



TESIS DOCTORAL

Impacto de la infección por el VIH en el desarrollo de la enfermedad hepática grasa y análisis de los condicionantes genéticos involucrados en la población infectada.

Marta Fernández Fuertes

Sevilla 2023

Directores:

Dr. Juan Macías Sánchez

Dr. Luis Miguel Real Navarrete

Tutor:

Dr. David Pozo Pérez

**Programa de Doctorado de Biología Molecular, Biomedicina e Investigación Clínica
Departamento de Medicina
Universidad de Sevilla**

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Facultad de Medicina

Doctorado en Biología Molecular, Biomedicina e Investigación Clínica

Dr. JUAN MACÍAS SÁNCHEZ, Facultativo Especialista de Área de la Unidad de Enfermedades Infecciosas y Microbiología, Hospital Universitario de Valme, y Profesor Asociado del Departamento de Medicina de la Universidad de Sevilla.

Dr. LUIS MIGUEL REAL NAVARRETE, Profesor del Departamento de Especialidades Quirúrgicas, Bioquímica e Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga.

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado *“Impacto de la infección por el VIH en el desarrollo de la enfermedad hepática grasa y análisis de los condicionantes genéticos involucrados en la población infectada”*, presentado por **Marta Fernández Fuertes**, ha sido realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario Virgen de Valme y autorizamos la presentación y la defensa de esta Tesis Doctoral, para que sea juzgada por el tribunal correspondiente.

Juan Macías Sánchez

Luis Miguel Real Navarrete

Sevilla, 2022

Agradecimientos

Acabar una tesis no es solo llegar al final de un proceso sino también empezar una nueva etapa. Este nuevo comienzo es gracias al apoyo y la confianza que me han regalado muchas personas a largo de este camino.

Desde mis tardíos comienzos en la ciencia en el CABIMER, pasando por mi inspiradora estancia en Yale University, hasta mi aterrizaje clínico en el Hospital de Valme, han pasado más de diez intensos años. En todos ellos, me he encontrado con gente maravillosa, de la que he aprendido muchísimo y que me ha acompañado hasta donde me encuentro ahora. En CABIMER, el Dr. Felipe Cortés y la acogedora gente que habitaba su laboratorio por aquella época, me enseñaron “todo lo necesario” para volar directamente a una de las Universidades más importantes del mundo. No hay suficientes “gracias” para vosotros: Rocío, Almu, Jenna, Ale, Cristina y, por supuesto, Jose. Felipe, tuviste la opción de darme una oportunidad y no lo dudaste; gracias por esa confianza en mí.

Gracias a la Dra. Yajaira Suárez por ser mi mentora en la Universidad de Yale y por, a pesar de mi poca experiencia en investigación, abrirme de par en par las puertas de tu laboratorio. Esto me brindó la oportunidad de conocer a Aran, Elisa, Manhaz y Alberto. A ellos tengo que agradecer su paciencia y, muy especialmente a mi querido Alber, su inagotable energía, cariño, enseñanzas y las cientos de experiencias vividas dentro y fuera del laboratorio. Gracias al Dr. Carlos Fernández-Hernando, por su apoyo y todos los lab meetings compartidos y muy especialmente a tí, Noe, por tu amistad, tu apoyo y por compartir todos estos años. Al resto de “Brandada” (Kepa, Asier y Lorea), sin ellos New Haven no hubiera sido lo mismo ni de lejos.

No me olvido tampoco de todas aquellas personas que estuvieron a mi lado y arrojaron durante aquellos años en USA, desde New Haven o desde la distancia en España, pero siempre cerca. En especial, Juan y Guille; Joe y Katie; Ariel y Flor; Ester; Koke, María y Camila.

Finalmente, llegué al Hospital de Valme. Gracias al Dr. Juan Antonio Pineda, y en especial a mis directores, los Drs. Juan Macías y Luis Miguel Real por vuestro apoyo y

confianza; y por la oportunidad de aterrizar en casa dentro de un grupo lleno de trabajadoras incansables y creadoras de equipo. Gracias a Marta, Marga, Jessica, Lucía y, en especial, a Anaïs y Pili por ese cariño y apoyo incondicional.

Qué duda cabe, que toda esta experiencia y aprendizaje han estado sazonados con unas personas muy importantes en mi vida que siempre estuvieron ahí y nunca dudaron en regalar un hombro, una conversación o un abrazo. A los Moreno y a los Mateos; a los Moreno-Villalta y en especial a Miguel Ángel y Pepi, que me han tratado y tratan como a una hija. A vosotros, Raquel, Ismael, Elisa y Ana, mis cachitos de mamá, que sois la constante de mi vida. A Juan Carlos, Laura y Taché, que siempre os he sentido cerca, familia. A Hugo, Julia, Antonio, Valentina y Fernando que dais color y alma por donde pasáis.

Y a ti, More ... y a ti, Estrella.

Índice

1. Abreviaturas.....	1
2. Resumen	3
3. Introducción	5
2.1 Definición de enfermedad hepática grasa.	5
2.2. Historia natural y progresión de la enfermedad hepática grasa.	5
2.3. Prevalencia de enfermedad hepática grasa.	8
2.3.1 Población general.....	8
2.3.2 Personas que viven con el VIH.	9
2.4. Factores de riesgo.	10
2.4.1. Factores metabólicos.	10
2.4.2. Factores genéticos.....	11
2.4.3. La infección por el VIH.....	12
2.4.3.1. Toxicidad al TAR en las PVIH.	12
2.4.3.2. Coinfección por VHC.....	14
2.5. Manejo y prevención.....	15
4. HIPÓTESIS.....	18
5. Objetivos	19
6. Pacientes y Métodos.....	20
4.1. Diseño del estudio y pacientes.....	20
4.2. Recogida de datos.	20
4.3. Análisis estadístico.	21
4.4. Estudio de asociación de genoma completo (GWAS).	22
4.4.1. Aislamiento del ADN, genotipado y controles de calidad del genotipado. ...	22
4.4.2. Imputación.	23
4.4.3. Estudio de asociación de un solo locus.	23
4.4.4. Estudio de asociación basado en genes y estudios de enriquecimiento.....	24
4.5. Consideraciones éticas.	24
7. Resultados.....	26

Objetivo 1: Evaluar el efecto de la infección por el VIH en el riesgo de desarrollar esteatosis hepática.....26

1. Características de la población de estudio.....26
2. Prevalencia de la esteatosis hepática según el estado de la infección por el virus del VIH.27
3. Factores asociados con la presencia de esteatosis hepática.....31

Objetivo 2: Determinar los factores genéticos asociados a la esteatosis hepática en población infectada por el VIH y las posibles rutas metabólicas implicadas.....34

1. Características de la población de estudio.....34
2. Análisis del estudio de asociación de genoma completo (GWAS).36
3. Análisis basados en la asociación de genes completos.39
4. Análisis de enriquecimiento.43
5. Análisis de los SNPs previamente asociados a la enfermedad hepática grasa en población general en estudios de GWAS.43
8. Discusión46
9. Conclusiones54
10. Bibliografía55
11. Anexos.....67

Anexo I: Polimorfismos genéticos identificados en estudios GWAS como asociados con la susceptibilidad a desarrollar EHGNA. Se indican los tamaños de efecto, los fenotipos concretos analizados y las etnias sobre las que se han realizado cada uno de los estudios.67

1. Abreviaturas

3TC/DTG: lamivudina/dolutegravir

APOB: apolipoproteína B

CAP: parámetro de atenuación controlada

CHC: carcinoma hepatocelular

CP: componentes principales

DMT2: diabetes mellitus tipo 2

EFV: efavirenz

EH: esteatosis hepática

EHG: enfermedad hepática grasa

EHGNA: enfermedad hepática grasa no alcohólica

EHNA: esteatohepatitis no alcohólica

FDR: tasa de descubrimientos falsos

GO: Gene Ontology

GWAS: estudio de asociación de genoma completo

HDL: lipoproteína de alta densidad

HSH: hombres que tienen sexo con hombres

IBS: identidad por estado

IC: intervalo de confianza

IMC: índice de masa corporal

INSTI: inhibidores de la integrasa

IP: inhibidores de la proteasa

ITIAN: inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleós(t)idos

ITINAN: inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleós(t)idos

LD: desequilibrio de unión

LDL: lipoproteína de baja densidad

LDL: lipoproteína de baja densidad

MAF: frecuencia alélica menor

MAFLD: enfermedad hepática grasa metabólica

OMS: organización mundial de la salud

OR: odds ratio

ORA: odds ratio ajustada

PVIH: personas que viven con el VIH

RAL: raltegravir

RH: rigidez hepática

RM: resonancia magnética

RVS: respuesta viral sostenida

SM: síndrome metabólico

SNP: polimorfismo de nucleótido simple

TAF: tenofovir alafenamida

TAR: terapia antirretroviral

TAF/FTC/BIC: tenofovir alafenamida/emtricitabina/bictarvy

TDF: tenofovir disopropil fumarato

UDVP: usuarios de drogas por vía parenteral

VHC: virus de la hepatitis C

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad

2. Resumen

La enfermedad hepática grasa (EHG), y en concreto la enfermedad hepática no alcohólica (EHGNA), constituye la causa principal de enfermedad hepática crónica en el mundo estimándose su frecuencia en la población general caucásica en un 25%. La EHG abarca desde la simple presencia de grasa en el hígado, sin ninguna complicación adicional, hasta fases más avanzadas como la esteatohepatitis (EH) o el carcinoma hepatocelular (CHC), que suponen un grave problema de salud. Los factores metabólicos, sobre todo la obesidad, son los que más condicionan el desarrollo de la EHG. Además, se ha demostrado que tiene una alta heredabilidad, identificándose variantes génicas, como la del gen *PNPLA3*, que aumentan la susceptibilidad a padecerla.

La EHG es muy frecuente en las personas que viven con el VIH (PVIH) (40%-70%). La razón por la que esto ocurre no está aclarada, aunque tampoco se han realizado estudios comparando las frecuencias de la enfermedad en individuos infectados y no infectados por el VIH de una misma población. Diferentes estudios han demostrado que la obesidad también es el principal factor asociado al desarrollo de la EHG en esta población. Para explicar la aparente mayor frecuencia de la EHG en estos individuos se ha hipotetizado que la propia infección por el VIH podría estar implicada en esta mayor susceptibilidad. Sin embargo, esto no se ha demostrado. Además, los factores genéticos de susceptibilidad identificados en la población general no parecen tener efecto en las PVIH, lo que sugiere que deben existir otros condicionantes genéticos específicos de la población de infectados para una enfermedad con tan alta heredabilidad. Su identificación podría ayudar a clasificar a estos individuos según su riesgo y establecer las bases para el diseño de estrategias terapéuticas aplicables específicamente a esta población.

Por tanto, los objetivos de esta tesis fueron, por un lado, analizar si la infección por el VIH era un factor independiente de desarrollo de la EHG, y por otro, analizar si existen condicionantes genéticos específicos de susceptibilidad a la EHG en la población de PVIH.

El primer objetivo se analizó en una población de 574 infectados por el virus de la hepatitis C (VHC) de los que el 43% estaban coinfectados por el VIH. No hubo diferencias en la frecuencia de la EHG entre infectados y no infectados por el VIH. No se identificó la infección por el VIH como un factor de riesgo independiente para desarrollar la EHG. No obstante, en el análisis multivariante, el índice de masa corporal (IMC), la edad y la infección con el genotipo 3 del VHC se asociaron de forma independiente con la presencia de EH. Para el segundo objetivo se llevó a cabo un estudio de asociación de genoma completo (GWAS) en 474 individuos infectados por el VIH de los que el 39% presentaban la EHG. No se identificó ningún polimorfismo, gen o ruta molecular asociada de forma estadísticamente significativa a la EHG. A pesar de ello se identificaron señales sugestivas de estar asociadas que necesitan de una validación externa.

Por todo lo anterior concluimos, primero, que la infección por el VIH *per se* no condiciona el desarrollo de la EHG. La supuesta mayor prevalencia de la EHG en esta población puede ser debida a una infravaloración de la frecuencia de la enfermedad en la población general, por lo que se hace necesario estudios de prevalencia de esta enfermedad en nuestra población general. También concluimos, en segundo lugar, que los factores genéticos no parecen jugar un papel importante en la susceptibilidad a la EHG en las PVIH. Sin embargo, hemos identificado señales específicas de bajo efecto para esta población que deben ser validadas. De confirmarse, estos resultados podrían esclarecer la etiología molecular de la EHG en personas infectadas por el VIH.

3. Introducción

2.1 Definición de enfermedad hepática grasa.

La enfermedad hepática grasa (EHG) y, en concreto, la desarrollada en ausencia de consumo de alcohol (EHGNA), se ha convertido en una de las causas más comunes de enfermedad hepática crónica en el mundo. El sedentarismo y la abundante ingesta de comida rápida, rica en grasas y carbohidratos refinados, ha dado lugar a una epidemia de obesidad generalizada que lleva aparejada múltiples problemas de salud a nivel global¹ entre los que se encuentran enfermedades hepáticas, cardiovasculares y renales.

La EHGNA se define como el exceso de grasa acumulada en más del 5-10% de los hepatocitos, excluyendo la acumulación secundaria de grasa en el hígado debida a un exceso de consumo de alcohol (más de 20 g/día en mujeres o más de 30 g/día en hombres²), a la exposición a fármacos o a determinados desordenes genéticos^{2,3}.

El espectro clínico de enfermedades hepáticas asociadas a la EHGNA abarca desde la simple acumulación de grasa en el hígado (esteatosis hepática), normalmente asintomática y no progresiva, pasando por la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) o forma progresiva de la EHGNA, marcada por el daño hepático (balonización), la inflamación y la fibrosis, pudiendo conducir al desarrollo de fibrosis hepática avanzada, cirrosis y carcinoma hepatocelular (CHC)^{1,4-6}.

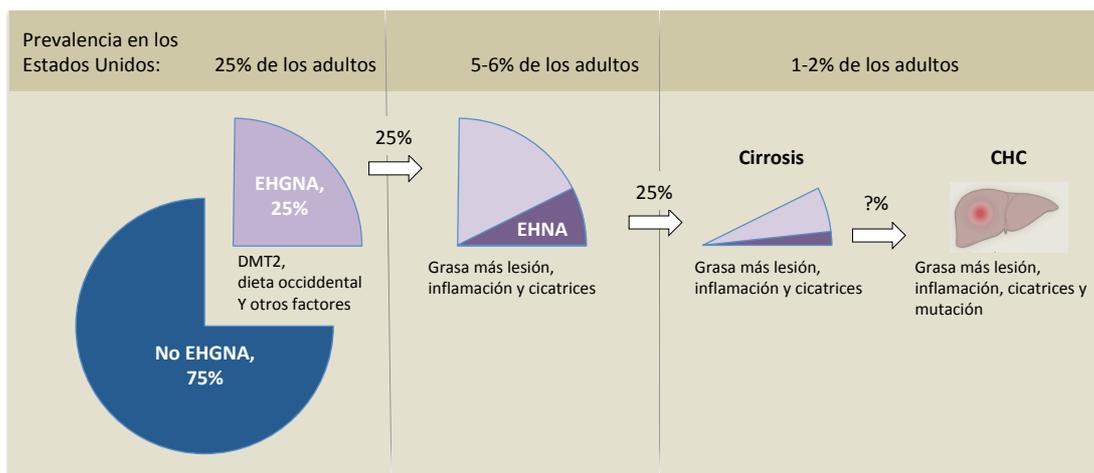
El término EHGNA para definir esta enfermedad se sigue utilizando como terminología preferente. Sin embargo, existen debates en torno a la denominación conforme avanza el conocimiento de la enfermedad y los métodos de diagnóstico de la misma. En este sentido, se ha sugerido una nomenclatura que refleja mejor la patogénesis de la enfermedad: disfunción metabólica asociada a enfermedad hepática grasa (MAFLD en inglés)^{7,8}. No obstante lo anterior, y debido a la falta de criterio universal en cuanto a la idoneidad de la definición de MAFLD, en esta tesis se usará el término EHGNA ya que, además, es el término usado en la mayoría de los estudios científicos consultados en este trabajo.

