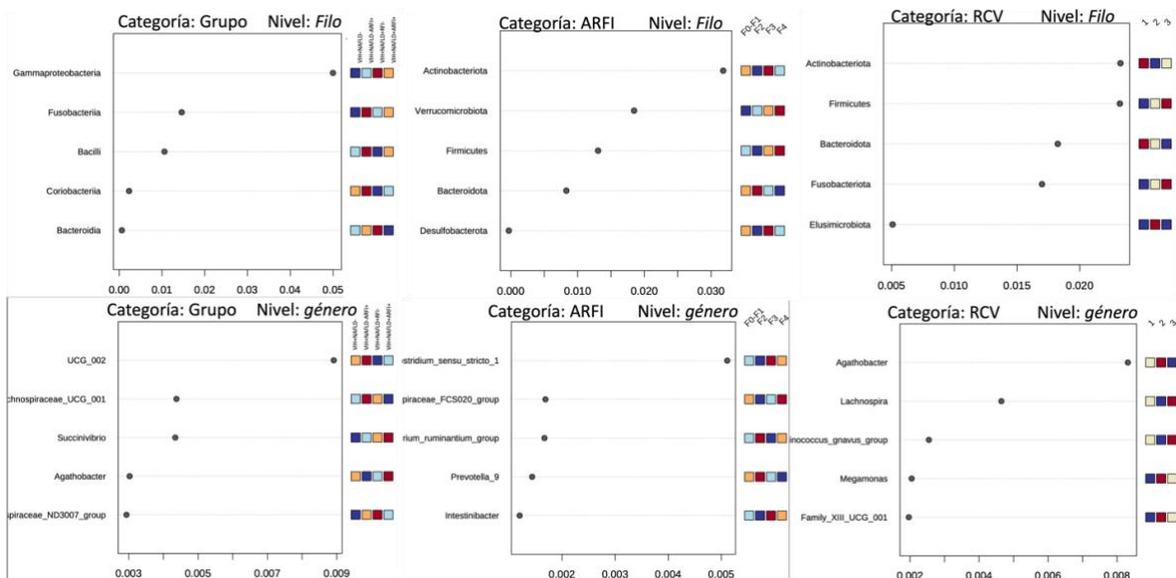


Figura 27. Taxones como biomarcadores candidatos para grupos. Mediante un análisis de “bosque aleatorios” o del inglés: “*random forests*”) el cual realiza un promedio de combinaciones aleatorias entre los mismos taxones no correlacionados. Se visualizan los resultados obtenidos más prometedores como biomarcadores a nivel de Filo y Género, considerando también los grados ARFI y Esteatosis.

- A nivel de Filo *Bacteroidia* fue característico del grupo Esteatosis, mientras que *Coriobacteriia* es propio del grupo con fibrosis, en tanto que a nivel de género *Agatobacter* fue característico de Fibrosis + Esteatosis.
- Considerando la clasificación por grados ARFI, a nivel de Filo *Desulfobacterota* y a nivel de género *Intestinibacter* podrían fungir como biomarcadores para aquellos pacientes con grados de fibrosis F3.
- Para riesgo cardiovascular, el filo *Elusimicrobia* y a nivel género, *Megamonas* así como *Family_XIII_UCG_001* se catalogarán como biomarcadores muy diferenciados en el riesgo moderado.

Con base en los resultados obtenidos derivados de la totalidad de las variables evaluadas, se observó que el grupo de Fibrosis presenta valores que le destacan estadísticamente de los otros grupos evaluados, de manera que este grupo queda definido por un predominio de *Prevotella* en el *Phylum* de *Bacteroidetes*, así como un incremento en la abundancia de *Firmicutes*. Aunado a esto, las variables sistémicas que caracterizaron a este grupo son IL-6, IL-18, Ox-LDL y Dímero D.

XXIV. DISCUSIÓN.

La prevalencia de NAFLD en nuestra población de estudio, definida como la presencia de esteatosis por ultrasonido con o sin fibrosis, fue de 50.84%. Estudios previos han demostrado una elevada prevalencia de NAFLD en PVVIH en comparación con la población no infectada, sin embargo, los porcentajes son variables de acuerdo a la localización geográfica y la técnica de diagnóstico utilizada. *Maurice & cols. (2017)* realizaron una revisión sistemática y metaanálisis, y reportaron una prevalencia de NAFLD en PVVIH del 35.32%, al realizar el diagnóstico por estudio de imagen. Sin embargo, posterior a un subanálisis con la confirmación histológica, la prevalencia aumentó hasta 41.7% (25).

En el estudio aquí presentado, todos las PVVIH fueron diagnosticadas con Síndrome Metabólico (MS) para su inclusión, y la presencia o ausencia de esteatosis se definió por USG, con un total de 60 pacientes con hallazgo positivo. Sin embargo, existe la limitante del estudio diagnóstico utilizado, ya que aunque el USG hepático es el método más accesible, económico y sencillo, su sensibilidad puede variar de acuerdo al grado de esteatosis, alcanzando hasta un 90% cuando la esteatosis es mayor al 20% (44).

La mayoría de los pacientes con NAFLD tienen esteatosis, sin embargo algunos progresan a fibrosis, por lo que identificar a este grupo es vital ya que estos pacientes son quienes tienen peor pronóstico y evolución de la enfermedad (45). A través de ARFI, se estimó el grado de fibrosis, encontrando 21 pacientes con fibrosis y esteatosis y 13 PVVIH con algún grado de fibrosis pero sin presencia de esteatosis. El grupo de *Pelusi & cols. (2019)*, describe la prevalencia y factores de riesgo para el desarrollo de fibrosis significativa (grados F3-F4) en ausencia de esteatosis, concluyendo que este hallazgo es más frecuente de lo estimado y que se encuentra muy asociado a la presencia del polimorfismo (I148M) en el gen *PNPLA3* el cual codifica para la lipasa Adiponutrina, la cual permite la hidrólisis de triglicéridos o acilglicéridos en los adipocitos; condición genética que podría explicar la presencia de fibrosis sin esteatosis en nuestro grupo (46). En el estudio de *Pelusi y cols.*, se describe también que al menos un tercio de los pacientes con fibrosis severa no tiene esteatosis y es más prevalente en la población con obesidad

morbida, ya que se encuentra íntimamente ligada a la presencia de resistencia a la insulina (46). En la población con fibrosis aquí presentada, solo el 15.38% se encontraba en obesidad y el 38.45% en fibrosis significativa.

Se presentaron diferencias significativas en el IMC (siendo más elevado en personas con esteatosis y fibrosis, seguido por el grupo de esteatosis); así como la circunferencia de cadera y cintura. Se ha descrito que el IMC es un factor asociado al desarrollo de enfermedad hepática y a la severidad de la misma. El IMC, así como las circunferencias de cintura y cadera, se consideran predictores independientes de riesgo cardiometabólico en PVVIH bajo TARV, así como de riesgo a ECV y DM2 en población general (47,48). Además respecto al IMC, se ha descrito que el ICC se considera un mejor predictor en el desarrollo de enfermedad hepática severa y de mayor utilidad clínica en el diagnóstico de NAFLD (49,50).

En un contexto de NAFLD, el IMC y la CC han sido asociados a IR, MS y hallazgos histológicos de esteatohepatitis y fibrosis (51).

Interesantemente, en PVVIH el ICC se asoció positivamente con el dímero D y la CC con el sCD36. Además, en PVVIH y aquellas con Esteatosis, el IMC se asoció también con el sCD36 y con el dímero D. En este sentido, y de acuerdo con nuestros resultados, se ha reportado que el IMC guarda relación con el sCD36, valores elevados de ALT y la adiposidad visceral en pacientes con NAFLD (52). Las correlaciones positivas observadas con marcadores de activación vascular como el dímero D y el sCD36 son de relevancia clínica ya que en PVVIH el dímero D, se considera un fuerte predictor de mortalidad, conclusión contundente derivada de ensayos clínicos multicéntricos con un número importante de participantes como el estudio SMART, ESPIRIT y el SILCATT(53). Además, en NAFLD se han descrito diversos trastornos de coagulación en los cuales, el dímero D es uno de los marcadores comúnmente implicados y relacionado a un riesgo incrementado de CVD, una de las principales causas de muerte en pacientes con NAFLD (54). Por otro lado, el sCD36 en condiciones patológicas incluidas la infección por VIH y NAFLD, se considera una molécula proaterogénica involucrada en eventos fisiológicos como hiperlipidemia, lipogénesis de novo, IR, MS y esteatosis hepática (42,55–57) Así, evaluaciones antropométricas fáciles de realizar, no invasivas, y sin

costo nos permiten evaluar la obesidad central y alertan al clínico en el sentido de un mayor riesgo al desarrollo de NAFLD, presencia de esteatosis, IR, DM2 así como un mayor riesgo a enfermedad aterosclerótica y CVD.

Al analizar las características clínicas de la infección por VIH, se presentó una diferencia significativa de manera puntual solo al comparar el grupo control de PVVIH vs. el grupo de PVVIH y Esteatosis presentando este último grupo el menor Nadir (111 cels/ μ L). Se ha reportado que un Nadir menor a 350 cels/ μ L se asocia al desarrollo de esteatosis (14). Además, en la revisión de *Bischoff & cols.* (2021), describen la asociación directa entre un Nadir de CD4⁺ inferior a 200 cels/ μ L y la progresión a esteatosis *de novo* en PVVIH (14). En general un bajo Nadir, se ha asociado a un mayor riesgo de anomalías lipídicas e hipertensión (58), disfunción endotelial (59), así como a la predicción de un evento disbiótico que conlleva a una inflamación sistémica, progresión de la enfermedad y desarrollo de patologías como NAFLD y sus complicaciones.

Al analizar los resultados de los laboratoriales generales se destacaron algunos parámetros clínicos en un contexto de VIH-NAFLD. En este sentido, se presentó una diferencia significativa en el conteo periférico de Leucocitos, Neutrófilos Totales así como de Linfocitos, siendo estos últimos, más elevados en el grupo de PVVIH con Esteatosis y Fibrosis. Los neutrófilos, infiltran al tejido hepático en situaciones patológicas. La esteatohepatitis no alcohólica, se caracteriza por infiltración de neutrófilos y regulación positiva de quimiocinas reguladoras de neutrófilos como la IL-8 y la CXCL1.

En la población que vive con VIH, la inflamación de bajo grado (aún en quienes se encuentran en supresión virológica), la translocación bacteriana intestinal y el proceso disbiótico se han asociado a los mecanismos patogénicos de NAFLD. El estado inflamatorio es una constante en la progresión de NAFLD, y se caracteriza por la activación de células hepáticas, el reclutamiento de células inflamatorias circulantes y la regulación positiva de mediadores inflamatorios (60,61). En este sentido, se encontraron diferencias significativas respecto a la IL-6 e IL-18 al comparar los cuatro grupos de estudio, siendo más elevadas las concentraciones en el grupo de fibrosis. Adicionalmente, la IL-8 tiene una elevación significativa en

el grupo control de PVVIH, y al ser la citocina quimioatrayente de los neutrófilos por excelencia y con el reconocimiento de la participación de los neutrófilos en la progresión de fibrosis hepática, ya que junto con las células estelares hepáticas (activadas por IL-17), promueven la liberación de factor transformante beta (TGF- β), resulta en depósito de colágeno tipo I y eventual desarrollo de fibrosis (62). Adicionalmente, en el grupo control, la IL-18 mostro una correlación positiva con la IL-6, ambas citocinas, consideradas inflamatorias y profibrogenicas por lo que su trabajo sinérgico puede ser relevante en la progresión de fibrosis.

La IL-18 fue una de las citocinas de mayor relevancia en nuestro estudio, la concentración más elevada se encontró en el grupo con fibrosis, mismo que presentó el nadir de linfocitos T CD4⁺ mas bajo, esta correlación negativa fue reportada en el estudio desarrollado por *Veenhuis & col.* (2017) (63). Recientemente, el rol del inflamasoma se ha relacionado a la progresión de NAFLD al modular la respuesta inflamatoria, ya que los componentes del inflamasoma se requieren para el desarrollo de fibrosis con la producción de IL-1 β e IL-18, las cuales participan en el establecimiento de un ambiente proinflamatorio y profibrótico (64). Por otro lado, la IL-18 se ha considerado un determinante sérico para poder definir la presencia o ausencia de esteatosis, y ademas, se correlaciona con los niveles de ALT, AST, GGT, Trigliceridos y hs-CRP (65). Sin embargo, otros estudios han reportado que la IL-18 podría no estar involucrada en la patogénesis de NASH o síndrome metabólico en ausencia de factores de riesgo (obesidad mórbida, DM2 e hipertensión) (66). Interesantemente, en nuestro trabajo encontramos una correlacion positiva de IL-18 con la hs-CRP y con la ALT en el grupo con fibrosis y en el grupo control; correlaciones que evidentemente inican la presencia de inflamación y daño hepático en estos pacientes.

Los eventos celulares que caracterizan a NAFLD (IR, el exceso de ácidos grasos intracelulares, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial), colaboran para asentar un proceso inflamatorio local y sistémico que conlleva a la liberación de mediadores como la IL-6, citocina relacionada con el desarrollo de IR, estrés oxidativo, inflamación hepática, necrosis celular, apoptosis y fibrosis (60). En hígado, IL-6 aumenta la concentración de reactantes de fase aguda como la PCR

favoreciendo el mecanismo de daño hepático. En la infección por VIH la PCR se ha considerado un marcador de progresión y es asociada con el mecanismo de traslocación bacteriana y activación inmune. En PVVIH concentraciones de 3.3 mg/dL se han asociado al riesgo, de hasta 8 veces más, de padecer CVD, sin embargo esta relación no es contundente, ya que existen estudios que no han encontrado dicha asociación (67). Se han demostrado que niveles elevados de PCR son un fuerte predictor de NAFLD por lo que se ha postulado como un marcador no invasivo que denota la presencia de la enfermedad (68). En este sentido las concentraciones en nuestros grupos con esteatosis o fibrosis presentaron niveles significativamente elevados con rangos desde 2.9 mg/dL y hasta 8.36 mg/dL. Los niveles de PCR se han correlacionado con el grado de fibrosis hepática, en tanto que esa concentración es menor con grados leves de fibrosis, sin embargo, hay estudios que argumentan resultados variables, en los que los niveles de PCR no se consideran un buen predictor de fibrosis severa (69,70). En este sentido, lo más recomendable es considerar diversos biomarcadores que en conjunto nos puedan predecir la progresión de la enfermedad y nos ayuden a definir los eventos celulares y de daño tisular en los diferentes espectros de la enfermedad (71). Considerando el punto de corte de 3.3 mg/dL como un valor de riesgo, resulta evidente la necesidad de un manejo clínico integral y de precisión a estos pacientes con la finalidad de evitar la progresión de una CVD.