2.2. Historia natural y progresión de la enfermedad hepática grasa.

La aparición de la esteatosis hepática (EH) puede progresar a EHNA, caracterizada histológicamente por la balonización e inflamación hepatocelular, así como la posterior aparición de la fibrosis⁹, pudiendo desencadenar ésta la progresión hacia estadios más avanzados dando como resultado la aparición de CHC. La progresión de la fibrosis es significativamente más rápida cuando aparece el componente inflamatorio de la EHNA, donde aproximadamente el 20% de los individuos se consideran “progresores rápidos” pasando de una etapa a otra en menos de 7 años¹⁰.

En términos de porcentajes, un estudio llevado a cabo en Estados Unidos determinó que el 25% de la población adulta desarrolla EH, entre un 5-6% progresan a EHNA y un 1-2% desarrollan cirrosis y CHC¹¹ (figura 1).

Figura 1. Historia natural de la EHGNA (adaptada de Diehl MA *et al.*, 2017¹¹).



Abreviaturas: EHGNA: enfermedad hepática grasa no alcohólica; EHNA: esteatohepatitis; CHC: carcinoma hepatocelular.

La EH no es considerada un problema de salud grave. Sin embargo, su evolución a la EHNA, fibrosis, cirrosis y/o CHC, aunque es un proceso lento, supone un problema serio de salud¹². De hecho, Angulo *et al.*, en 2015, establecieron que es el grado de fibrosis hepática, y no la EH, lo que está directamente asociado con la mortalidad global en pacientes con EHGNA¹³. De esta forma, la mortalidad global fue 3 veces mayor en pacientes con un grado de fibrosis F3-F4 (según la escala METAVIR y la clasificación de Scheuer^{14,15}) que en aquellos sin fibrosis avanzada. Esto se comprobó también para el riesgo de desarrollar CHC. Así, pacientes con EHGNA con un grado de

fibrosis F3-F4 presentaban casi 7 veces más riesgo de este tipo de cáncer que aquellos sin fibrosis avanzada¹⁶. No obstante, existe una proporción de pacientes con EHGNA y sin fibrosis avanzada que están en riesgo de desarrollar CHC debido a alteraciones del metabolismo de los lípidos relacionados con el síndrome metabólico². Por ello, tanto la EHGNA en sus primeras fases así como la EHNA están postulándose como las principales causas de trasplante hepático en Estados Unidos⁴.

A pesar de ello, y puesto que los individuos con EH están en riesgo de desarrollar fases más agresivas de la enfermedad, es importante identificar aquellos factores involucrados en la aparición de la EH con el objetivo de, primero, clasificar a los individuos según su riesgo y, segundo, profundizar en el conocimiento de esta patología y encontrar posibles vías de tratamiento.

También es importante tener en cuenta que la EHGNA está asociada a manifestaciones extra-hepáticas que pueden aumentar el riesgo de progresión de esta enfermedad y no siempre hacia desenlaces hepáticos. En este sentido, en la mayoría de los pacientes, la EHGNA se asocia con resistencia a la insulina, hipertensión, dislipemia y sobrepeso u obesidad. Todos ellos son factores de riesgo de enfermedad cardiovascular¹⁷. De hecho, entre los pacientes con EHGNA, la enfermedad cardiovascular es la causa más común de muerte⁴, junto con una alta prevalencia de desarrollo de enfermedad renal crónica¹⁸.

Aunque la historia natural de la EHGNA en el contexto de la infección por el VIH no se conoce bien, existen datos de un estudio que, aunque limitado en número de pacientes, apunta a que estos individuos presentan un curso más acelerado que el observado en la población general¹⁹. En relación con las PVIH, Macías *et al.*, en un estudio llevado a cabo en 2012 con pacientes coinfectados por el VIH y el VHC, observaron desarrollo de EH en un 40% de los mismos, de los que un 23% evolucionaron a EH severa²⁰, entendida ésta, según el criterio de Brunt²¹, como la EH en la que más del 66% de los hepatocitos presentan exceso de grasa acumulada. Por otra parte, el 18% del total de pacientes desarrollaron EHNA, cuya persistencia se relacionó con la progresión de la fibrosis. Es por todo esto que, tras la virtual erradicación de la infección por el VHC con la llegada de los nuevos antivirales de

acción directa frente a este virus, el nuevo reto para la mejora de la salud de las PVIH será la identificación, caracterización y tratamiento de la EHGNA.

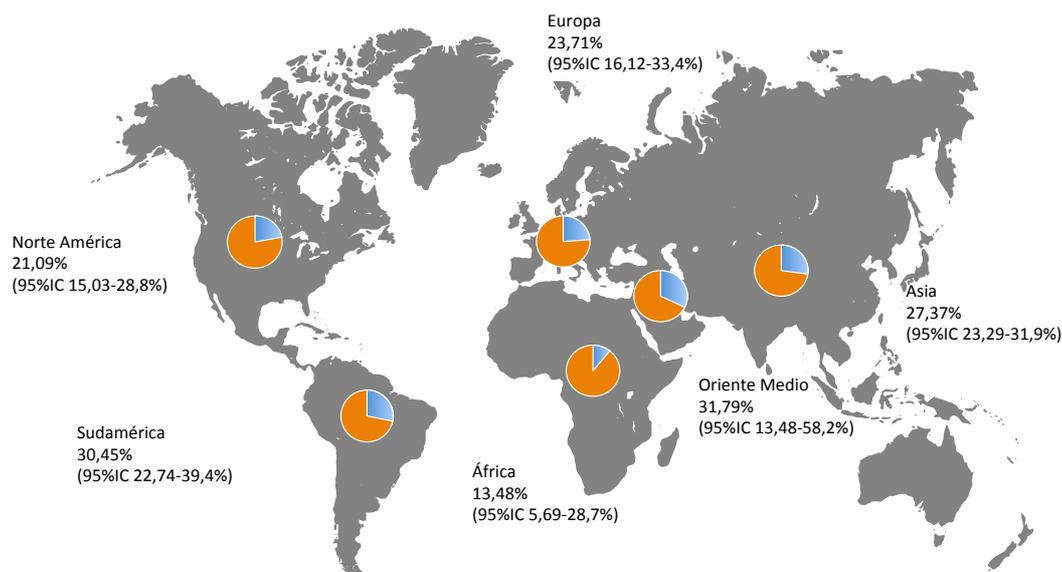
2.3. Prevalencia de enfermedad hepática grasa.

2.3.1 Población general.

Aunque la EHGNA varía entre zonas geográficas, la prevalencia a nivel global está creciendo, estimándose entorno al 25% en la población general, mientras que en el caso de la EHNA se encuentra entre el 3 y el 5%, aumentando ambas a la par que lo hace la obesidad y el sedentarismo¹⁶. De esta forma el 51% de los pacientes con EHGNA son obesos, el 23% presentan diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), el 69% hiperlipidemia, el 39% son hipertensos y el 42% han desarrollado síndrome metabólico¹⁶. En este sentido, las zonas geográficas con un mayor desarrollo económico, caracterizadas por un estilo de vida sedentario y con sobre-nutrición, acumulan más prevalencia de la EHGNA que las zonas con menos desarrollo económico o más rurales⁴.

En el meta-análisis llevado a cabo por Younossi *et al.* en 2016, se observaron diferencias en la prevalencia de la EHGNA por regiones geográficas¹⁶, tal y como muestra la figura 2. Así, Sudamérica y Oriente Medio fueron las regiones con mayor prevalencia, mientras que en África se observó la menor prevalencia. Europa presentó una prevalencia similar a la de Estados Unidos, 24%, con una frecuencia ascendente de sur a norte de Europa.

Figura 2. Prevalencia mundial de la EHGNA por zonas geográficas (adaptada de Younossi *et al.*, 2016¹⁶).



2.3.2 Personas que viven con el VIH.

En las PVIH la prevalencia de la EHGNA se ha estimado entorno al 35-48%²²⁻²⁴ utilizando técnicas de imagen como la tomografía computerizada, la resonancia magnética nuclear o la elastometría de transición hepática con parámetro de atenuación controlada (CAP) como métodos diagnósticos. Estudios realizados con biopsia hepática, considerado el método de referencia para el diagnóstico de la EHGNA, sitúan la prevalencia entorno al 60-70%²⁵⁻²⁷. No obstante, en un meta-análisis llevado a cabo por Machado MV *et al.* en 2010, donde se incluyeron estudios en los que el diagnóstico de la EH se realizó mediante biopsia hepática, las tasas de prevalencia de la EHGNA van desde el 23% al 72% en pacientes coinfectados por el VIH y el VHC²⁸. Este amplio rango de prevalencia observado puede ser debido a la heterogeneidad de las poblaciones de estudio.

En cualquier caso, estas tasas de prevalencia parecen ser significativamente mayores a las observadas para la población general y se acercan a la tasa de prevalencia de la EHGNA observada en individuos con obesidad y/o DMT2². No obstante, es muy importante señalar que hay una manifiesta escasez de estudios de base poblacional amplia que comparen cifras de prevalencia entre individuos infectados y no infectados por el VIH procedentes de la misma área y analizados con una metodología uniforme. En el estudio más amplio que ha abordado este tema²⁹, se incluyeron 254 individuos infectados por el VIH y 465 no infectados, todos ellos de la “Multicenter AIDS cohort

Study” compuesta por hombres que tienen sexo con hombres (HSH), reportándose una prevalencia de la EHGNA del 13% y del 19% respectivamente. Sin embargo, el hecho de que en este trabajo se incluyera una proporción importante de individuos de raza negra, los cuales son menos susceptibles de sufrir esta enfermedad, y de que todos fueran HSH, limita la extrapolación de los resultados. Por otra parte, dos estudios más recientes^{19,30} reportaron una mayor frecuencia de la EHGNA en individuos infectados por el VIH que en la población general. Sin embargo, la mayor limitación de estos estudio fue el reducido número de individuos incluidos.

Por tanto, aunque se acepta una mayor prevalencia de la EHGNA entre las PVIH que entre la población general, es necesario llevar a cabo estudios de base poblacional amplia que lo confirmen y que identifiquen la infección por el VIH como un factor de riesgo independiente de susceptibilidad a sufrir la enfermedad.

2.4. Factores de riesgo.

Las variaciones geográficas observadas en la prevalencia de la EHGNA están íntimamente relacionadas con complejas interacciones entre los diferentes factores de riesgo asociados a la misma. Aunque los principales factores de riesgo asociados a la aparición de la EHGNA son los factores metabólicos, otros determinantes, como factores ambientales y genéticos, juegan también un papel importante en el desarrollo y progresión de la enfermedad.

2.4.1. Factores metabólicos.

En relación a los factores metabólicos, la obesidad y la DMT2 son los principales factores asociados al desarrollo y progresión de la EHGNA⁶. Sin embargo, otros componentes del síndrome metabólico (SM) como la dislipemia o la hipertensión también se incluyen dentro de los factores metabólicos implicados en el aumento del riesgo en la aparición de la EHGNA. En este sentido, la prevalencia de la EHGNA aumenta hasta el 80-90% entre las personas obesas y hasta el 69% en aquellas con DMT2⁵.

El sobrepeso, considerado como un índice de masa corporal (IMC) superior a 25 kg/m² según la OMS (<http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/nutrition/a-healthy-lifestyle/body-mass-index-bmi>) es el único factor

metabólico asociado de forma inequívoca a la EHGNA confirmándose tanto en población general¹, como en la población infectada por el VIH^{23,24,31,32}.

En relación a la DMT2, ésta está considerada como un factor determinante en la progresión de la EHGNA a la EHNA, favoreciendo la aparición de la fibrosis hepática y el CHC. Del mismo modo, la resistencia a la insulina, como base etiológica de la DMT2, está asociada a la EHGNA considerándose como un factor importante de riesgo en la aparición de la misma⁶.

Finalmente, el SM, fundamentalmente sus manifestaciones relacionadas con la dislipemia y la hipertensión, está asociado a diferentes procesos moleculares vinculados con el metabolismo de lípidos y triglicéridos y, por tanto, asociado al riesgo de aparición de la EHGNA. Estas alteraciones lipídicas producen efectos aterogénicos dando como resultado el desarrollo de enfermedades cardiovasculares en los pacientes con EHGNA⁶.

2.4.2. Factores genéticos.

En el desarrollo de la EHGNA, como enfermedad compleja y, por tanto, multifactorial, también están involucrados factores genéticos del individuo. Así lo indica la alta heredabilidad de esta enfermedad, estimada en torno al 25-30%³³⁻³⁵. Mediante estudios de asociación génica masivos o “Genome Wide Association Studies” (GWAS), se han detectado polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs, del inglés *single nucleotide polymorphisms*) relacionados con el desarrollo y progresión de la EHGNA en población general^{35,36,45-48,37-44} (Anexo I). Estos estudios permiten también identificar aquellos genes que puedan estar relacionados con la etiología de la enfermedad (Anexo I).

Algunos de estos SNPs ligados a la EHGNA en la población general han sido también evaluados en poblaciones de las PVIH. Así, en un estudio pionero llevado a cabo en una cohorte de HSH infectados por el VIH²⁹, sólo la variante *PNPLA3_rs738409* se asoció a la presencia de la EHGNA. No obstante, en un estudio más amplio liderado por nuestro grupo y donde se analizaron casi todos estos SNPs⁴⁹, no se pudo validar la asociación de la variante del gen *PNPLA3* con la EHGNA en las PVIH y sólo se identificaron como asociadas a la EHGNA y la EHNA de forma independiente la variante del gen *LPPR4* y

SAMM50, respectivamente. De forma importante, la falta de asociación de la variante génica *PNPLA3* con la EHGNA en la población infectada también fue observada por otros autores⁵⁰⁻⁵². En otro estudio llevado a cabo por nuestro grupo⁵³, también se encontró una asociación de tres variantes del gen *FTO* con la EHGNA en las PVIH. Interesantemente, esta asociación fue validada en un grupo independiente de las PVIH⁵³.

Todos estos resultados en su conjunto sugieren que, en la susceptibilidad genética a padecer esta enfermedad de alta heredabilidad en las PVIH, podrían tener un peso específico importante variantes alélicas que en la población general pudieran tener un efecto nulo o menor. Esta circunstancia explicaría también el por qué *PNPLA3*, identificado globalmente como un gen de la EHGNA, sería relativamente poco importante en el establecimiento de la enfermedad en las PVIH. Hasta la fecha, esta posibilidad está poco explorada debido a la ausencia de estudios de asociación génica masivos para la EHGNA en el contexto de la infección por el VIH.