La ALT, AST y la GGT son enzimas hepáticas útiles para evaluar la funcionalidad hepática y son consideradas marcadores subrogados de daño hepático. Diversos estudios han demostrado su elevación en PVVIH, derivado del uso crónico del TARV, en correlación con la carga viral y además en presencia de NASH (72,73).

En NAFLD, las elevaciones de ALT han sido bien documentadas, sin embargo, un porcentaje del 40 al 79% de personas con NAFLD tienden a mostrar niveles normales de ALT, condición que se observa en algunos de nuestros pacientes en quienes existe una condición de esteatosis y fibrosis bien definida (74). En este sentido, concentraciones normales (por debajo de las 35 UI/L) o elevadas se han considerado de riesgo al desarrollo de NAFLD de hasta 2.7 veces (75,76). Se ha propuesto un punto de corte al riesgo de NAFLD de entre 19 UI/L y 30 UI/L para

mujeres y hombres respectivamente, sin embargo, 40 UI/L es el punto de corte más utilizado en el área clínica (75). Concentraciones de ALT > 40 UI/mL como un factor de riesgo a NAFLD, es consistente con nuestros resultados, ya que en el grupo de Esteatosis así como en el de Esteatosis más Fibrosis, cuando solo se consideran aquellas personas con Esteatosis Severa, la mediana de ALT es de 46 UI/L correlacionando este valor, evidentemente con el grado de severidad de esteatosis. Adicionalmente, el ratio AST/ALT se considera un índice independiente para predecir la presencia de fibrosis hepática y forma parte de diferentes paneles como el NAFLD Fibrosis Score, ScoreBARD, entre otros (75). Se ha propuesto un ratio AST/ALT con un punto de corte de 0.87, como un valor de predicción a fibrosis severa y/o cirrosis (77), en este sentido, el grupo de Fibrosis de nuestro estudio tiene un ratio de 0.93, por lo que esta relación y punto de corte se pueden considerar de valor pronóstico en nuestra población.

En relación a la GGT en PVVIH, esta enzima ha sido asociada con enfermedades cardiometabólicas y CVD (78). Un estudio previo de nuestro grupo de trabajo, demostró que las concentraciones de GGT se asocian con la Rígidez Arterial (VOPcf), considerado un marcador predictivo bien establecido de morbimortalidad en CVD (79). En un contexto de NAFLD, se ha documentado que niveles elevados de GGT son predictores de daño hepático y fibrosis avanzada con un punto de corte de 96.5 UI/L (80). Además, la GGT se correlaciona positivamente con los valores de la Escala de Framingham (81), y en un escenario de NAFLD también se asocia con el índice HOMA-IR (82). Con base en nuestros resultados, se observa una diferencia significativa en los niveles de GGT, y se observó además que las concentraciones más elevadas se presentan en los grupos de Esteatosis y Esteatosis más Fibrosis con valores de 40 IU/L y 46 IU/L; respectivamente, lo que nos indica un riesgo elevado de CVD y eventos cardiovasculares fatales. Interesantemente, observamos que las concentraciones de GGT guardan una correlación positiva con la Escala de Framingham y con el índice HOMA-IR, documentándose para este último índice, un punto de corte ≥ 3.0 (aunado a otros parámetros) un alcance de sensibilidad del 94% y una especificidad del 74% para

predecir el diagnóstico de NASH (27). De relevancia clínica, valores de HOMA-IR ≥ 3.0 se presentaron en personas con Esteatosis de severidad o USG grado 2 y 3. NAFLD es una enfermedad asociada con una diversidad de comorbilidades extrahepáticas y que guarda relación con morbi mortalidad cardiovascular. Ha sido documentado que, en personas con enfermedad hepática de cualquier etiología son comunes ciertos desordenes de coagulación (83). Aunado a esto, la infección por VIH se relaciona a una disfunción endotelial, daño y alteración en la síntesis hepática de proteínas relacionadas a la coagulación como fibrinógeno, trombina y los factores V, VII, IX y X. Finalmente, la modificación postraducciona l de los factores de la coagulación también tiene lugar en los hepatocitos, por lo que, en el contexto de lesión y enfermedad hepática, su función puede cambiar cuantitativa y cualitativamente (83). En nuestros grupos de estudio se demostró una diferencia significativa en relación a las concentraciones séricas de fibrinógeno, el cual, a pesar de no mostrar valores fuera del rango de referencia, se encuentra en mayor concentración en PVVIH con esteatosis y fibrosis (434.5 mg/dL), y en el grupo de esteatosis y fibrosis tras considerar solo a los participantes con fibrosis severa (F4) (454 mg/dL), concentraciones que resultan significativamente elevadas respecto al grupo control de PVVIH (405.5 mg/dL). En el contexto de infección por VIH, han sido reportados niveles elevados de fibrinógeno asociados al TARV sobre todo al uso de IP, donde también generan un incremento en la adiposidad y depósitos regionales de grasa (84) y moléculas como el dímero D.

Los resultados de nuestro estudio nos indican que los participantes de todos los grupos tienen concentraciones de dímero D dentro del rango de normalidad y no se observan diferencias significativas al comparar los 4 grupos. Sin embargo la concentración más elevada la observamos en el grupo de fibrosis (213.4 ng/mL) e interesantemente, cuando se realiza un sub-análisis considerando el grupo de esteatosis más fibrosis incluyendo solo aquellos con fibrosis severa (F4), se observa un aumento significativo respecto al grupo control (152.7 ng/mL vs. 221.6 ng/mL; $p=0.03$); lo que indica, que el dímero D esta jugando un papel importante en el proceso fibrótico y nos habla además de pacientes que eventualmente podrían desarrollar eventos trombóticos. Es de relevancia clínica mencionar que el estudio

Strategies for the Management of Antiretroviral Therapy (SMART) informó que el nivel plasmático de dímero D, es el mejor predictor de morbilidad y eventos trombóticos en PVVIH, y se ha correlacionado también con disfunción endotelial, translocación bacteriana y la carga viral (85)

Al realizar las correlaciones entre las variables de interés, los niveles de dímero D tuvieron correlaciones positivas con el ICC ($r=0.36$ $p=0.012$) en el grupo control, y con el IMC ($r=0.43$ $p=0.006$), y la PCR ($r=0.37$ $p=0.025$) en el grupo de esteatosis. En este sentido, las correlaciones del dímero D con las medidas antropométricas como el ICC, el IMC son sugerentes de un incremento al riesgo de CVD; destacando además, la importante contribución de la adiposidad abdominal en el desarrollo de desordenes de la coagulación e incremento al riesgo de eventos cardiovasculares relacionados a la infección por VIH y NAFLD (86,87). La correlación con la PCR además de enfatizar una tendencia a eventos trombóticos y riesgo a CVD, refleja la severidad de la inflamación y daño hepático en PVVIH y esteatosis (88,89).

El estrés oxidativo se manifiesta a través de la generación excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que resulta en la oxidación de partículas como el LDL, dando lugar a Ox-LDL, forma lipídica asociada al desarrollo de aterosclerosis y CVD. En PVVIH se han reportado niveles elevados de Ox-LDL a nivel sérico y a nivel de expresión proteica en monocitos, células en las cuales se correlaciona con la expresión de marcadores de activación. Interesantemente, se ha documentado que la estimulación *in vitro* con Ox-LDL pero no con LDL resulta en la expansión de monocitos inflamatorios (90), y con una elevada secreción de citocinas del inflammasoma como la IL-1 β e IL-8, eventos asociados a IR en PVVIH (91).

En un estudio con tejido hepático derivado de personas con NAFLD, se observó una acumulación de Ox-LDL y colesterol en la pared de la vena porta, lo que se asoció a la formación de placa aterosclerótica, deformación del endotelio e inflamación de la vena porta; evento inflamatorio que se caracteriza por la presencia de células de Kupffer e IL-1 β (41). Por otro lado, en un modelo murino de intervención, se alimentó a ratones con una dieta alta en grasa y suplementada con Ox-LDL tras lo cual, fue evidente el desarrollo NASH, remarcando el papel importante de esta molécula en su patogénesis (92). En nuestro estudio fue evidente y significativa la

correlación del Ox-LDL con la severidad del grado de esteatosis. Además, es relevante destacar la correlación positiva que se observa con el dímero D en el grupo Control de PVVIH y con la PCR en el grupo de Esteatosis, siendo el dímero D y la PCR, moléculas que juegan un papel fundamental en el desarrollo y progresión de eventos cardiovasculares y son consideradas predictores independientes de mortalidad en PVVIH. Finalmente, una correlación interesante en el grupo de esteatosis es la que guarda el Ox-LDL con la HbA1c ($r= 0.41$ $p=0.027$), correlación que ha sido previamente reportada en personas no diabéticas con mayor riesgo de desarrollar DM o CVD (93). En personas diabéticas, además se observó una elevada tendencia del LDL a llevar a cabo peroxidación lipídica contribuyendo a un incremento en los niveles de HbA1c, por lo que la glicación de la hemoglobina contribuye a enfermedades vasculares (94).

Ox-LDL se une a receptores “*scavenger* o basureros” como el CD36 (95), una proteína transmembrana altamente glucosilada. CD36 también es denominada translocasa de ácidos grasos (FAT, por sus siglas en inglés), y es un receptor *scavenger* multifuncional presente en diversos tipos celulares aunque también se ha identificado una forma soluble (sCD36) y sus niveles guardan relación con su expresión a nivel tisular, de manera que es una molécula involucrada en el papel que juegan los monocitos/macrófagos y adipocitos en MS, IR, DM2, obesidad y aterosclerosis. Derivado de nuestros resultados, no se observaron diferencias significativas en las concentraciones séricas del sCD36, sin embargo, las concentraciones que se observan en todos los grupos son elevadas respecto a lo que se ha reportado en personas sanas de población mexicana: 32.3 ng/mL en promedio (96); en este sentido, la concentración más baja se observa en el grupo de fibrosis con 47.76 ng/mL; llegando a cuadruplicarse las concentraciones en los demás grupos respecto a la concentración en personas sanas.

En condiciones fisiológicas, la expresión de CD36 en los hepatocitos es baja, sin embargo es inducible en respuesta a la sobrecarga lipídica en un evento de esteatosis o bajo los efectos del Factor Inducible de Hipoxia (HIF) (55). En presencia de insulina a nivel hepático, el CD36 es activado y adquiere la capacidad de inducir lipogénesis *de novo* (56). En NAFLD, los niveles circulantes de sCD36 se han

reportado elevados y se correlacionan con el grado histológico de esteatosis hepática (las concentraciones más elevadas en nuestro estudio se observaron en esteatosis avanzada, grado 2 y 3) lo que guarda una relación directa con la función bien descrita para el sCD36 en función de incrementar el consumo hepático de acilglicéridos lo que contribuye a la progresión a NASH (42,55). En NAFLD, también se ha descrito que su expresión guarda relación con el índice de grasa hepática y con otros marcadores de daño hepático como AST, ALT o GGT en personas con tolerancia alterada de glucosa, DM2, con el IMC y grado de adipocidad visceral (55) (52). Las evidencias anteriores, podrían direccionarse a considerar el sCD36 como un potencial biomarcador no invasivo, de valor pronóstico y respuesta a tratamiento de la severidad de esteatosis (55).

Entre las funciones del sCD36, se ha descrito regulación de la autofagia y la secreción de moléculas como el VLDL, lipoproteína que presento una diferencia significativa presentandose los niveles más elevados en personas con Esteatosis y Esteatosis más Fibrosis. La infección por VIH y el uso crónico del TARV son asociados con una desregulación en la distribución de grasa corporal lo que se reconoce como lipodistrofia, dislipidemia, IR y DM2 (16). Además en esta condición, una disminución del colesterol HDL, así como de la apolipoproteína apo-A1 y el incremento en los niveles de triglicéridos se han postulado como marcadores de progresión de la enfermedad (97). Por otro lado, la acumulación de lípidos en hígado es uno de los principales sellos de NAFLD. Las anomalías en el metabolismo de las lipoproteínas, acompañado de un evento inflamatorio crónico, parecen ser las vías centrales para el desarrollo de NAFLD y CVD (98).

En relación al perfil lipídico evaluado en los participantes del estudio, es evidente en todos los grupos, una alteración en el metabolismo lipídico, desde que presentan niveles bajos de HDL, cursan con hipertrigliceridemia y niveles elevados de colesterol LDL. Se ha descrito que en NAFLD, la acumulación de grasa hepática es resultado de diversos fenómenos como: una mayor liberación ácidos grasos libres al hígado, un aumento en la lipogénesis de novo (resultado de la sobre-regulación genética en respuesta a la hiperinsulinemia) y disminución de la exportación de triglicéridos a través del VLDL, así como de la reducción de la beta-oxidación de los

ácidos grasos. Los pacientes con NAFLD tienen IR, lo que induce un aumento de la lipólisis del tejido adiposo y liberación de ácidos grasos que son entregados al hígado, contribuyendo evidentemente a la presencia de esteatosis, aumentando el almacenamiento de triglicéridos y en consecuencia un aumento en la peroxidación lipídica y producción de citocinas pro-inflamatorias (28). La secreción del VLDL no solo depende de la disponibilidad de triglicéridos a nivel hepático, si no también de la capacidad celular para el ensamblaje de esta lipoproteína, mecanismo en el cual la insulina es clave ya que regula negativamente este proceso. Particularmente, NAFLD es caracterizado por una sobreproducción de VLDL lo que evidentemente refleja actividad de la lipogénesis de novo y lipólisis intrahepática e intraabdominal ya que la insulina actúa sobre la Lipasa Sensible a Hormonas (LSH) favoreciendo el proceso. En esta condición, la disponibilidad lipídica para el ensamble del VLDL se aumenta y se combina con la falla de la insulina para suprimir la formación de las partículas de VLDL. En consecuencia, los pacientes con NAFLD presentan hipertriglicéridemia y a pesar de que este fenómeno refleja una salida activa de triglicéridos hepáticos vía VLDL, a nivel tisular se perpetúa la concentración de triglicéridos a nivel hepático (99).

En PVVIH, la alteración en el metabolismo lipídico, su acumulación hepática y el desbalance en el perfil de moléculas pro y anti-inflamatorias con efecto hepático, que contribuyen al desarrollo de NAFLD y su progresión a NASH, es resultado de la interacción de diversos factores como la predisposición genética, IR, la dieta, y la disbiosis intestinal; este último factor ha tomado relevancia en diversos estudios *in vivo* e *in vitro*, se le ha reconocido su importante papel en la patogénesis de la infección por VIH así como en NAFLD (100). Con base en lo anterior, fue de nuestro interés caracterizar la microbiota intestinal en nuestros diferentes grupos de estudio. El primer objetivo fue evaluar la diversidad o riqueza microbiana en cada una de las muestras evaluadas, por lo que a través del análisis de alfa-diversidad se estimó la riqueza de especies según los índices de Shannon y Chao1 los cuales indicaron que no hay diferencias significativas en la diversidad o riqueza de las especies microbianas presentes en cada una de las muestras analizadas que conforman los diferentes grupos. En cuanto a las diferencias en la composición microbiana entre

los diferentes grupos de estudio, se realizó un análisis de beta-diversidad a través de los índices de Bray Curtis, el índice cualitativo de Jaccard y la divergencia de Jensen-Shannon. Nuestros resultados indicaron la presencia de 3 enterotipos o géneros predominantes: *Bacteroides* en un 5%, *Firmicutes* en un 15%, y un marcado predominio de *Prevotella* caracterizando al 80% de las muestras. El aumento de *Prevotella* asociado a la disminución del género *Bacteroides* que se observa en nuestro estudio, ha sido previamente reportado en un contexto de infección por VIH en Hombres que tienen Sexo con Hombres (HSH). Además, en PVVIH naive con infección crónica, también es un perfil reportado en pacientes con enfermedad hepática crónica (101–103). En personas sin infección por VIH y con NASH, se ha descrito una relación invertida a nuestro estudio, es decir, elevada abundancia de *Bacteroides* y baja abundancia de *Prevotella* (104).

Respecto al predominio de *Prevotella*, su abundancia se ha reportado en grupos control de población mexicana por lo que existe la posibilidad de que este género sea característico de nuestra población, sin tener una relación directa con la presencia de VIH o con la preferencia sexual (105). El enterotipo *Prevotella*, es caracterizado por la abundancia del género *Prevotella*, y su abundancia se relaciona con dietas de bajo consumo de productos de origen animal y elevado consumo de carbohidratos y fibra (106), en tanto que *Bacteroides* es asociado con un elevado consumo de proteínas y grasa. Por otro lado, la abundancia de *Prevotella* se ha asociado a estados inflamatorios crónicos, como enfermedades autoinmunes entre ellas artritis reumatoide (107) y obesidad (108). Además, se ha demostrado su correlación positiva con el IMC y resistencia a la insulina (109,110). *Prevotella copri*, se ha relacionado a un efecto inflamatorio, estudios *in vitro*, han demostrado su capacidad para estimular la producción de citocinas (IL-6, IL-23 e IL-17); además, es una de las principales especies bacterianas asociadas a fibrosis avanzada en NAFLD (111–113). En este sentido, en el análisis de abundancia de cada enterotipo por grupo, fue evidente el predominio de *Prevotella* en el 81% de los casos con esteatosis y en el 60% de los casos con esteatosis y fibrosis. De los 6 casos que conformaron el grupo de fibrosis, 5 de ellos se clasificaron como *Prevotella*, y solo 1 como *Bacteroides*. Considerando la abundancia relativa, el género *Bacteroides*

está presente hasta en un 6% del grupo control, y en un 4% en los grupos de fibrosis y esteatosis más fibrosis.

Aunado al efecto inflamatorio que se atribuye a *Prevotella copri* y *Bacteroides vulgatus*, estas especies microbianas se han correlacionado a IR y biosíntesis de BCAAs, metabolitos aumentados en personas con IR. Esta evidencia, se fortalece con un estudio *in vitro* con ratones, en donde se demostró que *P. copri* tiene la capacidad de inducir IR, agravando la intolerancia a la glucosa y aumentando los niveles circulantes de BCAAs (110). En relación a los BCAAs, en este estudio se evaluaron únicamente en el grupo control de PVVIH y en el de PVVIH y esteatosis, nuestros resultados indican que la valina, leucina e isoleucina se encuentran dentro del rango de referencia del laboratorio. Sin embargo, de manera interesante al comparar nuestros resultados con publicaciones previas de pacientes con NAFLD, fibrosis con y sin obesidad, y presencia de NAFLD y fibrosis (estudios en los cuales se considero un grupo control de personas sanas), es evidente el aumento en los niveles de los BCAAs en nuestros grupos de estudio. Así, las concentraciones de valina en PVVIH y PVVIH con esteatosis fueron de 234 y 170 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente vs. 117 $\mu\text{mol/L}$ en personas sanas; en el caso de la isoleucina de 80 y 54 $\mu\text{mol/L}$ vs. 56.2 $\mu\text{mol/L}$ en personas sanas; en el caso de la leucina de 160 y 120 $\mu\text{mol/L}$ vs. 102 en personas sanas (114,115). El mecanismo que da lugar al aumento de BCAAs en NAFLD se desconoce, sin embargo, se hipotetiza que se puede relacionar con un aumento en el catabolismo proteico, obesidad, IR o una disminución en el metabolismo tisular. El aumento de BCAAs en NAFLD podría indicar una disminución en su catabolismo a nivel muscular, ya que los BCAAs son metabolizados principalmente en músculo esquelético y riñones, en donde reaccionan con el α -cetoglutarato y son convertidos a glutamina por transaminación (115). Se ha postulado, que la presencia de leucina e insulina resultan en una hiperactivación de factor mTORC-1, el cual induce la fosforilación de residuos de serina de los factores IRS-1 e IRS-2, lo que interfiere con la señalización y que da lugar a un redireccionamiento del IRS-1 a degradación proteosomal y en consecuencia IR. Aunado a esto, se ha descrito que un metabolismo anormal de los BCAAs en obesidad resulta en la acumulación de metabolitos tóxicos, dando lugar

a disfunción y estrés mitocondrial, asociados a IR y DM2 (116). En este sentido, es interesante remarcar que los grupos esteatosis y esteatosis más fibrosis tienen una mayor concentración sérica de insulina y un índice HOMA-IR más alto. En relación a la valina, en un modelo animal se ha reportado que una dieta rica en valina por mucho tiempo aceleró el desarrollo de NAFLD al promover la lipogénesis e inhibir la oxidación de ácidos grasos, aumentó el estrés oxidativo, el estrés del RE y la respuesta inflamatoria (117). La valina un aminoácido gluconeogénico que puede entrar en ciclo de Krebs para la producción de energía en forma de ATP cuando el acetil-CoA escasea, razón por la cual en ciertas condiciones metabólicas disminuye su concentración, adicionalmente se ha reportado que niveles bajos de valina se relacionan al aumento en las concentraciones de insulina (118). Con base a lo anterior, se reconocen en este punto dos limitaciones importantes en nuestro estudio, la primera es la profundidad del análisis bioinformático para describir la microbiota intestinal hasta especie recordando que *P. copri* es importante en la biosíntesis de BCAAs y por otro lado, haber prescindido de la evaluación de la concentración plasmática de los BCAAs en cada uno de los grupos y de manera individual, en el sentido de poder establecer conclusiones contundentes con relación a los niveles de insulina y otros parámetros. Hasta ahora, solo podríamos especular que en el caso particular del grupo de esteatosis, la abundancia del enterotipo *Prevotella* (80%) podría guardar una relación con el aumento en las concentraciones plasmáticas de los BCAAs como valina y leucina.

Otro hallazgo importante de nuestro estudio es la presencia del enterotipo *Firmicutes* en el 15% del análisis de beta-diversidad, además mediante la prueba PERMANOVA, la abundancia de *Firmicutes* fue de 90% de las muestras analizadas, en tanto que el 10% quedó representado por *Prevotella*. Sin embargo, en el análisis por grupos, el predominio del enterotipo *Firmicutes* solo se encontró en el grupo control de PVVIH (87%) respecto a *Prevotella* (13%). El ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* es un parámetro importante al evaluar la microbiota intestinal, ya que se ve afectado significativamente con el uso de antibióticos, componentes de la dieta y situaciones patológicas. El incremento en la proporción de *Firmicutes* y disminución de *Bacteroidetes* en PVVIH se ha reportado

previamente como un marcador de disbiosis intestinal, evento caracterizado por una disminución en la riqueza, diversidad microbiana o alfa-diversidad, y es asociada a la infección por VIH (35,119). Por otro lado, el aumento de *Firmicutes* es una de las principales características de la disbiosis intestinal asociada a obesidad (120,121). El papel de la disbiosis intestinal en obesidad, se basa en la capacidad de la microbiota intestinal (ciertos miembros del filo *Firmicutes*) de extraer energía de la dieta, lo que se traduce en un aumento de masa grasa, ganancia de peso y desarrollo de IR, eventos precedentes y característicos de NAFLD (122). A los efectos negativos de algunos miembros de *Firmicutes* se suman, un efecto proinflamatorio al correlacionar la abundancia de este filo con las concentraciones séricas de algunas citocinas como TNF- α , y la presencia de especies patogénicas como *Clostridium perfringens* causante de infecciones gastrointestinales, frecuentes en PVVIH (123).

Por otro lado, se ha reportado que diversos miembros del filo *Firmicutes* como *Faecalibacterium*, *Eubacterium*, *Roseburia*, y *Anaerostipes* (este último, presente en el grupo de fibrosis, esteatosis y grupo control), tienen la capacidad de escindir carbohidratos que no pueden ser digeridos enzimáticamente y en consecuencia, se consideran buenos productores de metabolitos como ácidos grasos de cadena corta (SCFAs), principalmente butirato. El butirato, se considera una molécula relacionada a la preservación de un estado saludable ya que se ha documentado que incrementa la sensibilidad a la insulina, tienen un efecto anti-inflamatorio, regula el metabolismo energético e incrementan la expresión de leptina (124).

La abundancia de *Prevotella* y disminución de *Bacteroides* que observamos en nuestro estudio, es uno de los principales enterotipos asociados a la infección por VIH (125). Por otro lado, la presencia de *Bacteroides* se ha asociado de manera independiente con la presencia de NASH (45). En nuestro estudio, observamos que el filo *Bacteroidetes* forma parte de los 3 enterotipos presentes con solo el 5% de representatividad derivado del análisis de beta-diversidad. En tanto que, en el análisis por grupo, el género *Bacteroides* representa el 10% en el grupo esteatosis más fibrosis, el 5% en el grupo esteatosis y solo un caso del grupo de fibrosis, sin tener presencia en el grupo control de PVVIH. Los *Bacteroidetes* son productores

de acetato y propionato. El propionato en colón, estimula la liberación de péptidos como GLP-1 y PYY, lo que resulta en la inhibición del apetito. Además, al alcanzar la circulación portal, el propionato puede ser capturado por el hígado y participar en la gluconeogénesis hepática y reducción de la expresión de enzimas involucradas en la síntesis de *novo* de ácidos grasos y colesterol (124). Derivado del análisis de los SCFAs evaluados en heces de los participantes en este estudio, se observó un aumento significativo en la concentración de propionato en el grupo de esteatosis en relación al grupo control. En un estudio de intervención, la suplementación con propionato no tuvo efectos en la reducción del colesterol total sin embargo se observó que induce un aumento en el nivel de colesterol HDL e interesantemente también aumenta los niveles de triglicéridos. Este estudio también demuestra que disminuye la concentración sérica de la glucosa en ayuno y mejora la sensibilidad a la insulina (126). Finalmente, también se ha sugerido que aunado a su efecto de inhibir la lipogénesis *de novo* es capaz de inducir la síntesis de ácidos grasos de número impar de átomos de carbono (127). En este sentido, la concentración elevada de propionato en el grupo de esteatosis puede reflejar un intento de homeostasis en relación a las condiciones metabólicas características de un evento de esteatosis hepática. En relación al acetato, este también es capaz de alcanzar la circulación sistémica y órganos periféricos como el tejido adiposo, músculo y SNC. En el hígado, el acetato estimula la síntesis hepática de lípidos, contribuyendo a dislipidemia; en SNC activa el sistema nervioso parasimpático promoviendo la secreción de insulina y grelina, eventos que resultan en un aumento en el almacenamiento de grasa y apetito que contribuye a obesidad, por lo que el acetato es considerado el SCFA más obesogénico (124).

Considerando la abundancia relativa a nivel de filo, encontramos un predominio de *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, seguido por *Proteobacteria*. *Proteobacteria*, en la infección por VIH se ha sido asociado fuertemente a translocación bacteriana y presencia de productos bacterianos como LPS a nivel sistémico, evento que induce una activación inmune persistente e inflamación crónica. En esta línea, pero en un contexto de NAFLD, a *Proteobacteria* se le ha considerado un fuerte inductor de NAFLD derivado del efecto endotoxémico que se le atribuye (128).

A nivel de género, se marco la presencia de *Prevotella*, *Blautia* (presente en todos los grupos), *Faecalibacterium* (presente en el grupo de fibrosis y esteatosis), *Ruminococcus* (presente en todos los grupos) y *Succinivibrio* (presente en el grupo de esteatosis y esteatosis más fibrosis). La abundancia de miembros de la familia *Lachnospiraceae* entre ellos los géneros *Blautia* y *Dorea* (este último, presente en el grupo control de PVVIH), en un contexto de VIH es contradictoria (129–131). En estudios en donde se ha considerado relevante la abundancia de estos géneros, se ha observado que *Blautia* esta enriquecido en aquellas PVVIH que reconstituyen inmunológicamente (IR) *versus* aquellos que no logran reconstituir (INR), en tanto que la abundancia de *Roseburia* y *Blautia* se han asociado negativamente con el Nadir de LT CD4⁺ y asociado positivamente con células senescentes LT CD8⁺ CD57⁺ (132). Por otro lado, el enriquecimiento de *Blautia* así como de *Anaerostipes* (este último, presente en el grupo de Fibrosis y Esteatosis) se ha reportado en pacientes naive, y se ha ligado a la activación inmune celular en estos pacientes. Interesantemente, en controladores de Elite, se ha demostrado la depleción de *Blautia* y *Anaerostipes* aunado a un aumento de géneros como *Succinivibrio*, *Sutterella*, *Rhizobium*, *Delftia*, *Anaerofilum* y *Oscillospira* (131,133,134).