2.4.3. La infección por el VIH.

La EHGNA en las PVIH podría tener rasgos etiológicos propios y, en cierta medida, diferentes a los observados en la población general. Esto podría explicar las sugeridas diferencias en frecuencia de la enfermedad y la posible existencia de factores genéticos distintos a los descritos en la población general.

Además, la infección por el VIH lleva asociada la concurrencia de otros factores que podrían estar implicados en una mayor susceptibilidad a la aparición de la EHGNA como son la toxicidad al tratamiento antirretroviral (TAR) y la coinfección por el VHC.

2.4.3.1. Toxicidad al TAR en las PVIH.

La aparición de los tratamientos antirretrovirales a mitad de los años 90 supuso una reducción importante en las complicaciones asociadas a la infección por el VIH y al desarrollo del SIDA, principalmente la mortalidad prematura. El acceso a estos tratamientos supuso la disminución de la carga viral del VIH a niveles indetectables y la recuperación del recuento de células T CD4+ en las PVIH⁵⁴. Históricamente la toxicidad asociada a estos tratamientos farmacológicos ha sido un factor a considerar debido principalmente a su administración indefinida y a la imposibilidad de la erradicación

del virus con dicho tratamiento⁵⁵. No obstante, el desarrollo de estos tratamientos ha significado una mejoría no sólo en la conveniencia de las combinaciones de fármacos, sino también en los efectos secundarios del mismo. Sin embargo, incluso los tratamientos más actuales llevan aparejados efectos secundarios aunque manejables y adaptables a las posibles comorbilidades de los pacientes⁵⁶.

En los pacientes con tratamiento antirretroviral que alcanzan la supresión virológica y que se aproximan a la desactivación inmunitaria, el efecto sobre la aparición de hipertrigliceridemia y la resistencia a la insulina causadas por el propio virus tiene un impacto muy reducido²⁵. No obstante, ciertos tratamientos antirretrovirales podrían influir negativamente sobre el metabolismo lipídico⁵⁷. Además, el aumento de peso es habitual en los pacientes que inician TAR, aunque este efecto se ha relacionado con una recuperación de la salud de las PVIH tras el inicio del tratamiento. A esto se une que el aumento de peso también se ha asociado con algunos cambios en la combinación de fármacos del tratamiento antirretroviral en las PVIH^{58,59}.

Así, los efectos adversos relacionados con el metabolismo lipídico que provoca el tratamiento antirretroviral se han observado en los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleós(t)idos (ITIANs) y en inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (ITINANs)⁶⁰, aunque también se han reportado en aquellos regímenes basados en inhibidores de la proteasa (IPs)^{57,61}. También se ha observado que el cambio de regímenes basados en inhibidores de la proteasa a inhibidores de la integrasa se ha asociado a una mejora en el perfil lipídico de estos pacientes⁵⁷. Finalmente, se ha reportado, recientemente, la implicación del cambio del TAR de tenofovir disoproxil fumarato (TDF) a tenofovir alafenamida (TAF) en el aumento de peso además del desarrollo de obesidad y dislipemia en las PVIH^{58,59}.

Los mecanismos implicados en estos efectos del TAR sobre el metabolismo con impacto sobre la aparición de EH son diversos, pero principalmente centrados en la disfunción mitocondrial⁶². La mitocondria es la responsable de la producción de energía dentro de la célula en cuya pérdida de homeostasis estarían involucrados procesos de toxicidad y daño en el ADN mitocondrial⁶³. En la mitocondria hepática, esta disfunción podría producir la incapacidad de llevar a cabo la oxidación de ácidos grasos dando como resultado la acumulación de triglicéridos y, con ello, el desarrollo

de EHG⁶⁴. Numerosos trabajos han mostrado una disfunción en la mitocondria y en las funciones de señalización celular en las PVIH y bajo tratamiento antirretroviral⁶⁵⁻⁶⁷. Así, los ITIANs pueden inhibir a la gamma polimerasa mitocondrial que, en último término, causa disfunción mitocondrial²⁵. No obstante, los ITIANs más modernos están menos implicados en toxicidad mitocondrial clínicamente significativa, por lo que su contribución al desarrollo de EHG es menor²⁵. Los IPs producen dislipemia como efecto adverso. El mecanismo por el cual los IPs producen dislipemia no está del todo claro, pero parece estar relacionado con la apolipoproteína B (APOB) presente en las lipoproteínas LDL y VLDL, responsables del transporte de colesterol y triglicéridos producidos en el hígado²⁵. Este trastorno metabólico podría asociarse con el desarrollo de EHG.

En relación a los inhibidores de la integrasa (INSTI), algunos trabajos indican que la exposición continuada a estos fármacos podría influir tanto en la aparición de EHG como en su progresión^{59,68}. Por el contrario, un estudio prospectivo llevado a cabo por nuestro grupo en pacientes infectados por el VIH puso de manifiesto que el cambio de efavirenz (EFV) a raltegravir (RAL) (un INSTI) provocaba una reducción en los niveles de EHG medida por CAP a pesar de asociarse a un aumento de peso en esos individuos⁶⁹.

A pesar de los posibles efectos que el TAR pueda tener sobre la aparición de la EHG, nuestro grupo no ha encontrado asociación significativa e independiente entre los tratamientos actuales y la presencia de la EHG^{24,49}, por lo que es muy posible que el efecto del TAR actual, por sí mismo, sobre el riesgo de desarrollar EHG deba ser de poca importancia.

2.4.3.2. Coinfección por VHC.

La infección crónica por el virus de la hepatitis C (VHC) ha estado presente en una gran proporción de las PVIH y es una de las causas más frecuentes de enfermedad hepática a nivel global⁷⁰. Sin embargo, el tamaño de efecto de la infección con el VHC sobre la aparición de la EHG no parece ser un factor determinante. Así, un meta-análisis llevado a cabo en pacientes mono infectados por el VHC por Leandro G *et al*, en 2006, demuestra que sólo aquellos infectados el VHC de genotipo 3 mostraban una mayor probabilidad de desarrollar EH⁷¹. Sin embargo, el tamaño de este efecto no es lo

suficientemente importante para ser detectado en estudios con tamaños muestrales modestos²⁴. A pesar de ello, Rodríguez-Torres M *et al.*, reportaron, en un estudio realizado en 2008 con pacientes coinfectados, que, tras el tratamiento y curación de la infección por el VHC con terapias basadas en interferón, la EH disminuía significativamente en pacientes con infección por el VHC de genotipo 3⁷². Todos estos estudios sugieren que la coinfección por VHC no explicaría por sí sola la supuesta mayor prevalencia de la EHG en las PVIH.

No obstante todo lo anterior, y como ha sido ya señalado, para conocer de forma global si la infección por el VIH, ya sea por el efecto de los antirretrovirales u otros factores ligados a la misma, está aumentando de alguna forma el riesgo a padecer EHG, tal y como parecen indicar los estudios de prevalencia, sería necesario evaluar de forma global el impacto de este efecto en individuos infectados y no infectados por el VIH pertenecientes a un mismo grupo étnico y geográfico.

2.5. Manejo y prevención.

El aumento de la prevalencia global de la EHG parece estar relacionado, como ya se comentó al inicio de esta tesis, con el aumento paralelo y global de la epidemia de obesidad y diabetes, con datos en el horizonte que apuntan a España como la portadora de la mayor incidencia de enfermedades relacionadas con la EHNA en el año 2030⁷³. Es por ello, que el manejo de los pacientes con la EHGNA alcanza una gran relevancia clínica. De esta forma Dyson *et al.*, en 2014 proponen una estratificación para el manejo de los riesgos asociados a la EHG⁷⁴. La parte baja de la pirámide está ocupada por la modificación del estilo de vida, cuyo objetivo es la disminución de peso y el aumento de la actividad física, con la utilización de la cirugía bariátrica solo en candidatos determinados con obesidad y síndrome metabólico. Los siguientes peldaños de la pirámide están relacionados con la detección y manejo de los componentes del síndrome metabólico (DMT2, hipertensión, dislipemia) y la farmacoterapia dirigida al hígado cuando no se alcanza el cambio de estilo de vida. Finalmente, en aquellos pacientes que desarrollan la enfermedad avanzada, en la que se incluyen la cirrosis, el CHC y las varices esofágicas, se requeriría medidas especiales entre las que se encuentran la vigilancia de las complicaciones asociadas y el trasplante hepático.

A pesar de que hay abundantes datos, estudios e investigaciones focalizados en la influencia del tratamiento y el cambio en el estilo de vida sobre la EHG en población general⁷⁵, existen pocos datos al respecto en las PVIH⁷⁶. Teniendo en cuenta que la infección por el VIH podría constituir un factor de riesgo en el desarrollo y progresión de la EHG, es posible que fuera necesario establecer actuaciones específicas dirigidas a esta población. Así, en cuanto a las recomendaciones referentes a cambios en el estilo de vida relacionados con la pérdida de peso, mejora de los hábitos alimenticios o ejercicio físico, existe un ensayo clínico en curso que analiza el impacto de estas medidas en la evolución del hígado graso en las PVIH (NCT03913351) y del que aún no se han publicado resultados.

Por otro lado, dada la dificultad de conseguir el cambio de hábito requerido y su mantenimiento, varios ensayos clínicos han evaluado estrategias con terapias farmacológicas mediante uso de agentes farmacológicos. Sin embargo, no está claro el efecto y seguridad de estos fármacos a largo plazo en las PVIH⁷⁶. En la actualidad, dos ensayos clínicos analizan el papel terapéutico de la vitamina E en las PVIH y EHGNA (NCT03988725, NCT03669133). De esta forma, el aramchol, un conjugado sintético de ácido araquidónico y ácido cólico, habría sido postulado como una forma de reducción de la EH en pacientes con EHGNA⁷⁷. Sin embargo, el ensayo clínico ARRIVE (NCT02279524), llevado a cabo en personas infectadas por el VIH y con EHGNA, concluyó que el aramchol no reducía la grasa hepática evaluada mediante resonancia magnética (RM)⁷⁸. Estos resultados también avalan una etiología con rasgos propios de esta enfermedad en estos individuos. Por otro lado, la tesamorelina, un análogo del factor liberador de la hormona de crecimiento humana aprobado para el tratamiento de la lipodistrofia asociada al VIH, se asoció con la reducción de grasa visceral que influye en el contenido de grasa hepática⁷⁹. En la actualidad se está llevando a cabo un ensayo clínico en PVIH y con EHGNA con el fin de evaluar los efectos de la tesamorelina en la EH y en la esteatohepatitis. Los resultados iniciales del estudio fueron que la grasa hepática, medida por RM, disminuyó en un 32% en el brazo de tesamorelina, mientras que aumentó en un 5% en el brazo de placebo ($p = 0,02$) (NCT02196831)⁸⁰.

Finalmente, cambios en las combinaciones en el TAR pueden constituir también una herramienta interesante para el manejo de las PVIH diagnosticadas de EGH. Así, tal y como hemos comentado anteriormente, un ensayo clínico realizado por nuestro grupo (STERAL; NCT01900015) ha demostrado la disminución de la EH medida por CAP, y en algunos casos la reversión, en pacientes que han cambiado de EFV a RAL después de 48 semanas⁶⁹. Del mismo modo, en un ensayo clínico en curso (PASODOBLE; NCT04884139) se está evaluando el cambio de TAF/FTC/BIC a 3TC/DTG en el que se incluye un subestudio para la evaluación de la EH.

4. HIPÓTESIS

Por todo lo anteriormente expuesto, hipotetizamos:

- 1.- que la alta prevalencia de la EH descrita en las PVIH indica que la infección por el VIH podría ser un factor de riesgo independiente para el desarrollo de la EHG.
- 2.- que la EHG en las PVIH podría tener rasgos etiológicos propios que se manifiestan en factores genéticos de riesgo distintos a los observados en la población general.

5. Objetivos

Basándonos en las hipótesis planteadas, esta tesis tiene como objetivos:

1. Evaluar el efecto de la infección por el VIH en el riesgo de desarrollar EHG.
2. Determinar los factores genéticos asociados a la EHG en las PVIH y las posibles rutas metabólicas implicadas.

6. Pacientes y Métodos

4.1. Diseño del estudio y pacientes.

Para el primer objetivo, en el que se pretendía evaluar el efecto de la infección por el VIH en el desarrollo de la EHG, se diseñó un estudio transversal retrospectivo. Se incluyeron todos los pacientes caucásicos españoles que fueron atendidos en la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario Virgen de Valme, desde noviembre de 2010 hasta marzo de 2019, y que cumplían los siguientes criterios:

1. Infección crónica por el VHC, con detección persistente de ARN del VHC en plasma, con o sin coinfección por el VIH.
2. Disponer de un examen de elastografía hepática válido con evaluación de la EH mediante CAP.

También se incluyeron en el estudio aquellos pacientes pre-tratados contra la infección por el VHC que no lograron una respuesta virológica sostenida (RVS).

Para el segundo objetivo, en el que se determinaron los factores genéticos asociados a la EHG en las PVIH y las posibles rutas metabólicas implicadas, se utilizó un diseño transversal retrospectivo. En él, se incluyeron a las PVIH que fueron atendidas en el Hospital Universitario Virgen de Valme y que cumplieran los siguientes criterios:

1. Disponer de una medida de CAP.
2. Disponer de una muestra de ADN congelada antes de diciembre de 2017.
3. Ser caucásicos españoles y no estar relacionados familiarmente con otros pacientes incluidos en el estudio.

4.2. Recogida de datos.

La recogida de datos de los pacientes, para ambos objetivos, se realizó siguiendo un protocolo preestablecido para el seguimiento de pacientes atendidos en la Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario de Valme. Los datos recopilados en la historia clínica incluyeron datos demográficos y familiares, ingesta de alcohol autorreferida por el paciente, antropometría, bioquímica en muestra de sangre

y medición de la EH mediante CAP. La toma de muestras se realizó en condiciones de ayuno.

El CAP se midió con un FibroScan (Echosens FibroScan 502, Paris). Se seleccionaron los puntos de corte de ≥ 248 dB/m y ≥ 280 dB/m para definir la presencia de EH leve, o simplemente EH, (esteatosis que afectaba a $\geq 10\%$ de los hepatocitos) y EH grave ($\geq 66\%$ de los hepatocitos esteatósicos), respectivamente.

Todas las mediciones de CAP para la determinación de la EH se realizaron por operadores entrenados según las recomendaciones previamente publicadas⁸¹. La concordancia entre las mediciones llevadas a cabo por dos operadores entrenados ha sido previamente comprobada por Recio E *et al.*⁸².

Los individuos con un IMC entre 18 y 25 kg/m², entre 25 y 30, entre 30 y 35, entre 35 y 40 y >40 fueron considerados como individuos con peso normal, sobrepeso, obesidad tipo 1, tipo 2 y tipo 3, respectivamente, de acuerdo con la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (<http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/nutrition/a-healthy-lifestyle/body-mass-index-bmi>). De este modo, consideramos sobrepeso un IMC por encima de 25 kg/m². La ingesta elevada de alcohol se definió como ≥ 50 g/día.