En el contexto de NAFLD, también se ha reportado un enriquecimiento de miembros de la familia *Lachnospiraceae*, cuya abundancia, se mantiene en pacientes con NASH, condición en la que también se evidencia un aumento de *Dorea* y *Ruminococcus*, este último, es abundante en enfermedad hepática con fibrosis avanzada (135–137). Sin embargo, otros grupos de estudio han demostrado una disminución en la abundancia de las familias: *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae*, con una marcada reducción de los géneros *Blautia* y *Faecalibacterium* en pacientes con NAFLD (138). El género *Blautia*, figura como una especie microbiana con el potencial de mejorar enfermedades relacionadas a síndrome metabólico, se ha documentado su poca abundancia en adultos diabéticos y se asocia negativamente con la adipocidad visceral, al contrario de *Firmicutes* con una fuerte asociación positiva. Además, *Blautia* muestra un efecto antiinflamatorio en niños con peso saludable, y se asocia con el mantenimiento de

un fenotipo metabólicamente saludable (139,140). Por otro lado, estos géneros son considerados buenos productores de SCFAs, *Blautia* en particular, es capaz de producir acetato y butirato (129,141).

El enterotipo *Bacteroides* se asocia con la presencia de NASH, en tanto que *Ruminococcus* y *Lactobacillus* se asocian con la presencia de fibrosis moderada a severa ($F \geq 2$) (104). Ambos géneros presentes en el grupo de fibrosis y *Ruminococcus* solo esta presente en pacientes con esteatosis más fibrosis. Dentro del genero *Ruminococcus*, hay especies relacionadas a un efecto benéfico como es el caso de *R. bromii*, sin embargo, hay algunas especies como *R. gnavus* y *R. torques* más relacionadas a un efecto pro-inflamatorio (142). Los *Ruminococcus* tienen la capacidad de fermentar carbohidratos complejos como celulosa, pectina y son productores de acetato y propionato (104). Interesantemente, en un modelo de suplementación animal, se ha evidenciado que la abundancia de *Ruminococcus* se relaciona al aumento de BCAAs, hiperinsulinemia y un estado inflamatorio caracterizado por citocinas como TNF- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-4 y se ha reportado su correlación negativa con *Faecalibacterium* (132,143). Adicionalmente, especies del género *Ruminococcus* así como los *Lactobacillus* son capaces de producir alcohol, el cual contribuye a cambios morfológicos y fisiológicos de la barrera intestinal, que se asocia con el deterioro de la permeabilidad intestinal e incremento en el pasaje de endotoxinas del lumen intestinal hacia la circulación portal, induciendo un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno, lo cual estimula la inflamación hepática (144). Es importante mencionar, que aún en ausencia de la ingesta de alcohol, estos géneros producen alcoholes de manera constante, derivado de dietas ricas en azúcares refinados, por lo que se ha sugerido que la producción de alcohol en pacientes obesos, con una dieta rica en carbohidratos y en pacientes con NASH, puede contribuir al desarrollo y progresión de la enfermedad. Otro metabolito importante que puede ser tóxico para el hígado es la trimetilamina N-óxido (TMAO), ya que el incremento en su producción induce una disminución en la exportación hepática de VLDL, lo que resulta en un incremento en la deposición de lípidos a nivel hepático, presencia de un ambiente oxidante, inflamatorio y una disminución en el metabolismo de la glucosa (144).

El género *Faecalibacterium* se encontró presente en un 2% solo en el grupo de esteatosis; su disminución, se ha observado en pacientes con NAFLD y NASH en estados de obesidad y normopeso (145,146). Las especies de este género, como *Faecalibacterium prausnitzii*, han demostrado tener un efecto anti-inflamatorio, relacionado a la secreción de metabolitos que bloquean la activación de factores transcripcionales como NF-kB, la secreción de IL-8 así como la capacidad de inducir la secreción de citocinas anti-inflamatorias (147). La depleción de este género, es evidente en prácticamente todos nuestros grupos de estudio, por lo que los efectos benéficos atribuibles a este microorganismo no ocurren y en consecuencia se perpetúan algunos otros que pueden contribuir al desarrollo y progresión de la enfermedad.

Succinivibrio del filo *Proteobacteria*, fue uno de los géneros más abundantes en los grupos de esteatosis y esteatosis más fibrosis. Se ha reportado el enriquecimiento de *Succinivibrio* en pacientes con sobrepeso, y su aumento de hasta 3 veces más en obesidad y síndrome metabólico. (125,148). La abundancia de *Succinivibrio* también se ha relacionado a valores elevados de insulina, disminución en la tolerancia a la glucosa, HOMA-IR y alteraciones en el perfil lipídico (149). Por otro lado, en la infección por VIH se ha reportado la ausencia *Succinivibrio* y *Megasphaera* (este último, presente en los grupos control y esteatosis) en PVVIH *naive* a TARV. Sin embargo, bajo tratamiento con NRTIs o IPs, se ha documentado aumento en la abundancia de estos géneros; estudios previos han asociado la presencia de estos microorganismos con defectos en la función gastrointestinal asociados a concentraciones elevadas de succinato a nivel intestinal, el cual es producido principalmente por el género *Succinivibrio* (150).

En PVVIH sin TARV y con infección crónica muestran una elevada abundancia de *Prevotella*, *Catenibacterium* y *Bulleidia* (este último, presente en los grupos control y esteatosis, en menor grado en el grupo fibrosis pero depletado completamente en el grupo de esteatosis más fibrosis), *Dialister* y *Mitsuokella* (este último, presente en todos los grupos, con la menor cantidad en el grupo de fibrosis), *Clostridium cluster XIII*, así como *Desulfovibrio* en relación a personas sin la infección (151).

El género *Mitsuokella*, es miembro del filo *Firmicutes*, participa en la biosíntesis de ácidos grasos y se ha relacionado fuertemente el desarrollo de DM2, obesidad y NAFLD. Se ha detectado su abundancia en PVVIH en específico en HSH y se ha asociado con el subtipo IB del VIH (36).

Megamonas, del filo *Firmicutes*, fue uno de los géneros con menor abundancia en todos los grupos, a excepción del grupo de esteatosis más fibrosis, en el cual predominó. En la infección por VIH, su abundancia es contradictoria, considerando mayor abundancia en aquellos PVVIH *naive* a TARV (152,153). La abundancia de *Megamonas* se ha reportado en pacientes con NAFLD e infección por virus de hepatitis B, en donde se correlaciona positivamente con vías en el metabolismo carbohidratos como glucosa, manosa y fructosa, así como con el nivel de glucosa (154). Participa también en la biosíntesis de ácidos grasos y BCAAs, metabolismo de la glucosa y se asocia fuertemente con obesidad, DM2, disminución en la tolerancia a la glucosa, DM2, NAFLD, diversos tipos de cáncer y CVD (155). Aquí encontramos abundancia de *Megamonas* en los estadios de fibrosis de mayor severidad (F3-F4), en tanto que *Anaerovibrio* solo tiene presencia en aquellos casos de fibrosis grado 3. En este sentido, *Megamonas* y *Ruminococcus* han sido asociados con NAFLD severo, NASH o fibrosis severa (156). Además, en el caso de *Megamonas*, en un contexto de infección por VIH se ha correlacionado a inflamación sistémica y su aumento es paralelo con el aumento de *Prevotella* (35). En PVVIH el género *Anaerovibrio*, se ha reportado disminuido en paralelo con *Akkermansia*, *Bifidobacterium* y *Clostridium*. Además se asocia con un perfil de LT CD8⁺ anérgicos (157). En nuestro estudio, *Akkermansia* del filo *Verrucomicrobia*, es abundante en los grupos de fibrosis y esteatosis más fibrosis. La abundancia del género *Akkermansia* se asocia fuertemente a un estado saludable en diversas poblaciones y representa del 2 al 5% de la comunidad microbiana intestinal en personas sanas. Una disminución en su abundancia se ha demostrado en personas con prediabetes, DM2, obesidad, NAFLD, y en PVVIH (158,159). En estudios de intervención en donde se restaura su abundancia, se ha evidenciado una mejora en la función metabólica de personas obesas y con DM2 (159). En un estudio murino, se observó que *Akkermansia muciniphila* reduce la expresión de la Flavin

monooxigenasa 3 hepática (Fmo3), con lo cual se regulan los eventos de hiperglicemia, este microorganismo incrementa la termogénesis a través de la inducción de la proteína MCP-1 y regula el apetito vía liberación del péptido GLP-1. Por otro lado, mantiene la integridad de la barrera intestinal disminuyendo la inflamación (158). En NAFLD también se le han atribuido efectos positivos, ya que estudios previos han demostrado que la suplementación con *A. muciniphila* disminuye los niveles de triglicéridos, ALT, IL-6 y además, disminuye la expresión de la proteína SREBP, la cual es clave en la regulación de la síntesis de triglicéridos a nivel hepático y finalmente, contribuye a la restauración del ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* (160). Sin embargo, *Akkermansia muciniphila* también se encuentra asociada a NAFLD, disminución en la tolerancia a la glucosa, DM2, obesidad y CVD. Es una bacteria relacionada al metabolismo de la glucosa, biosíntesis de ácidos grasos, BCAAs, aminoácidos aromáticos y producción de acetato y propionato (161). En este sentido, se ha hipotetizado que los efectos que pueda llevar a cabo, son influenciados por el microambiente en el cual se encuentre, las comunidades microbianas instaladas y su abundancia relativa (162).

Adicional a la concentración de aminoácidos a la que se hizo referencia previamente, y considerando que los AAA se incrementan en enfermedades relacionadas a daño hepático entre ellas NAFLD (115), observamos que únicamente la fenilalanina en la condición de PVVIH, se aumenta ligeramente respecto a controles sanos (68 $\mu\text{mol/L}$ vs. 54.1 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente).

Otro de los hallazgos relevantes de nuestro estudio al evaluar el perfil de aminoácidos fue sin duda, las concentraciones elevadas de ácido aspártico y ácido glutámico en ambos grupos de estudio. Al realizar comparaciones entre nuestros grupos y controles sanos considerados en estudios previos, en el caso del ácido glutámico en PVVIH y PVVIH con esteatosis las concentraciones fueron de 295 $\mu\text{mol/L}$ y 229 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente; en tanto que las concentraciones reportadas en personas sanas son de 119 $\mu\text{mol/L}$ y 42 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente (114,115). Por otro lado, en el caso del ácido aspártico en PVVIH y PVVIH con esteatosis, las concentraciones fueron de 12 $\mu\text{mol/L}$ y 13 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente; en comparación con personas sanas, en quienes se reportan niveles séricos de 4 $\mu\text{mol/L}$ (114),

resultando muy evidente el aumento en las concentraciones de aminoácidos que se consideran un factor de riesgo para el desarrollo de NAFLD. En este sentido, se ha propuesto que un perfil de aumento en las concentraciones de glutamato, BCAAs, AAA, alanina y lisina, acoplado a una disminución de glicina y serina puede ser utilizado como biomarcador no invasivo enfocado a una detección temprana de NAFLD (163). Aunado a esto, en pacientes con NAFLD, en quienes se demostró balonización de los hepatocitos, se encontraron concentraciones elevadas de isoleucina y valina (BCAAs), además de tirosina (AAA), alanina, lisina y glutamato, acoplado a una disminución de glicina y treonina. El perfil de aumento de glutamato y disminución de tirosina, serina y glicina también se ha encontrado en estados de IR, obesidad, DM2, prediabetes y enfermedades hepáticas (115). Respecto a la fibrosis hepática, el glutamato ha sido fuertemente asociado a la severidad de fibrosis (115). En este sentido, se ha descrito que el glutamato (OR: 1.03, $p < 0.001$) y la glicina (OR: 0.99, $p = 0.041$) en conjunto con el HOMA-IR (OR: 1.43, $p < 0.001$), son factores de riesgo independientes para el desarrollo de fibrosis hepática. Además, el aumento en la concentración del glutamato y disminución de la glicina se han asociado con la IR y un metabolismo hepático alterado (114). Adicionalmente, las concentraciones elevadas de glutamato, se correlacionan además con la presencia de inflamación, abaloramamiento, estrés oxidativo y un incremento en la demanda de glutatión, así el aumento de glutamato es un evento contundente en NAFLD o enfermedad hepática (115). De acuerdo a lo previamente descrito, nuestros resultados muestran que en particular el grupo de PVVIH presentan una concentración de glicina (un factor de riesgo independiente al desarrollo de fibrosis) de 277 $\mu\text{mol/L}$, concentración que es elevada respecto a las reportadas para personas sanas en estudios previos 205 $\mu\text{mol/L}$ y 241 $\mu\text{mol/L}$ (114,115).

En nuestros pacientes, es evidente el aumento en las concentraciones de los BCAAs, glutamato y aspartato, acoplado a la ligera disminución de serina, lo que forma parte del perfil de detección temprana de NAFLD que ha sido propuesto (163). Además, basados en la literatura, este perfil tiene asociación con otras variables presentes en nuestra población como es la presencia de obesidad, IR, DM2, estrés

oxidativo, respuesta inflamatoria, presencia de daño hepático, aunado al evidente riesgo de fibrosis hepática y CVD que presentan las PVVIH en presencia de esteatosis.

Estudios en metabolómica han identificado un patrón específico de aminoácidos que pueden ser utilizados como biomarcadores de enfermedad hepática. En este sentido se ha propuesto al índice glutamato-serina-glicina (GSG), que combina tres aminoácidos involucrados en la síntesis del glutatión en estado reducido (GSH), y citotoxicidad hepática. Por lo tanto, se postula un incremento de GSH en NAFLD/NASH, ya que es una molécula antioxidante producida por varios tejidos en respuesta a una elevada producción de ROS, dado que el estrés oxidativo es uno de los principales mecanismos responsables del daño hepático y es caracterizado por disfunción mitocondrial, disminución en la oxidación y producción de ROS, lo que incrementa la demanda en la síntesis de GSH. Se ha reportado que el glutamato se incrementa en enfermedades metabólicas, evento que se explica por el hecho de que la GGT (enzima que encontramos elevada en la condición de PVVIH con NAFLD) promueve la liberación del glutamato durante la transaminación del GSH (164). Se ha reportado que el índice GSG se encuentra significativamente elevado en adultos con NAFLD, diagnosticado por biopsia, lo cual fue asociado a un aumento de enzimas hepáticas y IR. Adicionalmente, se ha descrito que esta elevación es más significativa en pacientes obesos con NAFLD vs. pacientes delgados con NAFLD, y que se incrementa paralelamente a la severidad de la fibrosis. Finalmente, el índice GSG se ha correlacionado con los BCAAs, especialmente con la leucina, indicando una posible alteración en la deshidrogenasa de glutamato, la cual es responsable de la conversión de leucina y alanina en glutamato (115,164).

Así, basados en nuestros resultados y posterior al cálculo del índice GSG (glutamato/(glicina + serina)), obtuvimos un índice de 0.78 para las PVVIH y de 0.80 para el grupo de PVVIH con esteatosis. En personas sanas se ha reportado un índice GSG de 0.38, en tanto que en personas con NAFLD de 0.69, y 0.75 en personas obesas con NAFLD. Basados en estos resultados, en conjunto con el aumento en las concentración de BCAAs y glutamato, podemos concluir que de

acuerdo con otras publicaciones este índice puede postularse como un biomarcador de severidad en enfermedad hepática, ya que se aumenta con el grado de fibrosis hepática, en particular en fibrosis severa (F3-4) (115).

En este sentido, estudios longitudinales de intervención farmacológica y terapia nutricional, han reportado cambios en el índice GSG, lo que evidencia la mejoría de indicadores metabólicos asociados a la progresión de fibrosis en estos pacientes (164).

En relación al perfil de aminoácidos en un contexto de VIH, se ha reportado un incremento en las concentraciones plasmáticas de glutamato y una disminución de metionina, leucina, citrulina, valina, prolina, aspartato, glutamina, lisina, tironina, tirosina, fenilalanina e isoleucina, al compararse con personas sin la infección (165). Considerando los rangos de referencia, nuestros resultados indican que las PVVIH y las PVVIH con esteatosis tienen concentraciones disminuidas de histidina, lisina, treonina y ornitina; en tanto que serina, valina y fenilalanina, únicamente se encontraron disminuidos en el grupo de PVVIH con esteatosis. En este sentido, no se han dilucidado los mecanismos por los cuales las PVVIH tienen concentraciones disminuidas de estos aminoácidos, sin embargo, se ha propuesto que pueden deberse a una mala absorción intestinal, disminución en la necesidad de su utilización o requerimientos de los aminoácidos. La infección por VIH, da lugar a la producción intestinal de citocinas proinflamatorias, hecho que se asocia con un incremento en la permeabilidad intestinal, apoptosis de células epiteliales y alteraciones en la uniones estrechas intercelulares, eventos que pueden conducir a una disminución en la absorción de los aminoácidos (165).

En las PVVIH con esteatosis, encontramos un ligero aumento en las concentraciones de citrulina. Este hallazgo coincide con reportes previos, donde se evidenció un aumento de citrulina en PVVIH, y donde se considera un biomarcador de la enteropatía que caracteriza a la infección por VIH y que, incluso, puede ayudar a discriminar entre una diarrea tóxica por el TARV y enteropatía infecciosa, lo que convierte a la citrulina en una herramienta objetiva (166). Adicionalmente, citrulina y arginina se han considerado marcadores de inflamación (167), y en el caso particular de la citrulina, este aminoácido se ha asociado también a eventos

cardiovasculares en el contexto de enfermedad renal infantil (168). Consideramos entonces, que la citrulina debe ser un aminoácido importante para ser monitoreado en conjunto con otros biomarcadores de riesgo para CVD en PVVIH y NAFLD, tomando en cuenta esta posible asociación a eventos cardiovasculares que, si bien ha sido descrito en otros contextos, en VIH no hay reportes al respecto. El aumento en las concentraciones de glutamato que observamos en nuestros grupos de PVVIH con y sin NAFLD, es consistente con reportes previos, en los que se ha documentado un aumentado en plasma y en líquido cefalorraquídeo en quienes viven con VIH, situación en la que un metabolismo alterado del glutamato se ha asociado con desordenes neurológicos, como el trastorno neurocognitivo asociado a VIH (HAND, por sus siglas en inglés), alteración que se presenta con frecuencia (15 a 50%) en la infección por VIH a pesar de la supresión virológica y la reconstitución inmune. Se ha propuesto, que los macrófagos activados contribuyen al daño neuronal por una producción extracelular excesiva de glutamato, evento acoplado a una disminución en la recaptura astrocítica del glutamato, lo que provoca una pérdida neta de glutamato intracelular. Adicionalmente, un estudio *in vitro*, demostró que concentraciones elevadas de glutamato inhiben las funciones de macrófagos y linfocitos T, y que un aumento cuadruplicado de este aminoácido en el espacio extracelular provoca una inhibición de hasta un 30-40% en la síntesis del DNA, efecto inhibitor que se compensa con la adición de cisteína (165). En relación al desgaste neurocognitivo presente en la infección por VIH, se ha reportado también, un aumento en las concentraciones de triptofano y fenilalanina, moléculas importantes en la biosíntesis de neurotransmisores (169). En este sentido, encontramos niveles elevados de fenilalanina en los pacientes con infección por VIH (68 $\mu\text{mol/L}$), en comparación con personas sanas consideradas en reportes previos (54 $\mu\text{mol/L}$) (114,115). Finalmente, encontramos niveles elevados de aspartato en ambos grupos de estudio, este es un aminoácido gluconeogénico, por lo que su elevación a nivel plasmático sugiere que este proceso se encuentra abolido. Por otro lado, al ser el aspartato un aminoácido donador de N_2 en el ciclo de la urea y actuar como un neurotransmisor excitatorio en el cerebro, la disminución de los niveles intracelulares puede dar lugar a alteraciones en el proceso de detoxificación

y una disminución en la función del SNC (118). Esta elevación de aspartato, en conjunto con un aumento en las concentraciones del glutamato, deben ser un foco de atención desde la mirada clínica ya que en estos pacientes puede ser biomarcadores asociados al riesgo de presentar un deterioro neurocognitivo.

XI. CONCLUSIONES.

- Encontramos que aquellos pacientes con mayor evidencia de daño hepático (esteatosis y/o fibrosis), tuvieron cuentas de CD4⁺ menores, tras compararse con el grupo control.
- Aunque la asociación a ciertos grupos de fármacos antirretrovirales se han considerado de riesgo para el desarrollo de enfermedades metabólicas, entre ellas NAFLD, no encontramos esta diferencia en el estudio, tomando en cuenta la heterogeneidad en los tratamientos entre nuestros grupos de estudio.
- La abundancia del género *Prevotella* es evidente en el total de los pacientes evaluados, hecho que atribuimos a las condiciones metabólicas de los pacientes, sin embargo, encontramos una asociación entre significativa entre los niveles de IL-6 y la abundancia de *Prevotella* en los pacientes con fibrosis y fibrosis con esteatosis, así como en los casos de solo fibrosis. Este género bacteriano también se asocia a la producción de BCAAs, metabolitos íntimamente asociados al desarrollo de resistencia a la insulina, demostrado en nuestros pacientes con esteatosis y esteatosis con fibrosis, no así en el grupo de fibrosis. Lo cual nos plantea la hipótesis que la esteatosis es el factor predominante en esta secuencia de *Prevotella*- BCAAs (valina y leucina)- IL-6-resistencia a la insulina.
- Predominio de *Firmicutes* solo en el grupo control, probablemente asociado a la obesidad de los pacientes, ya que 32 de ellos se encontró con un IMC superior a 25 (71.1%), en el resto de los grupos, *Prevotella* fue predominante.
- La presencia de *Bacteroidetes*, aunque sea con baja representatividad se ha asociado a NASH, pero sobre todo a progresión, y aquí lo encontramos en todos los grupos, con excepción del grupo control, afirmando esta asociación.
- En el análisis de abundancia relativa por filo, encontramos abundancia de *Proteobacteria* en los grupos de esteatosis y esteatosis con fibrosis, este filo está muy asociado a la translocación bacteriana, con presencia de

lipopolsacáridos a nivel sistémico e inductor de endotoxemia asociada a NAFLD.

- Por otro lado, el género *Blautia* se encuentra en abundancia en aquellos pacientes con esteatosis y fibrosis, en quienes también se describió un nadir de linfocitos T CD4⁺ menor. Esta asociación de *Blautia* con enteropatía ha sido descrita incluso en personas sin VIH, pero con enfermedad intestinal.
- Fue evidente el enriquecimiento de los géneros *Dorea*, *Ruminococcus*, *Blautia* y *Faecalibacterium* en pacientes con esteatosis y esteatosis más fibrosis.
- En esteatosis grave y fibrosis, encontramos una elevación de IFN- γ , probablemente asociado al enriquecimiento de *Ruminococcus* e hiperinsulinemia (8.43 vs 13.92). *Ruminococcus* también se asocia al aumento de BCAAs.
- Podemos deducir que la abundancia de *Megamonas* en este estudio obedece a las alteraciones metabólicas y proceso inflamatorio a nivel hepático en el grupo con esteatosis y fibrosis, hallazgo que también se relaciona con la abundancia de *Prevotella* y marcadores de inflamación, como IL-6, PCR, IFN- γ y dímero D.
- Concentraciones elevadas de valina, leucina e isoleucina en ambos grupos, probablemente en relación con VIH, aunque no nos ha sido posible comparar esta variable con hiperinsulinemia, aumentos de glucosa, obesidad, etc.
- Citrulina elevada en el grupo con esteatosis, ácido glutámico muy elevado en ambos grupos también, igual para ácido aspártico.
- Encontramos una elevación de glutamato en ambos grupos, probablemente asociado a resistencia a la insulina, obesidad, DM2, prediabetes y enfermedades hepáticas en ambos grupos.
- A diferencia de lo descrito en la literatura, encontramos bajas concentraciones de lisina, aminoácido muy asociado a NAFLD.
- Se cumple el perfil de serina baja, glutamato y aspártato elevados, este perfil se ha descrito en NAFLD temprano, por lo que es probable que los pacientes sin esteatosis tengan enfermedad temprana o leve.

- En estados de resistencia a la insulina e hiperinsulinemia, los BCAAs fluyen hacia el músculo esquelético, probablemente esta es la causa de los niveles bajos de aminoácidos en nuestros pacientes.
- Elevación en el índice GSG, probablemente en el grupo sin esteatosis sea secundario a la obesidad, sin embargo, el índice más elevado fue hallado en el grupo de esteatosis.
- Encontramos elevación de citrulina en el grupo con NAFLD, este aminoácido se ha descrito como un marcador de enteropatía y se asocia a enfermedad cardiovascular.
- IL-18 se asocia con la activación del inflamosoma, y el mismo es piedra angular para el desarrollo de fibrosis, así mismo el grupo de fibrosis tuvo el nadir más bajo de CD4⁺ y el nivel más alto de IL-18. Esta relación ya había sido descrita en pacientes coinfectados con VHC y VIH, y se mantiene en nuestro trabajo.
- IFN gamma se asocia a fibrogénesis y acumulación lipídica, sobre todo en pacientes obesos. Estos niveles si fueron por mucho, más elevados en los pacientes con más esteatosis.
- Esta sinergia IL-6 e IL-18 parece ser relevante en la progresión, ya que se mantiene al comparar a los pacientes con los mayores grados de fibrosis.
- Las concentraciones de algunas citocinas son contradictorias a lo previamente descrito en VIH y NAFLD, no descartamos que la disminución en estos niveles sea secundaria al consumo periférico de citocinas y su concentración tisular más que plasmática.
- En el análisis de BCAAs, encontramos niveles de glutamato por encima de los valores de referencia en ambos grupos. Se han descrito niveles elevados de este aminoácido en personas con NAFLD en personas sin la infección por VIH. Sin embargo, en algunas poblaciones también se ha encontrado una correlación positiva con síndrome metabólico, particularmente con resistencia a la insulina, probablemente este sea el factor predominante que determina la elevación en nuestros grupos.

- Los niveles de aspartato también se encuentran por encima de los valores de referencia en ambos grupos, este aminoácido también se correlaciona de forma positiva con aumento de riesgo cardiometabólico y resistencia a la insulina hepática.
- La elevación de PCR, sobre todo en los grupos de esteatosis y fibrosis, ascomo el de fibrosis severa encontramos niveles de PCR por encima de 3 mg/dL, en comparación con el grupo de esteatosis severa y fibrosis. Estos niveles nos hablan de un riesgo cardiovascular significativo. Además, se cumple la premisa, en donde los pacientes con más fibrosis suelen presentar niveles elevados de este marcador.
- Fibrinógeno, como marcador de riesgo cardiovascular, también presentó niveles más elevados en los grupos de esteatosis y fibrosis, sobre todo con los grados más significativos de ambas variables.
- Al analizar solo el grupo con fibrosis severa, PCR y fibrinógeno resultan mucho mas elevadas que el grupo control, lo cual reflejaría el riesgo cardiovascular más elevado en estos pacientes.
- Aunque ninguno de los grupos presentó niveles de dímero D con medianas por encima de 500 ng/mL, si encontramos concentraciones mayores en el grupo de esteatosis y fibrosis severa, probablenete esto refleja el papel del DD en el proceso fibrótico, así como una elevación no significativa por el control virológico asociado a TARV.
- El incremento de Ox-LDL, como consecuencia de oxidación por la generación de ROS, tambien induce la activación del inflamosoma, efecto que desencadena el aumento de IL-18 y favorece inflamación y fibrosis, pero tambien la generación de celulas espumosas a nivel endotelial. En nuestro estudio fue evidente y significativa la correlación del Ox-LDL con la severidad del grado de esteatosis. Además, es relevante destacar la correlación positiva que se encontró con el dímero D en el grupo control de PVVIH y con la PCR en el grupo de esteatosis, siendo el dímero D y la PCR, moléculas que juegan un papel fundamental en el desarrollo y progresión de eventos

cardiovasculares y consideradas predictores independientes de mortalidad en PVVIH.

La enfermedad por hígado graso no alcohólico representa un problema de salud grave en la población que vive con VIH, esta enfermedad se relaciona con alteraciones metabólicas (obesidad, resistencia a la insulina, diabetes, dislipidemia), problema creciente en la población mexicana y, particularmente, en PVVIH. Diversos factores se asocian al desarrollo de NAFLD, sin embargo, se postula que en quienes viven con VIH, la disbiosis y enteropatía aceleran el daño hepático y favorecen la fibrosis.

La mayoría de los pacientes incluidos en el estudio se encontraban en sobrepeso u obesidad.