4.3. Análisis estadístico.

Para el análisis descriptivo, las variables continuas se expresaron como mediana (Q1-Q3) y las categóricas como número (porcentajes). Se utilizó el test de Chi² o de Fisher para comparar las frecuencias de las variables categóricas entre los grupos y la t de Student o la U de Mann-Whitney para las variables continuas. Se elaboraron modelos de regresión logística binaria para evaluar los factores asociados de forma independiente a la presencia de EH. En dichos análisis, se incluyeron las variables relacionadas con esta condición con un valor de p univariante menor de 0,2 así como la edad, el sexo y la infección por el VIH para obtener los valores ajustados de p y odds ratio (OR). Las diferencias se consideraron significativas para valores de p menores de 0,05. Para los estudios genéticos se consideraron otros valores de p (ver más adelante).

Para el primer objetivo se realizó además un estudio de casos y controles emparejados por edad, sexo e IMC . El emparejamiento por el IMC se debe a que fue el único predictor independiente de la EH en un estudio anterior que utilizó el CAP como método diagnóstico de la EH²⁴. Para el análisis de casos y controles pareados se utilizaron los test de McNemar y Wilcoxon para la comparación de frecuencias de variables categóricas y continuas, respectivamente.

Todos los análisis se realizaron con el programa informático SPSS 25.0 (IBM Corporation, Somers, New York, USA) o el programa STATA 12.0 (Stata Corporation, College Station, Texas, USA).

4.4. Estudio de asociación de genoma completo (GWAS).

4.4.1. Aislamiento del ADN, genotipado y controles de calidad del genotipado.

El ADN se aisló de muestras de sangre total congeladas utilizando el sistema Qiacube (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Sólo se incluyeron las muestras que alcanzaron concentraciones de ADN mayores de 10 ng/ μ L y que presentaban una relación entre las medidas de absorbancias a 260 nm y a 280 nm $>1,7$, y una relación entre las absorbancias medidas a 260 nm y 360 nm > 1 , lo que determina la ausencia de contaminantes en las muestras.

Las muestras se genotiparon utilizando el array Axiom 815K Biobank (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA) según las instrucciones del fabricante (AxiomTM 2.0 Assay Manual Workflow) en el instrumento GeneTitan Multi-Channel (Thermo Fisher).

Para conseguir un mayor rendimiento en el genotipado, el control de calidad de las muestras se realizó con el programa Affymetrix power tool 1.15.0 siguiendo el Axiom Data Analysis Workflow (Thermo Fisher). En el estudio sólo se incluyeron aquellas muestras con una tasa de genotipación superior al 97%. Los marcadores de mejor calidad se seleccionaron para el análisis posterior utilizando el paquete SNPolar (Thermo Fisher). Se eliminaron aquellos SNPs con una tasa de genotipación menor de 95%, una desviación considerable del equilibrio de Hardy-Weinberg (p -valor $\leq 1 \times 10^{-4}$) o una frecuencia alélica menor (MAF) inferior a 0,01. Además, se eliminaron aquellos individuos con índices de heterocigosidad superiores a 0,35 o aquellos que estaban emparentados con otros individuos de la muestra (identidad por estado (IBS) $>0,1875$),

incluyendo muestras duplicadas (IBS >0,98). También se comparó el sexo autodeclarado con el sexo asignado por los genotipos del cromosoma X, y se resolvieron las discrepancias o se eliminaron las muestras. Todos estos análisis se realizaron con el programa Plink 2.0 (<https://www.coggenomics.org/plink2>).

Se llevó a cabo un análisis de componentes principales (CP) con el programa Eigensoft (<https://www.hsph.harvard.edu/alkes-price/software/>) con el fin de identificar a los individuos no caucásicos. En este análisis se excluyeron los marcadores con desequilibrio de unión (LD) de moderado a alto ($r^2 > 0,3$) utilizando la opción “indep-pairwise” de Plink. El análisis de CP se ejecutó junto con otros datos de genotipos de otras poblaciones obtenidos de la fase 3 del Proyecto 1000 Genomas (<http://www.internationalgenome.org/>). Sólo se mantuvieron los individuos de origen caucásico (utilizando un umbral de 6 desviaciones estándar de los valores medios de CP caucásicos) para los análisis posteriores.

4.4.2. Imputación.

La imputación de nuevos genotipos se llevó a cabo utilizando el panel del consorcio de referencia de haplotipos en los servidores de imputación de Michigan (<http://www.imputationserver.sph.umich.edu>). Los genotipos se imputaron utilizando un enfoque de mejor estimación. Sólo se seleccionaron los marcadores comunes (MAF > 0,01) con una alta calidad de imputación ($r^2 > 0,30$) para realizar los análisis de asociación posteriores.

4.4.3. Estudio de asociación de un solo locus.

Se realizaron análisis de asociación génica de un solo locus siguiendo un modelo aditivo y ajustando por los PC, edad, sexo, carga viral del VIH e IMC mayor de 25kg/cm² utilizando el programa Plink. El valor p de significación estadística para el GWAS se estableció en 5×10^{-883} , mientras que un valor de $p < 5 \times 10^{-6}$ se consideró sugestivo de significación estadística. Estas variantes se anotaron utilizando la herramienta Variant Effect Predictor⁸⁴. También se utilizó Plink para estimar el factor de inflación genómica (λ). Se utilizó el paquete del programa qqman R (<http://CRAN.R-project.org/package=qqman>) para la representación gráfica de los resultados unilocus

del GWAS (Manhattan plot). La representación gráfica de asociaciones regionales se realizó con la herramienta web LocusZoom (<http://locuszoom.org/>).

Para considerar asociados en nuestra población aquellos SNPs identificados en los estudios de GWAS como relacionados a la EHG en población general, se estableció el nivel de significación estadística en 0,05.

La estimación de la potencia del estudio se realizó mediante el programa Episheet (www.drugepi.org/wp-content/uploads/2012/10/Episheet.xls).

4.4.4. Estudio de asociación basado en genes y estudios de enriquecimiento.

El estudio de asociación de genes se realizó con el programa Magma, el cual tiene en cuenta la distancia física y el LD entre los SNPs para detectar efectos multimarcadores⁸⁵. Estos análisis utilizaron una ventana de 50 kb aguas arriba y aguas abajo alrededor de cada gen para captar posibles variantes reguladoras de la expresión de estos genes. La corrección del valor de p por múltiples comparaciones en estos análisis se realizó dividiendo el valor de la “p_SNPwise_mean”, calculado por el programa, por el número de genes analizados. En este estudio, el umbral del valor de p se estableció en $2,7 \times 10^{-6}$, mientras que una $p < 10^{-4}$ se consideró sugestiva de significación estadística.

La aplicación ShinyGO (version 0.61)⁸⁶ (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>) se utilizó para explorar el enriquecimiento de genes según las categorías establecidas en Gene Ontology (GO)^{87,88} para procesos biológicos. Para ello se emplearon los 175 genes que mostraron mayor asociación a la EHG con el programa Magma. En este análisis, la corrección por múltiple testado se llevó a cabo aplicando el método de Benjamini–Hochberg realizado por la aplicación de ShinyGO. Se consideraron procesos significativamente enriquecidos aquellos que tuvieron una p de tasa de descubrimientos falsos (FDR) < 0,05. Sólo aquellas categorías enriquecidas con un mínimo de 10 genes asociados a la EHG según nuestro estudio fueron tenidas en cuenta.

4.5. Consideraciones éticas.

Para la consecución de ambos objetivos se desarrollaron estudios que se ajustaron a la legislación nacional y fueron diseñados y realizados de acuerdo con las directrices éticas de la declaración de Helsinki. Los estudios fueron también aprobados por el Comité de Ética del Hospital Universitario Virgen de Valme (Sevilla) (PI18/00606). Se obtuvo el consentimiento informado de todos los individuos.

7. Resultados

Objetivo 1: Evaluar el efecto de la infección por el VIH en el riesgo de desarrollar esteatosis hepática.

1. Características de la población de estudio.

Quinientos noventa y ocho pacientes consecutivos cumplieron los criterios de inclusión. No se obtuvo un resultado fiable de la elastografía en 24 (4%) de ellos. Por tanto, se analizaron finalmente 574 pacientes. Entre ellos, 328 (57,1%) eran pacientes monoinfectados por el VHC siendo el resto de individuos coinfectados por el VIH y el VHC. Las características demográficas, antropométricas y clínicas de estos pacientes se muestran en la Tabla 1. Las PVIH presentaban un buen control inmunológico. Casi todos los pacientes coinfectados estaban bajo tratamiento antirretroviral y con carga viral indetectable (Tabla 1).

Tabla 1. Características de la población de estudio (N=574).

Características	
Sexo hombre, n (%)	485 (84,5)
Edad (años)*	53 (49-57)
UDVP ^a , n (%)	414 (72,1)
Consumo de alcohol ≥ 50 g/d, n (%)	228 (39,7)
Infección VHC por genotipo 3, n (%)	97 (16,9)
IMC ^b (kg/m ²)*	25 (22-28)
IMC ^b (kg/m ²), n (%)	
18-25	285 (49,7)
26-30	190 (33,1)
31-35	59 (10,3)
>35	20 (3,5)
Glucosa plasmática en ayunas ^c (mg/dL)*	91 (82-100)
Triglicéridos en plasma ^d (mg/dL)*	101 (72-143)

Colesterol total en plasma ^e (mg/dL)*	161 (141-189)
Colesterol-HDL en plasma ^f (mg/dL)*	50 (40-63)
Colesterol-LDL en plasma ^g (mg/dL)*	85 (66-110)
RH (kPa)*	8,5 (6-15)
Cirrosis, n (%)	158 (27,5)
HbsAg ^h +, n (%)	9 (1,6)
Recuento de células CD4 (cel/mm ³) ⁱ *	486 (311-726)
VIH-ARN en plasma <50 copias/mL ^j , n (%)	194 (78,9)
TAR ^k , n (%)	243 (98,7)

*Mediana (Q1-Q3)

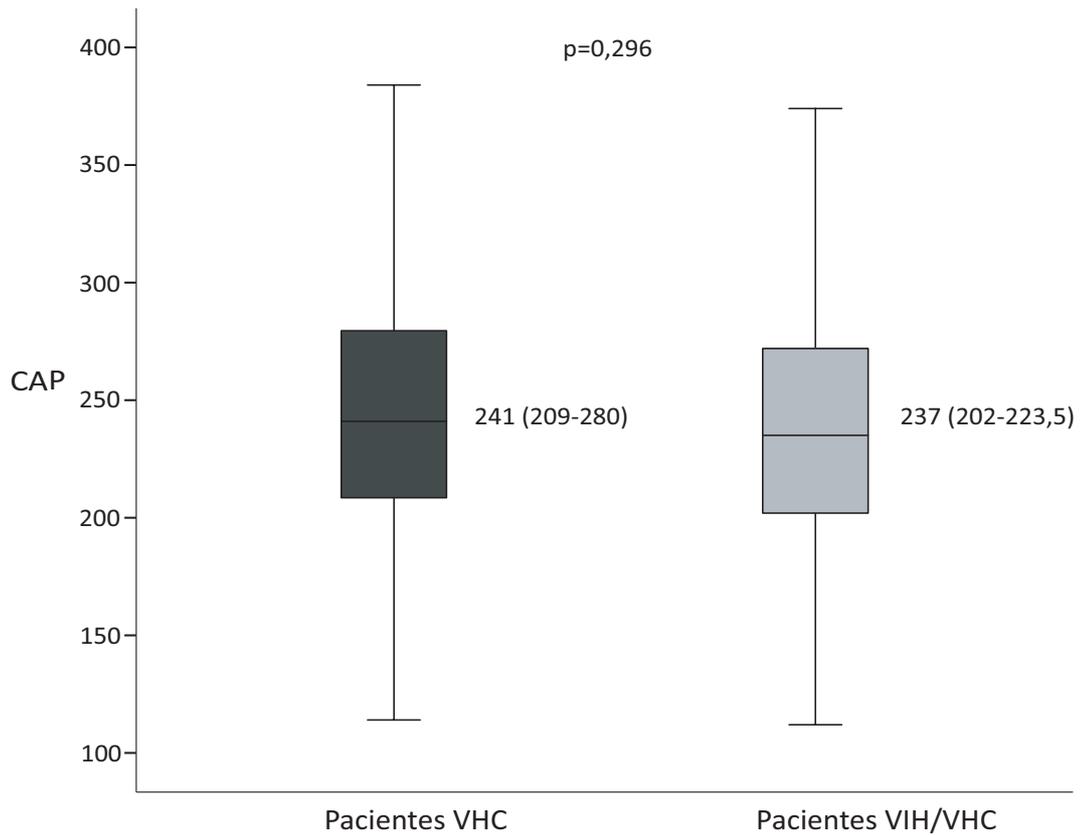
^aDatos disponibles para 549 pacientes; ^bDatos disponibles para 557 pacientes; ^cDatos disponibles para 541 pacientes; ^dDatos disponibles para 542 pacientes; ^eDatos disponibles para 543 pacientes; ^fDatos disponibles para 504 pacientes; ^gDatos disponibles para 505 pacientes; ^hDatos disponibles para 562 pacientes; ⁱDatos disponibles para 245 pacientes; ^jDatos disponibles para 246 pacientes; ^kDatos disponibles para 243 pacientes

Abreviaturas: VHC: virus de la hepatitis C; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana; UDVP: usuarios de drogas por vía parenteral; IMC: índice de masa corporal; HDL: lipoproteína de alta densidad; LDL: lipoproteína de baja densidad; RH: rigidez hepática; TAR: terapia antirretroviral.

2. Prevalencia de la esteatosis hepática según el estado de la infección por el virus del VIH.

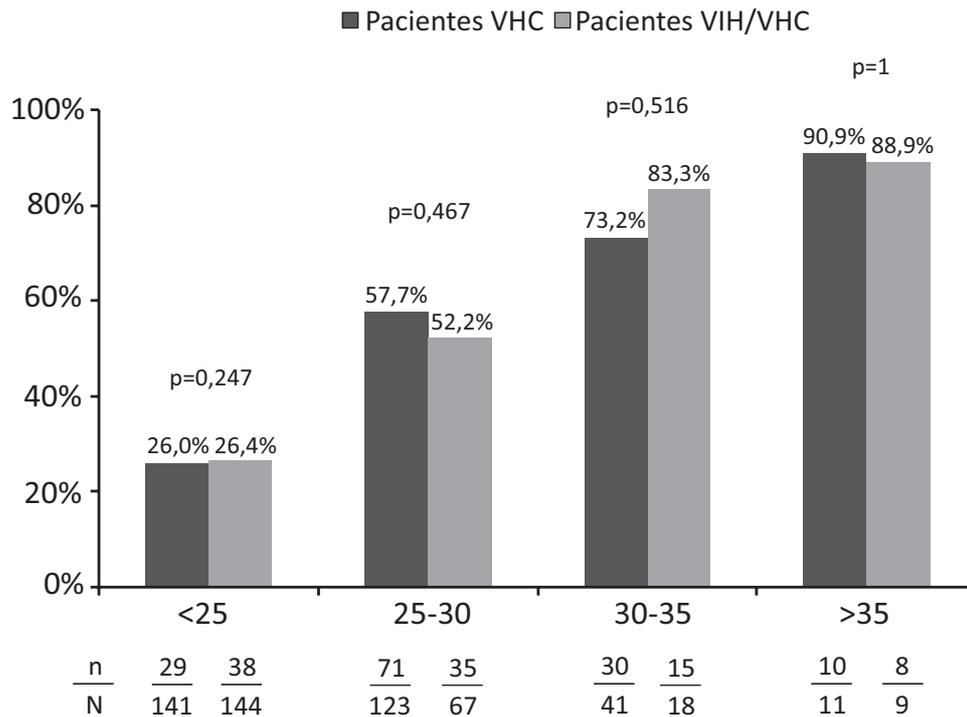
No hubo diferencias significativas en los valores medianos de CAP observados en los pacientes con y sin infección por el VIH (Figura 3).