En el análisis por subgrupos, destaca la asociación positiva de acuerdo a grado de esteatosis y severidad de fibrosis con las siguientes variables: niveles de PCR, insulina, IL-6, índice HOMA, IFN gamma, IMC, índices de cintura y cadera; corroborando, un mayor grado de inflamación y riesgo cardiovascular elevado.

En cuanto al estudio de la microbiota intestinal, se encontró un predominio del enterotipo *Prevotella* en aquellos pacientes con evidencia de daño hepático (fibrosis, esteatosis y esteatosis + fibrosis), se han encontrado propiedades patobióticas asociadas a las especies de *Prevotella*, así como una intensa interacción con el sistema inmunológico y su influencia en enfermedades inflamatorias. Hallazgo que también se corresponde con las citocinas inflamatorias y marcadores de riesgo cardiovascular.

Al analizar las comunidades bacterianas por grupo, encontramos abundancia significativa de los géneros *Akkermansia* y *Clostridium*, géneros asociados al consumo de carnes rojas y azúcares simples.

Finalmente, en el grupo con mayor daño hepático (esteatosis + fibrosis) destacó la abundancia del género *Acidaminococcus*, hallazgo frecuente en PVVIH y, también asociado a dietas proinflamatorias.

XII. LIMITACIONES.

- El uso de USG como metodo para evaluar esteatosis, ya que aunque es el más accesible y barato, solo refleja esteatosis por encima del 20%, por lo que es posible que estemos infravalorando el grado de esteatosis en los pacientes.
- El haber realizado la evaluación de aminoácidos solo en PVVIH y PVVIH y esteatosis, ademas de haberlo realizado en *pool* de 5 pacientes por grupo. Fue evidente la necesidad de realizar la medición en cada grupo y de manera individual con la finalidad de poder establecer posibles asociaciones con otros parámetros relacionados a las concentraciones de los aminoácidos en un contexto de infección por VIH y NAFLD.
- La profundidad del análisis de secuenciación ya que este se limito a género y resulta evidente la necesidad de caracterizar hasta especie para poder establecer relaciones o asociaciones y poder definir conclusiones mas certeras y objetivas.
- La ausencia de una evaluación nutricional ya que hacer uso de estas herramientas nos proporciona información valiosa en relación a los micro y macronutrientes con el objetivo de poder realizar asociaciones con el perfil de aminoácidos, la microbiota intestinal y otros parametros evaluados que se ven influenciados por ciertas variables nutricionales.
- Por otro lado, para establecer algunas conclusiones, resulto evidente necesidad de tener un grupo de personas sanas que nos indicara los valores de parámetros como los BCAAs o bien la caracterización de la microbiota intestinal en nuestra población en una condicion de salud, ya que ambos se ven influenciados por diversos factores ambientales y habitos dieteticos.
- No se consideró para este estudio un grupo de pacientes sin la infección por VIH, pero con síndrome metabólico. Lo cual sería de utilidad para distinguir aquellos cambios en la microbiota atribuibles a la propia infección por VIH.

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Rev Investig Clin.* 2004;56(2):126–9.
2. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science (80-).* 1984;224(4648):497–500.
3. Delgado R. Virological characteristics of HIV. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29(1):58–65.
4. IARC Working Group file:///Users/Reja/Downloads/JC3032_AIDS_Data_book_2021_En.pdf on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans., International Agency for Research on Cancer. Human immunodeficiency viruses and human T-cell lymphotropic viruses. 1996;424.
5. United Nations Programme on HIV/aids. UNAIDS. UNAIDS data 2021. 2021;4–38.
6. Suehiro M, Nagaki Y, Inui T, Takegami Y. Global, regional, and national incidence and mortality for HIV, tuberculosis, and malaria during 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 2014;13(2):150–5.
7. Secretaría de Salud. Sistema de Vigilancia Epidemiológica de VIH (3er. trimestre 2020). 2020;19.
8. Okoye AA, Picker LJ. CD4+ T-Cell Depletion In Hiv Infection: Mechanisms Of Immunological Failure. *Immunol Rev.* 2013;254(1):54–64.
9. Maartens G, Celum C, Lewin SR. HIV infection: Epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *Lancet.* 2014;384(9939):258–71.
10. Engelman A, Cherepanov P. The structural biology of HIV-1: Mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10(4):279–90.
11. Braun DL, Kouyos RD, Balmer B, Grube C, Weber R, Günthard HF. Frequency and Spectrum of Unexpected Clinical Manifestations of Primary HIV-1

- Infection. Clin Infect Dis. 2015;61(6):1013–21.
12. Fauci AS, Pantaleo G, Stanley S, Weissman D. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. Ann Intern Med. 1996;124(7):654–63.
 13. Narashimhan L, Anand AR, Sethuraman S, Maheswari U. Targeting strategies for delivery of anti-HIV drugs. 2020;(January).
 14. Bischoff J, Gu W, Schwarze-Zander C, Boesecke C, Wasmuth J-C, van Bremen K, et al. Stratifying the risk of NAFLD in patients with HIV under combination antiretroviral therapy (cART). EClinicalMedicine. 2021;40:101116.
 15. van der Poorten D, Milner KL, Hui J, Hodge A, Trenell MI, Kench JG, et al. Visceral fat: A key mediator of steatohepatitis in metabolic liver disease. Hepatology. 2008;48(2):449–57.
 16. Rose H, Hoy J, Woolley I, Tchoua U, Bukrinsky M, Dart A, et al. HIV infection and high density lipoprotein metabolism. Atherosclerosis. 2008;199(1):79–86.
 17. Vos AG, Dodd CN, Delemarre EM, Nierkens S, Serenata C, Grobbee DE, et al. Patterns of Immune Activation in HIV and Non HIV Subjects and Its Relation to Cardiovascular Disease Risk. Front Immunol. 2021;12(July):1–9.
 18. Powell EE, Wong VWS, Rinella M. Non-alcoholic fatty liver disease. Lancet. 2021;397(10290):2212–24.
 19. Pais R, Maurel T. Natural history of nafld. J Clin Med. 2021;10(6):1–17.
 20. Bessone F, Razori MV, Roma MG. Molecular pathways of nonalcoholic fatty liver disease development and progression. Cell Mol Life Sci. 2019;76(1):99–128.
 21. Arab JP, Dirchwolf M, Álvares-da-Silva MR, Barrera F, Benítez C, Castellanos-Fernandez M, et al. Latin American Association for the study of the liver (ALEH) practice guidance for the diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. Ann Hepatol. 2020;19(6):674–90.
 22. Michael H. Le, Yee Hui Yeo, Xiaohe Li, Jie Li, Biyao Zou, Yuankai Wu, Qing Ye, Daniel Q. Huang, Changqing Zhao, Jie Zhang, Chenxi Liu, Na Chang, Feng Xing, Shiping Yan, Zi Hui Wan, Natasha Sook Yee Tang, Maeda Mayumi, Xinting Liu, Chuanli Liu, Fajuan Rui, MHN. 2019 Global NAFLD

- Prevalence: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2021;
23. Mantovani A, Scorletti E, Mosca A, Alisi A, Byrne CD, Targher G. Complications, morbidity and mortality of nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism*. 2020;111:154170.
 24. Squillace N, Soria A, Bozzi G, Gori A, Bandera A. Nonalcoholic fatty liver disease and steatohepatitis in people living with HIV. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;13(7):643–50.
 25. 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(11):1621–32.
 26. Ahmed MH, Husain NE, Malik A, Woodward C, Mital D. Non-alcoholic fatty liver disease and HIV/AIDS: A new way of modulation of cardiovascular risk. *AIDS Rev*. 2017;19(4):190–7.
 27. Obika M, Noguchi H. Diagnosis and Evaluation of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Gastaldelli A, editor. *Exp Diabetes Res*. 2012;2012:145754.
 28. Cebreiros López I, Noguera Velasco JA. Valoración de la enfermedad por hígado graso no alcohólico desde el laboratorio clínico. *Rev del Lab Clínico*. 2018;11(3):163–73.
 29. Dyson JK, Anstee QM, McPherson S. Non-alcoholic fatty liver disease: a practical approach to diagnosis and staging. *Frontline Gastroenterol*. 2014;5(3):211–8.
 30. Blanco-Grau A, Gabriel-Medina P, Rodriguez-Algarra F, Villena Y, Lopez-Martínez R, Augustín S, et al. Assessing liver fibrosis using the fib4 index in the community setting. *Diagnostics*. 2021;11(12):1–10.
 31. Guedes KS, Sanchez BAM, Gomes LT, Fontes CJF. Aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index (APRI): A potential marker for diagnosis in patients at risk of severe malaria caused by *Plasmodium vivax*. *PLoS One*. 2019;14(11):1–12.
 32. English E. EACS Guidelines 2021. Vol. 1, *Journal of Nature, Science & Technology*. 2021. 0–148 p.

33. Arab JP, Arrese M, Trauner M. Recent Insights into the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2018;13:321–50.
34. Hrnčir T, Hrnčirova L, Kverka M, Hromadka R, Machova V, Trckova E, et al. Gut Microbiota and NAFLD: Pathogenetic Mechanisms, Microbiota Signatures, and Therapeutic Interventions. 2021;1–18.
35. Ling Z, Jin C, Xie T, Cheng Y, Li L, Wu N. Alterations in the Fecal Microbiota of Patients with HIV-1 Infection: An Observational Study in A Chinese Population. *Sci Rep.* 2016;6(August):30673.
36. Do Nascimento WM, Machiavelli A, Ferreira LGE, Silveira LC, de Azevedo SSD, Bello G, et al. Gut microbiome profiles and associated metabolic pathways in HIV-infected treatment-naïve patients. *Cells.* 2021;10(2):1–17.
37. Aragonès G, González-García S, Aguilar C, Richart C, August T. Gut Microbiota-Derived Mediators as Potential Markers in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Biomed Res Int.* 2019;2019.
38. Zhou D, Fan JG. Microbial metabolites in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2019;25(17):2019–28.
39. Brandl K, Kumar V, Eckmann L. Gut-liver axis at the frontier of host-microbial interactions. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 2017;312(5):G413–9.
40. Stefan N, Häring HU, Cusi K. Non-alcoholic fatty liver disease: causes, diagnosis, cardiometabolic consequences, and treatment strategies. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2019;7(4):313–24.
41. Ho CM, Ho SL, Jeng YM, Lai YS, Chen YH, Lu SC, et al. Accumulation of free cholesterol and oxidized low-density lipoprotein is associated with portal inflammation and fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Inflamm (United Kingdom).* 2019;16(1):1–8.
42. García-Monzón C, Lo Iacono O, Crespo J, Romero-Gómez M, García-Samaniego J, Fernández-Bermejo M, et al. Increased soluble CD36 is linked to advanced steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Clin Invest.* 2014;44(1):65–73.
43. Glen J, Floros L, Day C, Pryke R. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD):

- Summary of NICE guidance. *BMJ*. 2016;354(September):1–7.
44. Paul J. Recent advances in non-invasive diagnosis and medical management of non-alcoholic fatty liver disease in adult. *Egypt Liver J*. 2020;10(1).
 45. Selvaraj EA, Mózes FE, Jayaswal ANA, Zafarmand MH, Vali Y, Lee JA, et al. Diagnostic accuracy of elastography and magnetic resonance imaging in patients with NAFLD: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*. 2021;75(4):770–85.
 46. Pelusi S, Cespiati A, Rametta R, Pennisi G, Mannisto V, Rosso C, et al. Prevalence and Risk Factors of Significant Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Without Steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019;17(11):2310-2319.e6.
 47. Dimala CA, Ngu RC, Kadia BM, Tianyi FL, Choukem SP. Markers of adiposity in HIV/AIDS patients: Agreement between waist circumference, waist-to-hip ratio, waist-to-height ratio and body mass index. *PLoS One*. 2018;13(3):1–18.
 48. Brown T, Wang Z, Chu H, Palella FJ, Kingsley L, Witt MD, et al. Longitudinal anthropometric changes in HIV-infected and HIV-uninfected men. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006;43(3):356–62.
 49. Zheng RD, Chen ZR, Chen JN, Lu YH, Chen J. Role of body mass index, waist-to-height and waist-to-hip ratio in prediction of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterol Res Pract*. 2012;2012(January 2008).
 50. Lin MS, Lin TH, Guo SE, Tsai MH, Chiang MS, Huang TJ, et al. Waist-to-height ratio is a useful index for nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents: A secondary data analysis. *BMC Public Health*. 2017;17(1):4–11.
 51. Rocha R, Cotrim HP, Carvalho FM, Siqueira AC, Braga H, Freitas LA. Body mass index and waist circumference in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hum Nutr Diet*. 2005;18(5):365–70.
 52. Wang Y, Koch M, Di Giuseppe R, Evans K, Borggrefe J, Nöthlings U, et al. Associations of Plasma CD36 and Body Fat Distribution. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019;104(9):4016–23.
 53. Borges ÁH, O'Connor JL, Phillips AN, Baker J V., Vjecha MJ, Losso MH, et al.

- Factors associated with D-dimer levels in HIV-infected individuals. *PLoS One*. 2014;9(3):1–11.
54. Ogresta D, Mrzljak A, Berkovic MC, Bilic-Curcic I, Stojavljevic-Shapeski S, Virovic-Jukic L. Coagulation and Endothelial Dysfunction Associated with NAFLD: Current Status and Therapeutic Implications. *J Clin Transl Hepatol*. 2022;10(2):339–55.
 55. Rada P, González-Rodríguez Á, García-Monzón C, Valverde ÁM. Understanding lipotoxicity in NAFLD pathogenesis: is CD36 a key driver? *Cell Death Dis*. 2020;11(9).
 56. Zeng H, Qin H, Liao M, Zheng E, Luo X, Xiao A, et al. CD36 promotes de novo lipogenesis in hepatocytes through INSIG2-dependent SREBP1 processing. *Mol Metab*. 2022;57(December 2021):101428.
 57. Zhao L, Li Y, Ding Q, Li Y, Chen Y, Ruan XZ. CD36 Senses Dietary Lipids and Regulates Lipids Homeostasis in the Intestine. *Front Physiol*. 2021;12(April).
 58. Oliveira R de VC de, Shimakura SE, Campos DP, Hökerberg YHM, Victoriano FP, Ribeiro S, et al. Effects of antiretroviral treatment and nadir CD4 count in progression to cardiovascular events and related comorbidities in a HIV Brazilian cohort: a multi-stage approach. *AIDS Care - Psychol Socio-Medical Asp AIDS/HIV*. 2018;30(5):551–9.
 59. Mogadam E, King K, Shriner K, Chu K, Sondergaard A, Young K, et al. The association of nadir CD4-T cell count and endothelial dysfunction in a healthy HIV cohort without major cardiovascular risk factors. *SAGE Open Med*. 2020;8:205031212092489.
 60. Fontes-Cal TCM, Mattos RT, Medeiros NI, Pinto BF, Belchior-Bezerra M, Roque-Souza B, et al. Crosstalk Between Plasma Cytokines, Inflammation, and Liver Damage as a New Strategy to Monitoring NAFLD Progression. *Front Immunol*. 2021;12(August):1–10.
 61. Villanueva C, David R, Tirado G, Rosalia B, Sánchez R, Alejandro J, et al. Vista de DIFERENCIAS EN EL PERFIL DE CITOCINAS DE ACUERDO AL GRADO DE INFLAMACIÓN Y ESTEATOSIS EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO | JÓVENES EN LA

CIENCIA. (1).

62. Liu K, Wang FS, Xu R. Neutrophils in liver diseases: pathogenesis and therapeutic targets. *Cell Mol Immunol*. 2021;18(1):38–44.
63. Veenhuis RT, Astemborski J, Chattergoon MA, Greenwood P, Jarosinski M, Moore RD, et al. Systemic elevation of proinflammatory interleukin-18 in human immunodeficiency virus (HIV)/hepatitis C virus (HCV) coinfection versus HIV or HCV monoinfection. *Clin Infect Dis*. 2017;64(5):589–96.
64. Sim JH, Sherman JB, Stanley TL, Corey KE, Fitch K V., Looby SE, et al. Pro-Inflammatory Interleukin-18 is Associated with Hepatic Steatosis and Elevated Liver Enzymes in People with HIV Monoinfection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2021;37(5):385–90.
65. Flisiak-Jackiewicz M, Bobrus-Chociej A, Tarasów E, Wojtkowska M, Białokoz-Kalinowska I, Lebensztejn DM. Predictive Role of Interleukin-18 in Liver Steatosis in Obese Children. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2018;2018.
66. Tapan S, Dogru T, Kara M, Ercin CN, Kilciler G, Genc H, et al. Circulating levels of interleukin-18 in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Scand J Clin Lab Invest*. 2010;70(6):399–403.
67. Lau B, Sharrett R, Kingsley LA, Post W, Palella FJ, Visscher B, et al. C-reactive protein is a marker for human immunodeficiency virus disease progression. *Arch Intern Med*. 2006;166(1):64–70.
68. Yeniova AO, Küçükazman M, Ata N, Dal K, Kefeli A, Başıyigit S, et al. High-sensitivity C-reactive protein is a strong predictor of non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatogastroenterology*. 2014;61(130):422–5.
69. Yoneda M, Mawatari H, Fujita K, Iida H, Yonemitsu K, Kato S, et al. High-sensitivity C-reactive protein is an independent clinical feature of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and also of the severity of fibrosis in NASH. *J Gastroenterol*. 2007;42(7):573–82.
70. Tasneem AA, Luck NH, Majid Z. Factors predicting non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and advanced fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Trop Doct*. 2018;48(2):107–12.
71. Di Mauro S, Scamporrino A, Filippello A, Di Pino A, Scicali R, Malaguarnera

- R, et al. Clinical and molecular biomarkers for diagnosis and staging of nafld. *Int J Mol Sci.* 2021;22(21).
72. Mugusi SF, Sando D, Mugusi FM, Hawkins C, Aboud S, Fawzi WW, et al. Risk Factors for Alanine Aminotransferase Elevations in a Prospective Cohort of HIV-Infected Tanzanian Adults Initiating Antiretroviral Therapy. *J Int Assoc Provid AIDS Care.* 2019;18:1–10.
 73. Mata-Marín JA, Gaytán-Martínez J, Grados-Chavarría BH, Fuentes-Allen JL, Arroyo-Anduiza CI, Alfaro-Mejía A. Correlation between HIV viral load and aminotransferases as liver damage markers in HIV infected naive patients: A concordance cross-sectional study. *Viol J.* 2009;6:4–7.
 74. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: Impact of ethnicity. *Hepatology.* 2004;40(6):1387–95.
 75. Hadizadeh F, Faghihimani E, Adibi P. Nonalcoholic fatty liver disease: Diagnostic biomarkers. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 2017;8(2):11.
 76. Leite NC, Salles GF, Araujo ALE, Villela-Nogueira CA, Cardoso CRL. Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus. *Liver Int.* 2009;29(1):113–9.
 77. Kunde SS, Lazenby AJ, Clements RH, Abrams GA. Spectrum of NAFLD and diagnostic implications of the proposed new normal range for serum ALT in obese women. *Hepatology.* 2005;42(3):650–6.
 78. Nguyen KA, Peer N, Kengne AP. Associations of gamma-glutamyl transferase with cardio-metabolic diseases in people living with HIV infection in South Africa. *PLoS One.* 2021;16(2 February):1–13.
 79. Pedro M, Adrián AG, Luz G, Federico AJ, Carlos R, Ruth I, et al. Relación entre gammaglutamil-transferasa y rigidez arterial en pacientes con infección por VIH. *Rev Médica MD.* 2018;9(04):299–304.
 80. Tahan V, Canbakan B, Balci H, Dane F, Akin H, Can G, et al. Serum gamma-glutamyltranspeptidase distinguishes non-alcoholic fatty liver disease at high risk. *Hepatogastroenterology.* 2008;55(85):1433–8.
 81. Kasapoglu B, Turkay C, Yalcin KS, Carlioglu A, Koktener A. Role of γ -glutamyl

transferase levels in prediction of high cardiovascular risk among patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Indian J Med Res.* 2016;143(JANUARY):30–6.

82. Hossain IA, Rahman Shah MM, Rahman MK, Ali L. Gamma glutamyl transferase is an independent determinant for the association of insulin resistance with nonalcoholic fatty liver disease in Bangladeshi adults: Association of GGT and HOMA-IR with NAFLD. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev.* 2016;10(1):S25–9.
83. Virović-Jukić L, Stojsavljević-Shapeski S, Forgač J, Kukla M, Mikolašević I. Non-alcoholic fatty liver disease – A procoagulant condition? *Croat Med J.* 2021;62(1):25–33.
84. Madden E, Lee G, Kotler DP, Wanke C, Lewis CE, Tracy R, et al. Association of antiretroviral therapy with fibrinogen levels in HIV-infection. *Aids.* 2008;22(6):707–15.
85. Aisabokhale FA, Akingbola TS, Bamidele K. D-dimer as a predictor of altered coagulation in HIV patients in Nigeria. *Niger J Physiol Sci.* 2019;34(1):99–105.
86. Peverill RE, Teede HJ, Malan E, Kotsopoulos D, Smolich JJ, McGrath BP. Relationship of waist and hip circumference with coagulation and fibrinolysis in postmenopausal women. *Clin Sci.* 2007;113(9–10):383–91.
87. Franco CK, Silva DR, Barreto SSM. Relationship of body mass index and waist-to-hip ratio with fibrinolytic activity measured as d-dimer. *Obes Res Clin Pract.* 2011;5(1).
88. Yuan SM, Shi YH, Wang JJ, Fang-Qi L, Gao S. Níveis plasmáticos elevados do dímero D e da proteína c reativa hipersensíveis podem indicar desordens aórticas. *Brazilian J Cardiovasc Surg.* 2011;26(4):573–81.
89. Bao W, Qi X, Li HL, Hou F, Zhang X, Wang R, et al. Correlation of D-dimer level with the inflammatory conditions: a retrospective study. *AME Med J.* 2017;2:27–27.
90. Zidar DA, Juchnowski S, Ferrari B, Clagett B, Pilch-Cooper HA, Rose S, et al. Oxidized LDL levels are increased in HIV infection and may drive monocyte activation. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2015;69(2):154–60.

91. Mitchell BI, Laws EI, Chow DC, SahBandar IN, Gangcuangco LMA, Shikuma CM, et al. Increased monocyte inflammatory responses to oxidized LDL are associated with insulin resistance in HIV-infected individuals on suppressive antiretroviral therapy. *Viruses*. 2020;12(10).
92. Yimin, Furumaki H, Matsuoka S, Sakurai T, Kohanawa M, Zhao S, et al. A novel murine model for non-alcoholic steatohepatitis developed by combination of a high-fat diet and oxidized low-density lipoprotein. *Lab Investig*. 2012;92(2):265–81.
93. Hussein OA, Gefen Y, Zidan JM, Karochero EY, Luder AS, Assy NN, et al. LDL oxidation is associated with increased blood hemoglobin A1c levels in diabetic patients. *Clin Chim Acta*. 2007;377(1–2):114–8.
94. Spessatto D, Brum LMB dos P, Camargo JL. Oxidized LDL but not total LDL is associated with HbA1c in individuals without diabetes. *Clin Chim Acta*. 2017;471(June):171–6.
95. Poznyak A V., Nikiforov NG, Markin AM, Kashirskikh DA, Myasoedova VA, Gerasimova E V., et al. Overview of OxLDL and Its Impact on Cardiovascular Health: Focus on Atherosclerosis. *Front Pharmacol*. 2021;11(January):1–11.
96. Ramos-Arellano LE, Muñoz-Valle JF, De la Cruz-Mosso U, Salgado-Bernabé AB, Castro-Alarcón N, Parra-Rojas I. Circulating CD36 and oxLDL levels are associated with cardiovascular risk factors in young subjects. *BMC Cardiovasc Disord*. 2014;14:1–7.
97. Fernández-Miranda C, Pulido F, Carrillo JL, Larumbe S, Izquierdo TG, Ortuño B, et al. Lipoprotein alterations in patients with HIV infection: Relation with cellular and humoral immune markers. *Clin Chim Acta*. 1998;274(1):63–70.
98. Fon Tacer K, Rozman D. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Focus on Lipoprotein and Lipid Deregulation. *J Lipids*. 2011;2011:1–14.
99. Kawano Y, Cohen DE. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol*. 2013;48(4):434–41.
100. Kolodziejczyk AA, Zheng D, Shibolet O, Elinav E. The role of the microbiome in NAFLD and NASH. *EMBO Mol Med*. 2019;11(2):1–13.
101. Armstrong AJS, Shaffer M, Nusbacher NM, Griesmer C, Fiorillo S, Schneider

- JM, et al. An exploration of Prevotella-rich microbiomes in HIV and men who have sex with men. *Microbiome*. 2018;6(1):1–16.
102. Dong TS, Luu K, Lagishetty V, Sedighian F, Woo SL, Dreskin BW, et al. Gut microbiome profiles associated with steatosis severity in metabolic associated fatty liver disease. *Hepatoma Res*. 2021;7:1–11.
 103. Noguera-Julian M, Rocafort M, Guillén Y, Rivera J, Casadellà M, Nowak P, et al. Gut Microbiota Linked to Sexual Preference and HIV Infection. *EBioMedicine*. 2016;5:135–46.
 104. Boursier J, Mueller O, Barret M, Machado M, Fizanne L, Araujo-Perez F, et al. The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. *Hepatology*. 2016;63(3):764–75.
 105. Mejía-León ME, Petrosino JF, Ajami NJ, Domínguez-Bello MG, De La Barca AMC. Fecal microbiota imbalance in Mexican children with type 1 diabetes. *Sci Rep*. 2014;4:1–5.
 106. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen Y-Y, Keilbaugh SA, et al. Linking Long-Term Dietary Patterns with. *Science* (80-). 2011;334(6052):105–9.
 107. Scher JU, Sczesnak A, Longman RS, Segata N, Ubeda C, Bielski C, et al. Expansion of intestinal Prevotella copri correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *Elife*. 2013;2:1–20.
 108. Nolte CH, Jungehulsing GJ, Muller-Nordhorn J, Rossnagel K, Roll S, Willich SN, et al. The Berlin Acute Stroke Study - Weak points and options to improve the management of patients with acute stroke. [German] Die Berliner Akuter Schlaganfall Studie - Schwachstellen und verbesserungsmöglichkeiten in der versorgung von patienten mit akutem sc. *Nervenheilkunde*. 2006;25(12):901-905 ST-The Berlin Acute Stroke Study-Weak.
 109. Pinto-Cardoso S, Lozupone C, Bricenõ O, Alva-Hernández S, Téllez N, Adriana A, et al. Fecal Bacterial Communities in treated HIV infected individuals on two antiretroviral regimens. *Sci Rep*. 2017;7:1–10.
 110. Pedersen HK, Gudmundsdottir V, Nielsen HB, Hyotylainen T, Nielsen T,

- Jensen BAH, et al. Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature*. 2016;535(7612):376–81.
111. Maeda Y, Kurakawa T, Umemoto E, Ito Y, Gotoh K, Hirota K, et al. Full Length Arthritis & Rheumatology This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting , typesetting , pagination and proofreading process which may lead to differences between this vers. 2016;2–36.
 112. Schwimmer JB, Johnson JS, Angeles JE, Behling C, Belt PH, Borecki I, et al. Microbiome Signatures Associated With Steatohepatitis and Moderate to Severe Fibrosis in Children With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2019;157(4):1109–22.
 113. Dong TS, Katzka W, Lagishetty V, Luu K, Hauer M, Pisegna J, et al. A Microbial Signature Identifies Advanced Fibrosis in Patients with Chronic Liver Disease Mainly Due to NAFLD. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–10.
 114. Hasegawa T, Iino C, Endo T, Mikami K, Kimura M, Sawada N, et al. Changed amino acids in nafld and liver fibrosis: A large cross-sectional study without influence of insulin resistance. *Nutrients*. 2020;12(5).
 115. Gaggini M, Carli F, Rosso C, Buzzigoli E, Marietti M, Della Latta V, et al. Altered amino acid concentrations in NAFLD: Impact of obesity and insulin resistance. *Hepatology*. 2018;67(1):145–58.
 116. Lynch CJ, Adams SH. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(12):723–36.
 117. Jian H, Miao S, Liu Y, Wang X, Xu Q, Zhou W, et al. Dietary Valine Ameliorated Gut Health and Accelerated the Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease of Laying Hens. Vol. 2021, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021.
 118. Igwe CU, Ewuga EE, Ujowundu CO, Onyechoa IO, Onwuliri VA. Serum protein concentration and amino acid profile of HIV/HBV co-infected subjects on HAART in Plateau State, Nigeria. *Afr Health Sci*. 2022;22(1):418–30.
 119. Ali Z, Shahzadi I, Majeed A, Malik HMT, Waseem S, Ahmed I, et al. Comparative analysis of the serum microbiome of HIV infected individuals.