Figura 3. Mediana de CAP y rango intercuartílico en ambos grupos de pacientes mono infectados por el VHC y coinfectados por el VIH y el VHC.



La frecuencia de la EH ($CAP \geq 248$ dB/m) en los pacientes mono infectados por el VHC fue de 147 (44,8%) y en los coinfectados fue de 105 (40,7%) ($p=0,318$). Ochenta y tres (25,3%) individuos sin infección por el VIH mostraban esteatosis grave, en comparación con 51 (20,7%) entre los coinfectados por el VIH ($p=0,2$). Tampoco hubo diferencias significativas en la prevalencia de esteatosis entre los grupos con y sin coinfección por el VIH estratificados por categorías de IMC (figura 4).

Figura 4. Frecuencia de esteatosis en la población mono infectada por el VHC y coinfectada por el VIH y el VHC clasificada de acuerdo con el grado de obesidad.

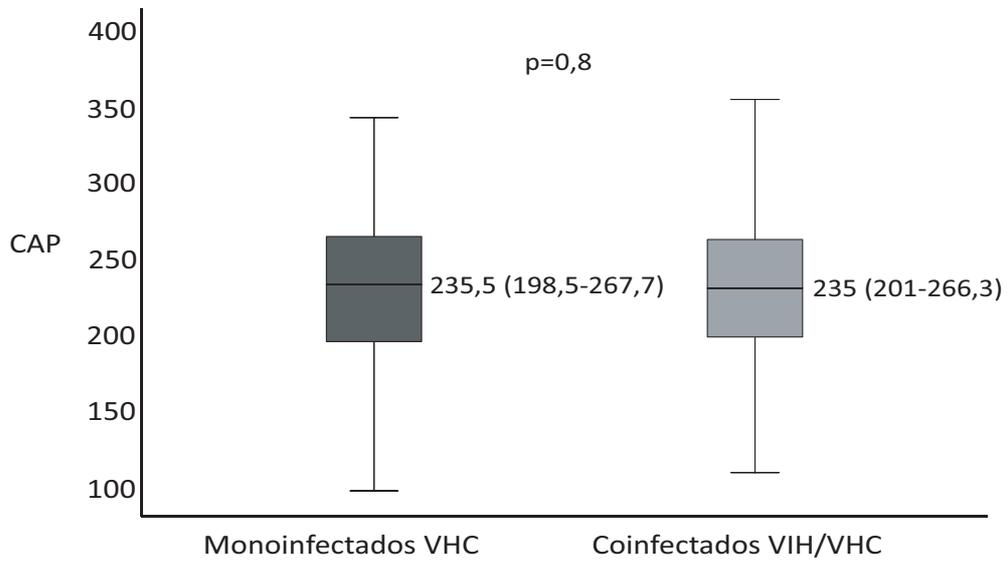


n/N: número de pacientes con esteatosis/número total de pacientes en ambos grupos, pacientes mono infectados por el VHC o coinfectados por el VIH y el VHC según el grado de obesidad.

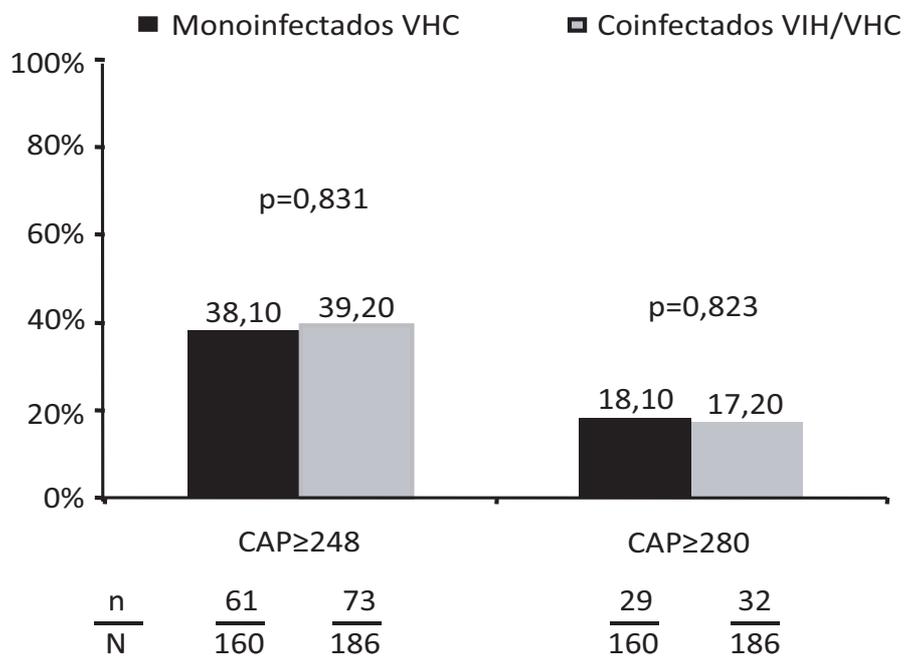
En un análisis en el que se excluyeron los pacientes con un consumo de alcohol ≥ 50 g/d, no hubo diferencias entre los dos grupos de estudio en los valores medianos de CAP ni en la prevalencia de la EH (figura 5).

Figura 5. Mediana de CAP y rango intercuartílico en las poblaciones mono infectadas por el VHC y coinfectadas por el VIH y el VHC (a) y la frecuencia de esteatosis y esteatosis severa en ambos grupos (b) una vez excluidos los pacientes que reportaron consumo elevado de alcohol.

a



b



Al emparejar los pacientes coinfectados por el VIH y el VHC con los individuos monoinfectedos por el VHC según la edad, el sexo y el IMC, la prevalencia de la EH para

el grupo de coinfectados fue del 40,7% (100 individuos) y del 39% (96 individuos) para el grupo de mono infectados ($p=1,000$). Las características de ambas poblaciones aparecen reflejadas en la tabla 2.

Tabla 2. Características de las poblaciones de estudio de casos y controles (N=492).

Características	Mono infección VHC (Controles, n=246)	Coinfección VIH/VHC (Casos, n=246)	p-valor**
Sexo hombre, n (%)	206 (83,7)	214 (87)	1,000
Edad (años)*	52 (48-56)	53 (49-56)	0,167
UDVP, n (%)	162 (65,9)	209 (87,1)	<0,001
Consumo de alcohol ≥ 50 g/d, n (%)	115 (46,7)	60 (24,4)	<0,001
IMC (kg/m^2)*	24,03 (21,4-27,1)	24 (21,3-27)	0,361
Glucosa plasmática en ayunas ≥ 100 mg/dL, n (%)	40 (16,3)	75 (30,5)	0,013
Triglicéridos en plasma ≥ 150 mg/dL, n (%)	22 (8,9)	82 (33,5)	<0,001
Colesterol total en plasma (mg/dL)*	167 (143-196)	156 (137-182)	0,013
Colesterol HDL en plasma (mg/dL)*	52 (41,8-67,1)	47,5 (37,6-59,0)	0,015
Colesterol LDL en plasma (mg/dL)*	90 (67,8-116)	76 (61,0-99,0)	0,002
RH (kPa)*	7,1 (4,9-12,8)	9,7 (6,9-16,8)	0,001
Cirrosis, n (%)	55 (22,4)	80 (32,5)	0,042

*Mediana (Q1-Q3)

**las variables continuas se compararon usando el test de Wilcoxon signed-rank y las variables categóricas usando el test de McNemar.

Abreviaturas: VHC: virus de la hepatitis C; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana; UDVP: usuarios de drogas por vía parenteral; IMC: índice de masa corporal; HDL: lipoproteína de alta densidad; LDL: lipoproteína de baja densidad; RH: rigidez hepática.

3. Factores asociados con la presencia de esteatosis hepática.

En el análisis univariante, los antecedentes de consumo de drogas por vía parenteral, la ingesta de alcohol, los triglicéridos en plasma, el IMC, el colesterol total en plasma y el colesterol HDL en plasma estaban relacionados con la EH, mientras que la coinfección por el VIH no lo estaba (tabla 3).

En el análisis multivariante, el IMC, la edad y la infección con el genotipo 3 del VHC se asociaron de forma independiente con la presencia de la EH. Sin embargo, la coinfección por el VIH no lo estaba (tabla 3).

Tabla 3. Análisis univariante y multivariante de los factores asociados con la esteatosis.

Parámetro	No.	Frecuencia de esteatosis** N (%)	p univariante	ORA (95%IC)	p multivariante
Sexo					
Mujer	89	37 (41,6%)	0,762	1,12 (0,59-2,13)	0,709
Hombre	485	210 (43,3%)			
Edad*					
<52	238	92 (38,7%)	0,075	1,03 (1,01-1,06)	0,040
≥52	336	155 (46,1%)			
Vía de infección por el VHC					
UDVP ^a	414	167 (40,3%)	0,058	0,92 (0,54-1,57)	0,767
Otra	135	67 (49,6%)			
VIH					
Positivo	246	100 (40,7%)	0,318	1,18 (0,72-1,91)	0,502
Negativo	328	147 (44,8%)			
Genotipo del VHC					
3	97	49 (50,5%)	0,102	1,95 (1,10-3,44)	0,021
Otro	477	198 (41,5%)			
Consumo de alcohol (g/día)					
<50	346	134 (38,7%)	0,010	1,39 (0,88-2,20)	0,155
≥50	228	113 (49,6%)			
GPA (mg/dL)* ^c					
<100	394	163 (41,4%)	0,148	1,00 (0,99-1,01)	0,537
≥100	147	71 (48,3%)			
Triglicéridos en plasma (mg/dL)* ^d					
<150	418	168 (40,2%)	0,016	1,00 (0,99-1,00)	0,130
≥150	124	65 (52,4%)			
IMC (kg/m ²)* ^b					
<25	285	67 (23,5%)	<0,001	1,26 (1,19-1,34)	<0,001
≥25	272	171 (62,9%)			
Colesterol total en plasma(mg/dL)* ^e					
<200	442	181 (41%)	0,035	1,00 (0,99-1,00)	0,562
≥200	101	53 (52,5%)			
Colesterol HDL en plasma (mg/dL)* ^f					

<50	251	122 (48,6%)	0,012		
≥50	253	95 (37,5%)		0,99 (0,98-1,01)	0,623
Colesterol LDL en plasma (mg/dL) ^g					
<160	487	211 (43,3%)	0,709	---	---
≥160	18	7 (38,9%)			
Cirrosis*					
Sí	416	177 (42,5%)	0,017		
No	158	70 (44,3%)		0,81 (0,49-1,32)	0,400

*Introducida como variable continua en el análisis multivariante.

**CAP≥248dB/m.

^aDatos disponibles para 549 pacientes; ^bDatos disponibles para 557 pacientes; ^cDatos disponibles para 541 pacientes; ^dDatos disponibles para 542 pacientes; ^eDatos disponibles para 543 pacientes; ^fDatos disponibles para 544 pacientes; ^gDatos disponibles para 505 pacientes.

Abreviaturas: ORA: odds ratio ajustada; IC: intervalo de confianza; VHC: virus de la hepatitis C; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana; UDVP: usuarios de drogas por vía parenteral; GPA: glucosa plasmática en ayunas; IMC: índice de masa corporal; HDL: lipoproteína de alta densidad; LDL: lipoproteína de baja densidad.

Objetivo 2: Determinar los factores genéticos asociados a la esteatosis hepática en población infectada por el VIH y las posibles rutas metabólicas implicadas.

1. Características de la población de estudio.

Entre los 486 pacientes seleccionados inicialmente para este estudio, 6 no se incluyeron por no tener datos del IMC y 6 no pasaron los controles de calidad para ser incluidos en el análisis de asociación génica masiva (calidad del ADN, parentesco con otros pacientes, o bien no ser de origen caucásico). Por lo tanto, 474 pacientes constituyeron la población de estudio.

Las características principales de esta población se encuentran expuestas en la tabla 4.

Tabla 4. Características básicas de la población de estudio (N=474).

Características

Edad (años)*	49 (45-53)
Sexo hombre, n (%)	390 (82,3)
IMC (kg/m ²)*	24 (21-27)
IMC > 25 Kg/m ² , n (%)	192 (40,5)
UDVP, n (%)	331 (69,8)
Consumo de alcohol ≥ 50 g/día, n (%) ^a	130 (27,4)
Serología positiva para el VHC, n (%) ^b	409 (84,3)
VIH indetectable**	352 (72,4)
Glucosa en plasma (mg/dL)* ^c	92 (84-101)
Triglicéridos en plasma (mg/dL)* ^d	118 (85-165)
Colesterol total en plasma (mg/dL)* ^c	167 (144-192)
Colesterol HDL en plasma (mg/dL)* ^e	46 (37-59)
RH (kPa)*	8,1 (5,4-14,4)

*Mediana (Q1-Q3).

**Carga viral menor de 50 copias/mL.

^aDatos disponibles para 457 pacientes; ^bDatos disponibles para 473 pacientes; ^cDatos disponibles para 472 pacientes; ^dDatos disponibles para 471 pacientes; ^eDatos disponibles para 466 pacientes.

Abreviaturas: IMC: índice de masa corporal; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana; UDVP: usuarios de drogas por vía parenteral; VHC: virus de la hepatitis C; HDL: lipoproteína de alta densidad; RH: rigidez hepática.

En la tabla 5 se muestran aquellos factores que en esta población mostraron asociación univariante con la presencia de EH.

Tabla 5. Análisis univariante y multivariante de los factores asociados a la EH (N=474).

Variables	Individuos con CAP < 248 dB/m (n=290)	Individuos con CAP ≥ 248 dB/m (n=184)	P univariante	ORA (95%CI)	P multivariante
Edad ≥ 49 años, n (%)	137 (47,2)	103 (56)	0,064	1,18 (0,78-1,80)	0,419
Sexo hombre, n (%)	234 (80,7)	156 (84,8)	0,255	1,29 (0,75-2,23)	0,345
IMC > 25 Kg/m ² , n (%)	79 (27,2)	113 (61,4)	<0,001	4,02 (2,69-6,00)	< 0,001
UDVP, n (%)	204 (70,3)	127 (69)	0,760		
Consumo de alcohol ≥ 50 (g/día), n (%) ^a	77 (27,4)	53 (30,1)	0,532		
Serología positiva para el VHC ^b	240 (83)	158 (85,9)	0,412		
Genotipo 3 del VHC	41 (14,1)	28 (15,2)	0,745		
VIH indetectable	198 (68,3)	151 (82,1)	0,001	0,51 (0,31-0,83)	0,007
Glucosa en plasma ≥ 100 mg/dL, n (%) ^c	75 (26)	61 (33,3)	0,084	1,16 (0,74-1,81)	0,512
Triglicéridos en plasma ≥ 150 mg/dL, n (%) ^d	85 (29,4)	62 (34,1)	0,288	1,08 (0,70-1,66)	0,724
Colesterol total en plasma ≥ 200 mg/dL, n (%) ^c	53 (18,3)	36 (19,7)	0,718		
Colesterol HDL en plasma ≥ 50 mg/dL, n (%) ^e	116 (41)	72 (39,3)	0,724		
RH ≥ 9,5 kPa, n (%)	123 (42,4)	78 (42,4)	0,996		

^aDatos disponibles para 457 pacientes; ^bDatos disponibles para 473 pacientes; ^cDatos disponibles para 472 pacientes; ^dDatos disponibles para 471 pacientes; ^eDatos disponibles para 466 pacientes.

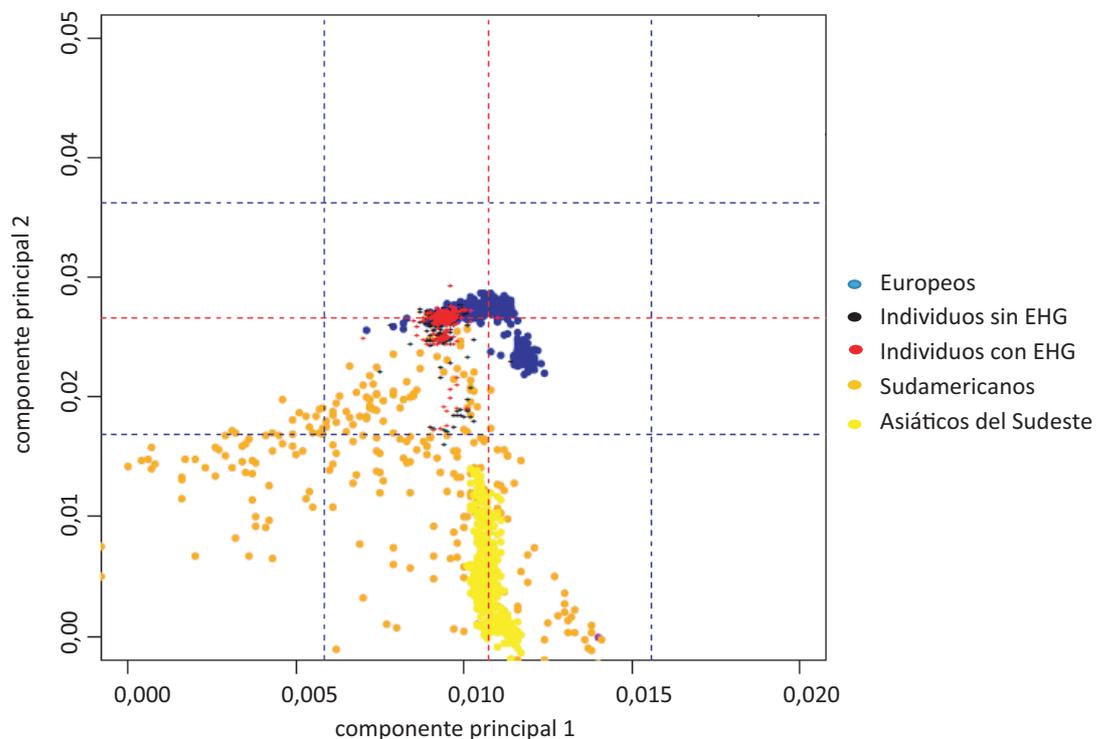
Abreviaturas: ORA: odds ratio ajustada; IC: intervalo de confianza; IMC: índice de masa corporal; UDVP: usuarios de drogas por vía parenteral; VHC: virus de la Hepatitis C; HDL: lipoproteína de alta densidad; RH: rigidez hepática.

2. Análisis del estudio de asociación de genoma completo (GWAS).

Un total de 529.389 SNPs pasaron inicialmente los controles de calidad realizados a los datos de genotipación masiva. Después de la imputación, 7.479.078 variantes fueron seleccionadas para el posterior análisis de asociación.

Se realizó un análisis de componentes principales (CP) (figura 6) entre la población de estudio con la finalidad de confirmar que nuestra población se encontraba dentro de los límites establecidos para la población caucásica. Además, no se observó una elevación general en el test estadístico ($\lambda=1,00$), apoyando que la presencia de factores de confusión era improbable (figura 7).

Figura 6. Diagrama de dispersión del análisis de los componentes principales realizado en diferentes etnias, incluida la población de estudio.

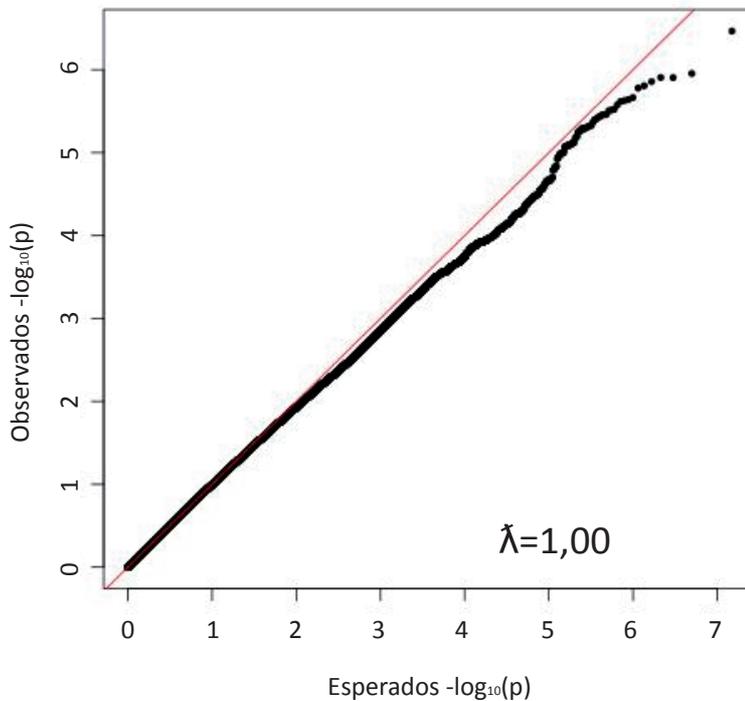


Líneas rojas: media de vectores de componentes principales.

Líneas azules: media de vectores de componentes principales ± 6 desviaciones estándar (SD).

Abreviaturas: EHG: enfermedad hepática grasa.

Figura 7. Gráfico Quantil-Quantil (Q-Q plot) de valores de χ^2 observados y esperados en el estudio de asociación génica de SNPs con la EHG en la población de estudio.



El análisis de asociación génica de un solo locus, ajustado por los PC, edad, sexo, carga viral del VIH e IMC mayor de $25\text{kg}/\text{cm}^2$, no mostró ningún polimorfismo asociado a la presencia de EH (Figura 8) que alcanzara el nivel de significación estadística establecida para los GWAS (5×10^{-8}). Sin embargo, 47 SNPs alcanzaron un grado de significación establecido como sugestivo de asociación con la EHG ($<5 \times 10^{-6}$) (Tabla 6).

Figura 8. Gráfico “Manhattan” (Manhattan plot) del estudio de asociación de genoma completo (GWAS) en enfermedad hepática grasa.

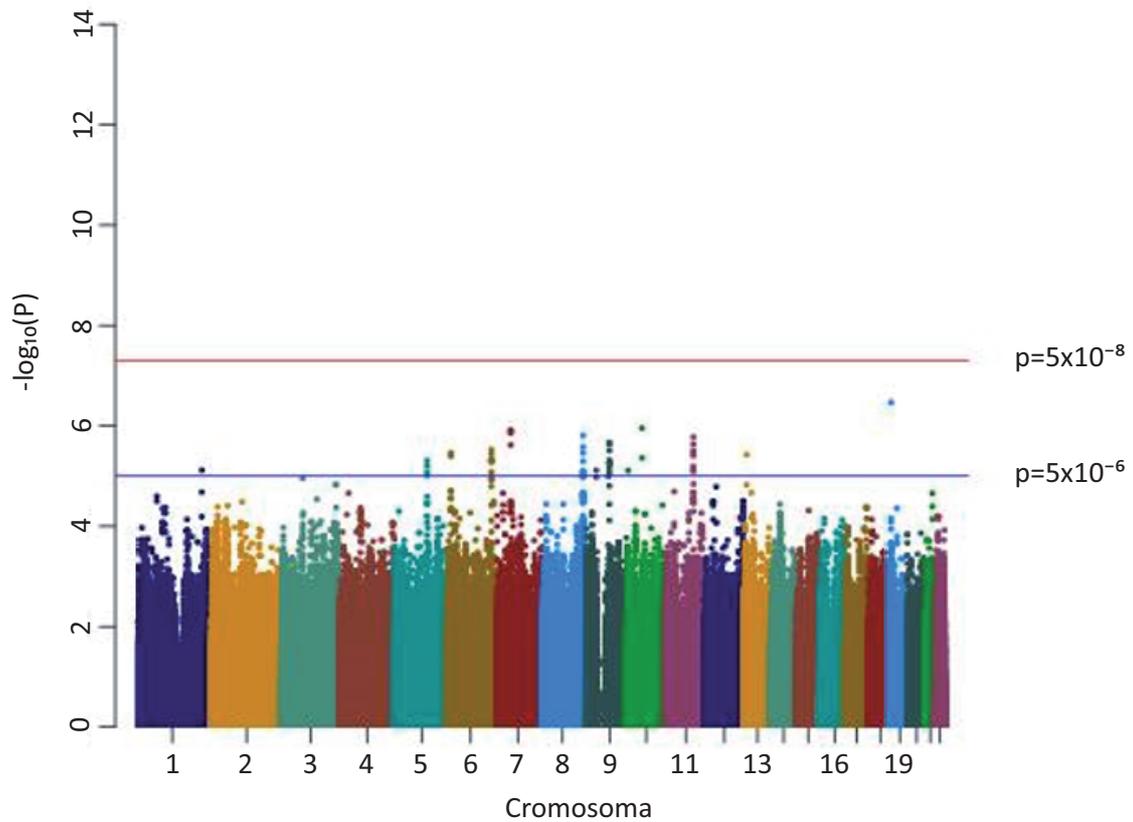


Tabla 6. Mejores señales ($p < 5 \times 10^{-6}$) asociadas a la EHG usando el programa PLINK.

Cr	SNP	BP	A1	OR; (L95-U95)	p	Gen
19	rs12463033	3147421	C	0,40; (0,28-0,57)	3,41E-07	<i>GNA15</i>
10	rs1937709	53614940	G	0,46; (0,34-0,63)	1,11E-06	<i>PRKG1</i>
7	rs13241995	47128336	C	2,28; (1,64-3,19)	1,24E-06	<i>TNS3</i>
7	rs13242289	47128360	A	2,28; (1,64-3,19)	1,24E-06	<i>TNS3</i>
7	rs11771084	47130094	G	2,24; (1,61-3,10)	1,39E-06	<i>TNS3</i>
8	rs4909583	137219473	T	0,39; (0,27-0,56)	1,56E-06	
11	rs12575636	95311260	G	2,36; (1,66-3,36)	1,67E-06	<i>FAM76B*</i>
9	rs72744185	81688005	G	2,92; (1,87-4,54)	2,16E-06	
11	rs11021228	95317063	T	2,06; (1,53-2,78)	2,29E-06	<i>FAM76B*</i>
9	rs72744184	81682111	C	2,92; (1,87-4,55)	2,36E-06	
7	rs12702304	47125840	A	2,19; (1,58-3,02)	2,41E-06	<i>TNS3*</i>
8	rs62526627	137194111	G	0,41; (0,28-0,59)	2,66E-06	
6	rs11754844	151437963	A	2,18; (1,57-3,03)	3,00E-06	<i>FAM76B*</i>
11	rs11021227	95316718	T	2,03; (1,51-2,74)	3,07E-06	<i>FAM76B*</i>
9	rs7872371	81698615	T	2,87; (1,84-4,46)	3,12E-06	
6	rs219986	12208819	T	2,06; (1,52-2,80)	3,47E-06	<i>EDN1*</i>
8	rs28712545	137180822	G	0,40; (0,27-0,59)	3,48E-06	
11	rs4409785	95311422	C	2,31; (1,62-3,28)	3,51E-06	<i>FAM76B*</i>

6	rs7765164	151437556	C	2,23; (1,59-3,13)	3,68E-06	<i>MTHFD1L</i> *
13	rs7323381	30758840	T	0,40; (0,27-0,59)	3,75E-06	<i>KATNAL1</i> *
11	rs11021232	95320808	C	2,27; (1,60-3,22)	3,93E-06	<i>FAM76B</i> *
6	rs219985	12208665	T	2,06; (1,51-2,79)	4,01E-06	<i>EDN1</i> *
10	rs1937707	53614863	G	0,48; (0,35-0,66)	4,36E-06	<i>PRKG1</i>
6	rs13197864	151440688	T	2,14; (1,55-2,97)	4,70E-06	<i>MTHFD1L</i> *
6	rs11754832	151438091	T	2,23; (1,58-3,14)	4,78E-06	<i>MTHFD1L</i> *
9	rs10122051	81694000	T	2,72; (1,77-4,17)	4,82E-06	
5	rs17597395	110837447	C	0,44; (0,30-0,62)	4,97E-06	<i>STARD4</i>

* Gen más cercano (< 200 kilobases).

Abreviaturas: Cr: cromosoma; SNP: polimorfismo de nucleótido simple; BP: posición de la base según "UCSC genome browser (NCBI37/hg19)" y "dbSNP build 142"; A1: alelo menor; OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza.

3. Análisis basados en la asociación de genes completos.

El programa Magma se usó para llevar a cabo el análisis basado en la asociación de genes completos. Los genes *MTAP*, *MYH13* y *CREG1* fueron los que alcanzaron el mejor valor de p corregido por múltiple testado considerándose como sugerentes de asociación significativa ($p < 10^{-4}$). En la tabla 7 se muestran los 175 mejores genes asociados a la EHG y ordenados según el parámetro "p-SNPwise mean" calculado por Magma.

Tabla 7. Mejores 175 genes asociados a la EHG usando el programa Magma.