- Genomics. 2021;113(6):4015–21.
120. Berglund P. Cost-benefit analysis for sustainable stormwater management. *Nature*. 2018;444(21):234–70.
 121. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006;444(7122):1027–31.
 122. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper L V., Gou YK, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(44):15718–23.
 123. Orbe-Orihuela YC, Lagunas-Martínez A, Bahena-Román M, Madrid-Marina V, Torres-Poveda K, Flores-Alfaro E, et al. High relative abundance of firmicutes and increased TNF- α levels correlate with obesity in children. *Salud Publica Mex*. 2018;60(1):5–11.
 124. Magne F, Gotteland M, Gauthier L, Zazueta A, Pesoa S, Navarrete P, et al. The firmicutes/bacteroidetes ratio: A relevant marker of gut dysbiosis in obese patients? *Nutrients*. 2020;12(5).
 125. Cook RR, Fulcher JA, Tobin NH, Li F, Lee D, Woodward C, et al. Combined effects of HIV and obesity on the gastrointestinal microbiome of young men who have sex with men. *HIV Med*. 2020;21(6):365–77.
 126. Boillot J, Alamowitch C, Berger A-M, Luo J, Bruzzo F, Bornet FRJ, et al. Effects of dietary propionate on hepatic glucose production, whole-body glucose utilization, carbohydrate and lipid metabolism in normal rats. *Br J Nutr*. 1995;73(2):241–51.
 127. Deng M, Qu F, Chen L, Liu C, Zhang M, Ren F, et al. SCFAs alleviated steatosis and inflammation in mice with NASH induced by MCD. *J Endocrinol*. 2020;245(3):425–37.
 128. Vasques-Monteiro IML, Silva-Veiga FM, Miranda CS, de Andrade Gonçalves ÉCB, Daleprane JB, Souza-Mello V. A rise in Proteobacteria is an indicator of gut-liver axis-mediated nonalcoholic fatty liver disease in high-fructose-fed adult mice. *Nutr Res*. 2021;91:26–35.
 129. San-Juan-Vergara H, Zurek E, Ajami NJ, Mogollon C, Peña M, Portnoy I, et

- al. A Lachnospiraceae-dominated bacterial signature in the fecal microbiota of HIV-infected individuals from Colombia, South America. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–13.
130. Parbie PK, Mizutani T, Ishizaka A, Kawana-Tachikawa A, Runtuwene LR, Seki S, et al. Dysbiotic Fecal Microbiome in HIV-1 Infected Individuals in Ghana. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11(May):1–13.
 131. Mutlu EA, Keshavarzian A, Losurdo J, Swanson G, Siewe B, Forsyth C, et al. A Compositional Look at the Human Gastrointestinal Microbiome and Immune Activation Parameters in HIV Infected Subjects. *PLoS Pathog.* 2014;10(2).
 132. Xie Y, Sun J, Wei L, Jiang H, Hu C, Yang J, et al. Altered gut microbiota correlate with different immune responses to HAART in HIV-infected individuals. 2021;1–12.
 133. Vesterbacka J, Rivera J, Noyan K, Parera M, Neogi U, Calle M, et al. Richer gut microbiota with distinct metabolic profile in HIV infected Elite Controllers. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–13.
 134. Dillon SM, Lee EJ, Kotter C V., Austin GL, Dong Z, Hecht DK, et al. An altered intestinal mucosal microbiome in HIV-1 infection is associated with mucosal and systemic immune activation and endotoxemia. *Mucosal Immunol.* 2014;7(4):983–94.
 135. Shen F, Zheng RD, Sun XQ, Ding WJ, Wang XY, Fan JG. Gut microbiota dysbiosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2017;16(4):375–81.
 136. Del Chierico F, Nobili V, Vernocchi P, Russo A, Stefanis C De, Gnani D, et al. Gut microbiota profiling of pediatric nonalcoholic fatty liver disease and obese patients unveiled by an integrated meta-omics-based approach. *Hepatology.* 2017;65(2):451–64.
 137. Grabherr F, Grandner C, Effenberger M, Adolph TE, Tilg H. Gut Dysfunction and Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10(September):1–9.
 138. Boursier J, Diehl AM. Implication of Gut Microbiota in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS Pathog.* 2015;11(1):1–6.

139. Ozato N, Saito S, Yamaguchi T, Katashima M, Tokuda I, Sawada K, et al. *Blautia* genus associated with visceral fat accumulation in adults 20–76 years of age. *npj Biofilms Microbiomes*. 2019;5(1):1–9.
140. Worsening P. crossm Depletion of *Blautia* Species in the Microbiota of Obese Children Relates to Intestinal Inflammation and Metabolic.
141. Liu C, Li J, Zhang Y, Philip A, Shi E, Chi X, et al. Influence of glucose fermentation on CO₂ assimilation to acetate in homoacetogen *Blautia coccoides* GA-1. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2015;42(9):1217–24.
142. Png CW, Lindén SK, Gilshenan KS, Zoetendal EG, McSweeney CS, Sly LI, et al. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *Am J Gastroenterol*. 2010;105(11):2420–8.
143. O’Sullivan A, He X, McNiven EMS, Haggarty NW, Lönnerdal B, Slupsky CM. Early diet impacts infant rhesus gut microbiome, immunity, and metabolism. *J Proteome Res*. 2013;12(6):2833–45.
144. Duarte SMB, Stefano JT, Oliveira CP. Microbiota and nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis (NAFLD/NASH). *Ann Hepatol*. 2020;19(5):458–65.
145. Da Silva HE, Teterina A, Comelli EM, Taibi A, Arendt BM, Fischer SE, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with dysbiosis independent of body mass index and insulin resistance. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–12.
146. Duarte SMB, Stefano JT, Miele L, Ponziani FR, Souza-Basqueira M, Okada LSRR, et al. Gut microbiome composition in lean patients with NASH is associated with liver damage independent of caloric intake: A prospective pilot study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2018;28(4):369–84.
147. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux JJ, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(43):16731–6.
148. Chávez-Carbajal A, Nirmalkar K, Pérez-Lizaur A, Hernández-Quiroz F, Ramírez-Del-Alto S, García-Mena J, et al. Gut microbiota and predicted

- metabolic pathways in a sample of Mexican women affected by obesity and obesity plus metabolic syndrome. *Int J Mol Sci.* 2019;20(2):1–18.
149. Franco-De-Moraes AC, De Almeida-Pititto B, Da Rocha Fernandes G, Gomes EP, Da Costa Pereira A, Ferreira SRG. Worse inflammatory profile in omnivores than in vegetarians associates with the gut microbiota composition. *Diabetol Metab Syndr.* 2017;9(1):1–8.
 150. Imahashi M, Ode H, Kobayashi A, Nemoto M, Matsuda M, Hashiba C, et al. Impact of long-term antiretroviral therapy on gut and oral microbiotas in HIV-1-infected patients. *Sci Rep.* 2021;11(1):1–10.
 151. Lozupone CA, Li M, Campbell TB, Flores SC, Linderman D, Gebert MJ, et al. Alterations in the gut microbiota associated with HIV-1 infection. *Cell Host Microbe.* 2013;14(3):329–39.
 152. Ako SE, Nkenfou CN, Assob JN, Pokam TB. Characterization and Profiling of Gut Bacterial Microbiome and Pathobionts among HIV-negative and HIV-infected individuals in Cameroon. 2022;1–21.
 153. Art T, Association S, Ishizaka A, Koga M, Mizutani T, Prawisuda D, et al. Unique Gut Microbiome in HIV Patients on Antiretroviral. 2021;(August):1–13.
 154. Han W, Huang C, Ji Y, Zhou L, Chen J, Hou J. Alterations in the Gut Microbiota and Hepatitis-B-Virus Infection in Southern Chinese Patients With Coexisting Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Type-2 Diabetes Mellitus. *Front Med.* 2021;8(December).
 155. Human Gut Microbiome [Internet]. *Megamonas funiformis*. 2020. Available from:
https://www.microbiomeatlas.org/species.php?species_msp=msp_0134
 156. Si J, Lee G, You HJ, Joo SK, Lee DH, Ku BJ, et al. Gut microbiome signatures distinguish type 2 diabetes mellitus from non-alcoholic fatty liver disease. *Comput Struct Biotechnol J.* 2021;19:5920–30.
 157. Rocafort M, Noguera-Julian M, Rivera J, Pastor L, Guillén Y, Langhorst J, et al. Evolution of the gut microbiome following acute HIV-1 infection. *Microbiome.* 2019;7(1):1–17.
 158. Jayanama K, Phuphuakrat A, Pongchaikul P, Prombutara P, Nimitphong H,

- Reutrakul S, et al. Association between gut microbiota and prediabetes in people living with HIV. *Curr Res Microb Sci.* 2022;3(May):100143.
159. Ouyang J, Lin J, Isnard S, Fombuena B, Peng X, Marette A, et al. The Bacterium *Akkermansia muciniphila*: A Sentinel for Gut Permeability and Its Relevance to HIV-Related Inflammation. *Front Immunol.* 2020;11(April):1–9.
160. Sejeong K, Lee Y, Kim Y, Seo Y, Lee H, Ha J, et al. *Akkermansia muciniphila* Prevents Fatty Liver Disease, Decreases Serum Triglycerides, and Maintains Gut Homeostasis. 2020;86(7):1–9.
161. Microbiome Atlas [Internet]. *Akkermansia muciniphila*. 2020. Available from: https://www.microbiomeatlas.org/species.php?species_msp=msp_0025
162. Xu Y, Wang N, Tan HY, Li S, Zhang C, Feng Y. Function of *Akkermansia muciniphila* in Obesity: Interactions With Lipid Metabolism, Immune Response and Gut Systems. *Front Microbiol.* 2020;11(February):1–12.
163. Tricò D, Biancalana E, Solini A. Protein and amino acids in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2021;24(1):96–101.
164. Fatty PN, Leonetti S, Herzog RI, Caprio S, Santoro N, Tric D. Glutamate – Serine – Glycine Index : A Novel Potential Liver Disease.
165. Ziegler TR, Judd SE, Ruff JH, McComsey GA, Eckard AR. Amino Acid Concentrations in HIV-Infected Youth Compared to Healthy Controls and Associations with CD4 Counts and Inflammation. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2017;33(7):681–9.
166. Crenn P, De Truchis P, Neveux N, Galpérine T, Cynober L, Melchior JC. Plasma citrulline is a biomarker of enterocyte mass and an indicator of parenteral nutrition in HIV-infected patients. *Am J Clin Nutr.* 2009;90(3):587–94.
167. Van Waardenburg DA, De Betue CT, Luiking YC, Engel M, Deutz NE. Plasma arginine and citrulline concentrations in critically ill children: Strong relation with inflammation. *Am J Clin Nutr.* 2007;86(5):1438–44.
168. Lin YJ, Hsu CN, Lo MH, Huang CF, Chien SJ, Tain YL. High citrulline-to-arginine ratio associated with blood pressure abnormalities in children with early chronic kidney disease. *Circ J.* 2013;77(1):181–7.

169. Gostner JM, Becker K, Kurz K, Fuchs D. Disturbed amino acid metabolism in HIV: Association with neuropsychiatric symptoms. *Front Psychiatry*. 2015;6(JUL):1–10.

XIV. PRODUCTOS.





HOSPITAL CIVIL DE GUADALAJARA
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD

Otorgan la presente

CONSTANCIA

**HOLGUIN-AGUIRRE TANIA ELISA, GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ LUZ ALICIA, ALVAREZ-ZAVALA MONSERRAT,
HERNÁNDEZ-FLORES TERESITA DE JESÚS, ANDRADE-VILLANUEVA JAIME F., TOSCANO-PIÑA
MARCELA, TORRES-BAEZ CRISTINA, SÁNCHEZ-REYES KARINA.**

Con el trabajo: Caracterización de la microbiota intestinal, datos clínicos y antropométricos de personas que viven
con VIH (PVVIH) y enfermedad por hígado graso no alcohólico (NAFLD)

Por su participación en el: XX Concurso de Trabajos Libres e-Posteriores

Guadalajara, Jalisco. 6 al 9 de abril de 2022

Dr. Rafael Santana Ortiz
Director
Antiguo Hospital Civil de Guadalajara
"Fray Antonio Alcalde"

Dr. Jaime Federico Andrade Villanueva
Director General
Hospital Civil de Guadalajara

Dr. Benjamín Becerra Rodríguez
Director
Nuevo Hospital Civil de Guadalajara
"Dr. Juan I. Menchaca"

Dr. José Francisco Muñoz Valle
Rector
Centro Universitario de Ciencias de la Salud

Dra. María Elena González González
Presidente Ejecutivo
XXIII Congreso Internacional Avances en Medicina





HOSPITAL CIVIL DE GUADALAJARA
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD

Otorgan la presente

CONSTANCIA
TANIA ELISA
HOLGUIN AGUIRRE

Por su asistencia al módulo de: HIV
Guadalajara, Jalisco. 6 al 9 de abril de 2022

Valor Curricular: 30 horas

Libro: 1, Foja UdeG: 68

Dr. Rafael Santana Ortiz
Director
Antiguo Hospital Civil de Guadalajara
"Fray Antonio Alcalde"

Dr. Jaime Federico Andrade Villanueva
Director General
Hospital Civil de Guadalajara

Dr. Benjamín Becerra Rodríguez
Director
Nuevo Hospital Civil de Guadalajara
"Dr. Juan I. Menchaca"

Dr. José Francisco Muñoz Valle
Rector
Centro Universitario de Ciencias de la Salud

Dra. María Elena González
Presidente Ejecutivo
XXIII Congreso Internacional Avances en Medicina





HOSPITAL CIVIL DE GUADALAJARA
Subdirección General de Enseñanza e Investigación
Unidad de VIH del Antiquo Hospital Civil de Guadalajara
"Fray Antonio Alcalde"

otorgan el presente

RECONOCIMIENTO

a la

DRA. TANIA ELSA HOLGUÍN HERRERA

por su participación como Ponente en el

2do. Curso de Capacitación: Infección por VIH

en modalidad 100% virtual, con el tema:

"HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO EN VIH"

Atentamente

"La Salud del Pueblo es la Suprema Ley"
Guadalajara, Jalisco, 1 de Diciembre de 2021

Dr. Alfredo Ramos Ramos
Subdirector General de Enseñanza e Investigación
Hospital Civil de Guadalajara