Cr	BP_START	BP_STOP	NSNPS	NPARAM	P_SNPWISE_MEAN	Gen
9	21752635	21991040	535	46	3,81x10-6	<i>MTAP</i>
17	10151401	10326322	521	72	5,72x10-5	<i>MYH13</i>
1	167460250	167573056	450	63	8,66x10-5	<i>CREG1</i>
5	110781731	110898234	262	43	0,00014113	<i>STARD4</i>
2	50095643	51309674	3629	126	0,00019863	<i>NRXN1</i>
8	10413859	10562617	527	65	0,00021598	<i>RP1L1</i>
14	51050298	51185071	359	28	0,00021923	<i>SAV1</i>
17	73579514	73687486	293	40	0,00023911	<i>SMIM5</i>
3	185250284	185398889	302	26	0,00026465	<i>SEN2</i>
5	134620071	134785645	331	49	0,00032239	<i>H2AFY</i>
14	50949800	51149786	400	31	0,00038426	<i>ATL1</i>
3	185175570	185320369	296	32	0,00039751	<i>LIPH</i>
4	72003003	72487804	932	71	0,00040585	<i>SLC4A4</i>
17	73572925	73713270	375	46	0,00047502	<i>RECQL5</i>
5	159724761	159847657	310	40	0,00047928	<i>C1QTNF2</i>
8	145896294	146031285	223	33	0,00051599	<i>ZNF251</i>
13	46736083	46900944	478	50	0,00052258	<i>LRRC63</i>

11	118792417	118901997	279	31	0,00053282	<i>FOXR1</i>
22	46706731	46983067	1103	96	0,0005343	<i>CELSR1</i>
19	3044408	3171468	569	84	0,00056041	<i>GNA11</i>
11	118818843	118936455	264	29	0,00056449	<i>CCDC84</i>
15	34994642	35096782	408	64	0,00058756	<i>GJD2</i>
11	118836422	118939057	243	34	0,00068441	<i>RPS25</i>
17	73592274	73694057	227	34	0,00069979	<i>SMIM6</i>
11	118839241	118944384	243	33	0,00078172	<i>TRAPPC4</i>
19	3128250	3230335	478	69	0,00084108	<i>S1PR4</i>
16	76261176	76643135	1485	74	0,00093502	<i>CNTNAP4</i>
4	145517148	145712542	288	29	0,00093614	<i>HHIP</i>
7	148345631	148548202	400	36	0,00093832	<i>CUL1</i>
18	12258218	12376568	330	30	0,00094101	<i>TUBB6</i>
17	9679152	9844269	636	61	0,00094428	<i>GLP2R</i>
17	9751027	9858684	412	47	0,00095155	<i>RCVRN</i>
16	75132392	75256132	537	50	0,00095356	<i>ZFP1</i>
14	58825370	58944232	110	30	0,00098138	<i>TIMM9</i>
11	118777008	118879269	242	37	0,0010331	<i>UPK2</i>
12	56096247	56261540	177	44	0,0010438	<i>SARNP</i>
22	46681298	46803237	377	24	0,0010517	<i>TRMU</i>
8	145948499	146062725	250	23	0,0010581	<i>ZNF34</i>
15	85241818	85399663	365	32	0,001084	<i>ZNF592</i>
12	56161806	56264959	110	33	0,0011476	<i>ORMDL2</i>
14	58812644	58925419	107	30	0,0011686	<i>TOMM20L</i>
16	87286404	87401468	501	41	0,0012033	<i>C16orf95</i>
9	88506009	88688350	298	41	0,0012651	<i>NAA35</i>
5	147393535	147566925	733	27	0,0013431	<i>SPINK5</i>
18	12278943	12427275	426	38	0,00137	<i>AFG3L2</i>
8	145965152	146067805	246	21	0,0014267	<i>RPL8</i>
1	28646093	28876881	574	22	0,0014873	<i>PHACTR4</i>
3	9490045	9645486	392	37	0,0014922	<i>LHFPL4</i>
1	180551146	180909415	705	45	0,0015112	<i>XPR1</i>
8	145974261	146085461	287	23	0,0015918	<i>ZNF517</i>
12	56164744	56274337	116	34	0,0016438	<i>DNAJC14</i>
14	58844103	59065549	226	43	0,0016842	<i>KIAA0586</i>
3	128288813	128419719	394	31	0,0016981	<i>RPN1</i>
13	50539390	50645058	162	24	0,001762	<i>KCNRG</i>
7	71194476	71962136	2062	91	0,0017792	<i>CALN1</i>
4	74912752	75014997	96	26	0,0018245	<i>CXCL2</i>
22	46642638	46779596	425	23	0,0018257	<i>GTSE1</i>
6	55142267	55317291	870	37	0,0018837	<i>GFRAL</i>
19	3086191	3213766	590	88	0,0018874	<i>GNA15</i>
10	61360522	61519649	407	50	0,0018884	<i>SLC16A9</i>
12	56179214	56286767	114	35	0,0018909	<i>MMP19</i>
3	179015480	179161014	267	27	0,0020787	<i>MFN1</i>
13	50521143	50642603	192	25	0,0021017	<i>TRIM13</i>
1	28605513	28712478	234	25	0,0021113	<i>MED18</i>
16	67646850	67750628	124	29	0,0021999	<i>ENKD1</i>

4	176936985	177153979	836	52	0,0023004	<i>WDR17</i>
17	15083094	15218674	328	41	0,0023639	<i>PMP22</i>
14	100792755	101046640	477	47	0,0023896	<i>WDR25</i>
11	118845061	118951616	257	33	0,0024144	<i>SLC37A4</i>
16	67650662	67752661	120	28	0,002427	<i>C16orf86</i>
13	26736894	26846686	366	45	0,0024341	<i>RNF6</i>
6	4656393	5005778	1089	91	0,0024381	<i>CDYL</i>
16	67644851	67746681	123	28	0,002454	<i>PARD6A</i>
10	91411264	91584700	556	21	0,0024792	<i>KIF20B</i>
1	167549474	167727933	582	72	0,0025517	<i>RCSD1</i>
16	87312942	87475708	626	54	0,0025659	<i>FBXO31</i>
22	46613861	46739905	373	23	0,0026036	<i>TTC38</i>
2	100112326	100809037	1411	70	0,0026069	<i>AFF3</i>
18	12204318	12327594	361	48	0,0026881	<i>CIDEA</i>
16	67641415	67744718	126	29	0,002738	<i>ACD</i>
7	148454464	148631441	373	39	0,002846	<i>EZH2</i>
13	107770879	108569460	2655	213	0,0028867	<i>FAM155A</i>
15	35030297	35137927	427	80	0,0031082	<i>ACTC1</i>
8	27677399	27900369	867	71	0,0031689	<i>SCARA5</i>
10	97373153	97503900	368	30	0,0032204	<i>TCTN3</i>
19	54335467	54460906	224	60	0,0032445	<i>PRKCG</i>
20	4151278	4279659	451	63	0,0032743	<i>ADRA1D</i>
5	148311713	148492737	475	38	0,0032839	<i>SH3TC2</i>
9	113380935	113616386	815	59	0,0034009	<i>MUSK</i>
16	67629030	67741472	135	29	0,0034043	<i>RLTPR</i>
1	225915515	226028168	368	46	0,0034089	<i>SRP9</i>
22	26945362	27063991	421	48	0,0035109	<i>CRYBB1</i>
3	9389384	9569838	391	41	0,0035806	<i>SETD5</i>
1	27375300	27531621	255	31	0,0036111	<i>SLC9A1</i>
9	139954992	140059204	227	42	0,0036299	<i>DPP7</i>
16	67658436	67803273	157	28	0,0036358	<i>GFOD2</i>
14	93619237	93723459	298	43	0,0036635	<i>C14orf142</i>
10	97617722	97748415	382	38	0,0036777	<i>C10orf131</i>
4	96711239	96812625	550	32	0,0037096	<i>PDHA2</i>
10	85904391	86029377	372	47	0,0037205	<i>CDHR1</i>
1	167349877	167537847	593	98	0,003782	<i>CD247</i>
3	178991551	179103325	250	30	0,0038158	<i>ZNF639</i>
3	112201354	112330810	308	19	0,003862	<i>ATG3</i>
17	10243642	10375267	264	34	0,0039194	<i>MYH8</i>
17	16403626	16522520	265	32	0,0039345	<i>ZNF287</i>
14	51136481	51347839	561	61	0,003939	<i>NIN</i>
4	109681877	110273799	1733	96	0,0039508	<i>COL25A1</i>
7	74458187	74615623	14	8	0,0039663	<i>GTF2IRD2B</i>
3	37853669	38075960	488	53	0,0039745	<i>CTDSPL</i>
1	28782455	28915708	279	24	0,0039965	<i>RCC1</i>
5	95170802	95347775	409	38	0,0040403	<i>ELL2</i>
5	147713498	147872399	271	31	0,0041961	<i>FBXO38</i>
22	46601560	46709277	324	24	0,0042339	<i>PKDREJ</i>

10	85930241	86035339	340	41	0,0042383	<i>LRIT2</i>
6	111253274	111397299	539	32	0,004244	<i>RPF2</i>
4	188866925	188976199	429	68	0,0042679	<i>ZFP42</i>
16	75187994	75291072	491	42	0,0043039	<i>CTRB2</i>
3	185311527	185592827	506	51	0,0043324	<i>IGF2BP2</i>
1	101135196	101254601	257	43	0,0043817	<i>VCAM1</i>
17	3293305	3467146	603	64	0,0044217	<i>SPATA22</i>
8	146002855	146122893	278	23	0,0046666	<i>ZNF7</i>
20	413338	574482	367	57	0,0047032	<i>CSNK2A1</i>
22	22788767	22913505	549	40	0,0047978	<i>ZNF280B</i>
14	50835211	51049376	405	45	0,0048281	<i>MAP4K5</i>
10	11734356	11856065	491	46	0,0048395	<i>ECHDC3</i>
5	76874537	76984522	301	51	0,004939	<i>OTP</i>
14	94997706	95109457	468	56	0,0049537	<i>SERPINA5</i>
1	214111278	214264853	286	52	0,0049672	<i>PROX1</i>
7	2621603	2754436	535	72	0,0050281	<i>TTYH3</i>
10	104986919	105100108	168	30	0,0050402	<i>INA</i>
7	74391223	74539717	15	8	0,0050514	<i>WBSCR16</i>
2	198619426	199064608	754	37	0,0050946	<i>PLCL1</i>
20	42774579	42889702	318	44	0,0051799	<i>OSER1</i>
20	55693809	55891707	592	58	0,005184	<i>BMP7</i>
3	185582356	185705924	296	41	0,0051932	<i>TRA2B</i>
11	118864896	118977951	263	38	0,005194	<i>HYOU1</i>
1	6425292	6534724	306	25	0,0052114	<i>HES2</i>
1	182563036	182703502	330	49	0,0052764	<i>RGS8</i>
16	57960339	58072020	242	47	0,0053237	<i>TEPP</i>
9	34501425	34640713	298	41	0,0053264	<i>CNTFR</i>
12	56087064	56196665	127	35	0,0053534	<i>GDF11</i>
16	67971293	68084493	181	28	0,0055612	<i>DPEP2</i>
3	119266695	119398658	463	45	0,0055847	<i>PLA1A</i>
3	179063876	179219371	301	36	0,0056496	<i>GNB4</i>
21	38689859	38937679	633	40	0,0056521	<i>DYRK1A</i>
16	67927377	68052597	193	27	0,0056681	<i>SLC12A4</i>
16	67918407	68020780	152	26	0,0057227	<i>PSMB10</i>
16	75095758	75200670	313	32	0,0057484	<i>LDHD</i>
19	54362704	54497195	288	65	0,0057989	<i>CACNG7</i>
10	105077724	105198822	148	29	0,0058051	<i>TAF5</i>
22	26967928	27076636	371	44	0,0058271	<i>CRYBA4</i>
16	67959566	68064452	163	26	0,0059167	<i>DPEP3</i>
2	172328757	172464643	413	40	0,0059692	<i>CYBRD1</i>
6	39232474	39340330	527	42	0,0059864	<i>KCNK16</i>
22	46589910	46696193	315	26	0,0060364	<i>CDPF1</i>
12	68638346	68776161	349	45	0,006045	<i>MDM1</i>
10	105012553	105160891	187	30	0,006067	<i>PCGF6</i>
16	67913473	68015778	145	25	0,0060893	<i>CTRL</i>
10	105098807	105206270	136	28	0,0061025	<i>USMG5</i>
1	180832313	180970745	287	53	0,0061236	<i>KIAA1614</i>
8	48123489	48698563	428	37	0,0061242	<i>SPIDR</i>

7	87784430	87906308	159	30	0,0061798	<i>SRI</i>
10	104955644	105057773	200	34	0,006205	<i>RPEL1</i>
15	85162768	85309691	322	30	0,0062197	<i>SEC11A</i>
14	94977779	95086243	444	48	0,0062636	<i>SERPINA4</i>
11	355716	467454	347	49	0,0063717	<i>SIGIRR</i>
22	42404338	42516852	217	24	0,006372	<i>NAGA</i>
7	82943222	83328479	1262	60	0,0064511	<i>SEMA3E</i>
11	94848677	95015705	353	59	0,0064644	<i>SESN3</i>
1	28829529	28955057	209	30	0,0064686	<i>TRNAU1AP</i>
11	367930	492011	349	45	0,0064971	<i>ANO9</i>
16	67923787	68028656	163	26	0,0065199	<i>LCAT</i>
14	93601296	93703431	380	39	0,006531	<i>TMEM251</i>
17	3286164	3387135	298	26	0,0065399	<i>OR1E2</i>
16	68005177	68107770	167	24	0,006579	<i>DDX28</i>

Abreviaturas: Cr: cromosoma; BP: posición de la base según comienzo (START) o terminación (STOP) según "UCSC genome browser (NCBI37/hg19)" y "dbSNP build 142"; NSNPS: número de SNPs en la región; NPARAM: número de SNPs usados en el análisis.

4. Análisis de enriquecimiento.

Finalmente, se analizó si los mejores 175 genes asociados a la EHG, según el estudio de asociación de genes completos, estaban significativamente aglutinados en categorías específicas del GO para procesos biológicos, pero no se obtuvo ningún resultado significativo.

5. Análisis de los SNPs previamente asociados a la enfermedad hepática grasa en población general en estudios de GWAS.

De los 36 SNPs previamente asociados a la EHG en estudios de GWAS (ver anexo I), sólo 22 fueron genotipados o imputados en nuestra población. En la tabla 8 se muestran los resultados referentes a estos SNPs obtenidos en nuestro GWAS sobre la EHG en PVIH. Ningún polimorfismo se asoció con la EHG al nivel de significación establecido para este análisis ($p < 0,05$).

Tabla 8. Resultados de asociación génica en nuestra población de aquellos SNPs previamente asociados a la EHG en diferentes poblaciones (ver anexo I) en los estudios de GWAS realizados hasta la fecha. Se indica la dirección del efecto del alelo menor en cada estudio.

SNP	Cr	Gen	A1/A2	Efecto reportado	Referencia	p	OR(95%IC) ^a
rs2642442	1	MARC1	C/T	Riesgo	40	0,719	0,95 (0,70-1,28)
rs1260326	2	GCKR	T/C	Riesgo	4036	0,509	1,10 (0,83-1,46)
rs780094	2	GCKR	A/G	Riesgo	3539	0,615	1,08 (0,81-1,43)
rs1919127	2	GKCR	C/T	Riesgo	42	0,705	1,06 (0,77-1,46)
rs9992651	4	HSD17B1 3	A/G	Protección	42	0,993	1,00 (0,72-1,39)
rs2954038	8	TRB1	C/T	Riesgo	43	0,402	0,88 (0,65-1,19)
rs2980888	8	TRB1	T/C	Riesgo	3943	0,402	0,88 (0,65-1,19)
rs2954021	8	TRB1	A/G	Riesgo	39	0,753	1,05 (0,79-1,39)
rs28601761	8	TRB1	C/G	Riesgo	36	0,802	1,04 (0,78-1,38)
rs17321515	8	TRB1	G/A	Protección	40	0,850	1,03 (0,78-1,37)
rs10500212	19	PBX4	T/C	Riesgo	42	0,961	0,99 (0,52-1,86)
rs58542926	19	TM6SF2	T/C	Riesgo	3942, 45, 37	0,849	1,06 (0,57-2,00)
rs73001065	19	MAU2/T M6SF2	C/G	Riesgo	394036	0,482	1,27 (0,65-2,49)
rs429358	19	APOE	C/T	Protección	40	0,434	1,20 (0,76-1,88)
rs3747207	22	PNPLA3	A/G	Riesgo	36, 4043	0,906	0,98 (0,70-1,36)
rs738409	22	PNPLA3	G/C	Riesgo	35 39424537433846474 8	0,826	0,96 (0,69-1,34)
rs12483959	22	PNPLA3	A/G	Riesgo	37	0,531	0,89 (0,62-1,28)
rs2281135	22	PNPLA3	A/G	Riesgo	37	0,379	0,85 (0,59-1,22)

rs2294915	22	PNPLA3	T/C	Riesgo	43	0,858	0,97 (0,70-1,34)
rs5748926	22	IL17RA	T/C	Riesgo	43	0,798	0,96 (0,72-1,29)
rs2143571	22	SAMM50	A/G	Riesgo	3748	0,856	1,03 (0,74-1,44)
rs2073080	22	SAMM50	T/C	Riesgo	37	0,933	1,02 (0,73-1,42)

^aAnálisis ajustando por edad, sexo, carga viral del VIH e IMC.

Abreviaturas: Cr: Cromosoma; SNP: polimorfismo de nucleótido simple; A1: alelo menos frecuente (alelo al que se refiere el efecto); A2: alelo más frecuente (alelo de referencia); OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza.

8. Discusión

En la presente tesis doctoral, se pone de manifiesto, por un lado, y en relación a la evaluación de la infección por el VIH en el riesgo de desarrollar la EHG, que la prevalencia de la EHG en los pacientes coinfectados por el VIH y el VHC es similar a la observada en los pacientes mono infectados por el VHC. Estos resultados sugieren que la infección por el VIH no influye en el desarrollo de la EHG en pacientes con hepatitis C crónica.

Por otro lado, en relación a los factores genéticos asociados a la EHG en las PVIH no se detectó ningún SNPs, gen completo o ruta molecular asociado significativamente con la EHG. No obstante, se obtuvieron señales sugestivas de estar asociados que no han sido descritas en la población general. Estos resultados ponen de manifiesto que, en primer lugar, los factores genéticos implicados en la susceptibilidad a desarrollar la EHG en la población general no tienen relevancia en las PVIH; y que, en segundo lugar, la susceptibilidad a desarrollar la EHG en las PVIH los factores genéticos pueden tener un peso específico pequeño y, por tanto, no detectable con tamaños muestrales moderados.

La prevalencia de la EHG en la infección por el VIH, estimada mediante CAP, ha oscilado entre el 39% y el 41% en diferentes estudios realizados de forma independiente en distintos países occidentales^{24,89,90}. En la población general, se espera que la frecuencia de la EHGNA afecte al 25% de los individuos, en el caso de EEUU¹¹. No obstante, a pesar de esta marcada diferencia en los datos de prevalencia entre las PVIH y la población general, se carece de estudios que hayan realizado comparaciones directas de grandes muestras de población no seleccionada con y sin infección por el VIH. En un estudio retrospectivo reciente realizado por Sansom *et al.*, la frecuencia de EH, evaluada por CAP, fue mayor en los individuos infectados por el VHC que entre los pacientes coinfectados por el VIH y el VHC⁹¹. La prevalencia de un valor de CAP igual o mayor de 238 dB/m fue del 29,5% para los pacientes coinfectados y del 42,9% para los pacientes mono infectados por el VHC⁹¹. Sin embargo, no se realizó un análisis comparativo de los factores de riesgo para el desarrollo de la EH. Por lo tanto, no es posible interpretar de forma inequívoca estos resultados como debidos a

un efecto de la infección por el VIH o como consecuencia de una distribución diferente de los factores de riesgo metabólicos. Además, la población de estudio descrita por Sansom *et al.* era principalmente afroamericana. Dado el notable efecto de la etnia en la probabilidad de desarrollar la EHGNA⁹², no es posible extrapolar los resultados de Sansom *et al.* a poblaciones caucásicas como fue la nuestra.

En nuestro estudio, en contra de lo que inicialmente se esperaba, las tasas de EH, mediada por CAP, entre los pacientes con infección por VHC seguidos en un único centro de atención terciaria, fueron similares a las de aquellos con coinfección por el VIH y el VHC. No obstante, existían una serie de diferencias entre ambos grupos que podrían haber influido en la frecuencia de la EH observada. En particular, la población mono infectada por el VHC mostraba una mayor proporción de pacientes con sobrepeso u obesidad mientras que la población de pacientes coinfectados por el VIH y el VHC presentaba mayores niveles de triglicéridos en plasma y menores niveles de colesterol HDL en plasma. Tras ajustar por los factores asociados con la EH, incluidos los mencionados anteriormente, la infección por el VIH no se asoció significativamente a una mayor probabilidad de desarrollar la EH. De hecho, un análisis estratificado por IMC, considerado el factor predictivo más fuerte de la EH por este estudio y otros precedentes^{23,24,89,90}, no reveló ninguna diferencia significativa en las tasas de EH por categoría de IMC, entre los pacientes con y sin infección por el VIH. Por último, un análisis en el se excluyeron los pacientes con una ingesta de alcohol igual o superior a 50 g/día, tampoco mostró diferencias significativas entre ambos grupos. Por todo ello, el riesgo de desarrollar la EHG parece ser similar en los pacientes con hepatitis C crónica con y sin infección por el VIH. Apoyando estos resultados, Machado MV *et al.*, en un meta-análisis llevado a cabo en 2010 con pacientes coinfectados sometidos a biopsia hepática, concluyen también que no existía diferencia en la frecuencia de EH entre coinfectados con el VIH y el VHC y mono infectados por el VHC²⁸. No obstante, la información proporcionada por este meta-análisis sobre el riesgo de desarrollar EH inherente a la infección por el VIH era muy limitada. Esto se debe a que, al estar el estudio basado en biopsias hepáticas, un método invasivo no exento de riesgos, las poblaciones seleccionadas pueden no ser representativas de las poblaciones de mono infectados y coinfectados, debido a sesgos de selección.

En lo referente al efecto del TAR en la aparición de la EHG en las PVIH, se trata de un tema controvertido y difícil de determinar. La posible implicación del TAR reportada recientemente como un factor relacionado con el aumento de peso y con el desarrollo de la EH en pacientes mono infectados por el VIH, está relacionada con el mayor cambio de peso observado en pacientes con TAR basado en TAF que el observado para un TAR basado en TDF^{58,59}. No obstante, estudios observacionales amplios con pacientes no seleccionados, no encuentran una asociación inequívoca del TAR con la EHG^{59,68}. Por otro lado, no se ha asociado de forma general el tipo de TAR recibido en el momento de la medición por CAP con la presencia de la EHG en nuestra población^{24,49}. Este resultado viene avalado también por el hecho de que no encontremos una asociación significativa entre la infección por el VIH y el desarrollo de la EHG, tal y como hemos puesto de manifiesto en el estudio realizado para cumplir con el primer objetivo y en donde la mayoría de los individuos infectados por el VIH estaban en tratamiento antirretroviral. Sin embargo, como se comentó en la introducción de esta tesis, ha sido sugerido por varios estudios que la supresión o el cambio de tratamiento podría suponer una alteración en el desarrollo de la EHG^{57-59,69}. Teniendo en cuenta todo esto, junto con el carácter multifactorial de la EHG, es posible que existan interacciones entre marcadores genéticos y otros condicionantes no estudiados (tipo de TAR, virales, metabólicos) que sean importantes para determinar el riesgo y que no han podido ser analizados en el presente trabajo. Esto podría explicar, en parte, la ausencia de resultados robustos en el estudio genético para una enfermedad con tan alto componente hereditario. A pesar de ello, habría que explicar el por qué, siendo los condicionantes genéticos distintos, la frecuencia de la EHG no es diferente en individuos con y sin infección por el VIH. De nuevo, el importante efecto de los factores metabólicos como la obesidad podría estar en la base de esta observación. Son necesarios nuevos estudios con tamaños muestrales más elevados para abordar todas estas cuestiones.

Finalmente, tampoco podemos descartar de manera inequívoca que la diferencia en la prevalencia reportada para la población general¹⁶ y la reportada para las PVIH^{22-26,28} pueda ser debida una infravaloración de la verdadera frecuencia de la EH en la población general⁹³.

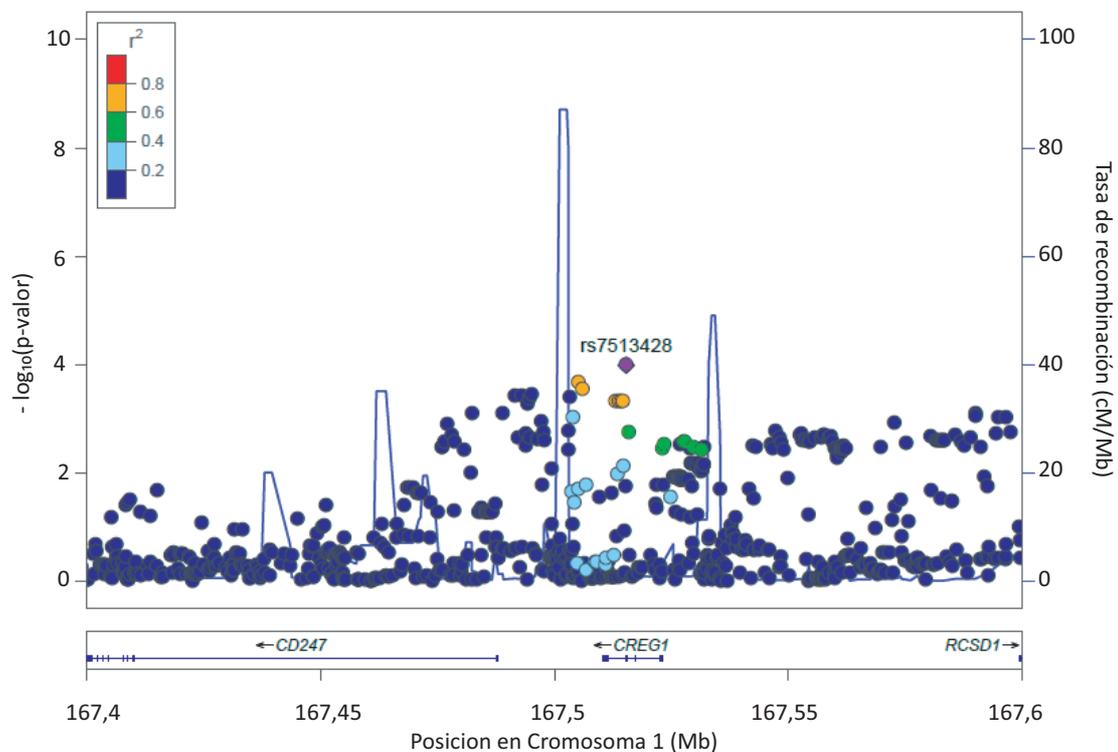
En cuanto a los factores genéticos y las rutas metabólicas que podrían estar implicadas en la aparición de la EHG, aunque ningún marcador genético alcanzó el nivel de significación estadística necesario para establecer una asociación directa con la aparición de la EHG, algunos polimorfismos mostraron asociaciones sugestivas con la aparición de la EH en las PVIH. El locus que encabeza nuestro listado está ligado al gen *GNA15*, que codifica para una subunidad de una proteína G heterotrimérica de la membrana plasmática. Esta proteína se ha relacionado con tumorigénesis⁹⁴⁻⁹⁷ y el desarrollo de la DMT1 por su posible papel en la apoptosis de las células secretoras de insulina⁹⁸. De confirmarse su papel como factor de riesgo en el desarrollo de EH en las PVIH, habría que determinar si el mecanismo implicado podría ser la desregulación de la secreción de insulina, una hormona anabólica que favorece el acumulo de grasa. Curiosamente, varios de los polimorfismos más sugestivos de asociación están ligados a los genes *TNS3* y *FAM76B*. El primero está relacionado con la proliferación y la migración celular⁹⁹ y, también con tumorigénesis^{100,101}. Por su parte, la proteína FAM76b se ha identificado dentro del compartimento *speckles* del núcleo celular¹⁰² implicado en el *splicing* para la generación de los ARN mensajeros maduros. Ambos genes están relacionados con procesos biológicos cuya desregulación puede tener un efecto en el correcto funcionamiento celular que, en determinados contextos genéticos, fisiológicos y ambientales, podrían influir en el desarrollo de la EHG. De confirmarse nuestros hallazgos, el papel específico de estos genes en el riesgo a desarrollar la EHG deberá ser estudiado en modelos biológicos.

Por otro lado, en el análisis de asociación de genes completos, las señales más fuertes estuvieron asociadas a los genes *MTAP* y *GRECG1*. Así, se ha reportado que la baja expresión del gen *MTAP* está relacionada tanto con el CHC¹⁰³ como con la enfermedad hepática crónica¹⁰⁴, considerándose como un posible biomarcador de la progresión a CHC. Aunque este gen parece estar más relacionado con estadios avanzados de la enfermedad hepática, no existen estudios que lo relacionen con la aparición de la EH. El otro gen, asociado sugestivamente a la EH en nuestra población es *CREG1*. *CREG1* codifica para una glicoproteína recientemente relacionada en el control de la obesidad inducida por la dieta, así como con los procesos relacionados con la DMT2, la hiperlipidemia y SM tanto en ensayos funcionales como en modelos murinos *in vivo*¹⁰⁵⁻

¹⁰⁹. En este sentido, Tian *et al.* en 2017 muestran que en ratones heterocigotos (*creg1^{+/-}*), bajo una dieta hipercalórica, se produce un aumento plasmático de citoquinas proinflamatorias, así como la propia inflamación del tejido adiposo que da lugar al desarrollo de obesidad y un aumento en la EH, dislipemia y resistencia a la insulina¹⁰⁹. En esta misma línea, Hashimoto *et al.* en 2019 reportan el posible mecanismo molecular a través del cual *CREG1* activaría la formación de tejido adiposo pardo (“browning”), impidiendo el desarrollo de la obesidad y las patologías asociadas a ésta¹⁰⁶. Así, este mecanismo implica que una dieta hipercalórica activaría el sistema nervioso simpático en lo que se denominaría termogénesis adaptativa que conllevaría una inducción de la expresión de *CREG1* que a su vez produciría un aumento en la formación de tejido adiposo pardo, del “browning”, y una sobreexpresión de la proteína UCP1 con el consecuente aumento de la termogénesis y la disminución del desarrollo de la obesidad¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Interesantemente, un trabajo llevado a cabo por Agarwal *et al.* en 2021 destaca la importancia de la proteína viral R (Vpr) en la desregulación del proceso de termogénesis en el tejido adiposo y en el metabolismo lipídico hepático, tanto en modelos de ratones transgénicos como en muestras de biopsias de PVIH^{110,111}. Este proceso tiene también como protagonista el incremento en la expresión de *UCP1* en adipocitos del tejido adiposo blanco dando lugar a la aparición de adipocitos “beige” o “brite” involucrados en la alteración del proceso de la termogénesis. Alteraciones vinculadas con perturbaciones metabólicas relacionadas con la dislipemia y la resistencia a la insulina han sido observadas de forma similar en pacientes VIH tratados y con cargas virales inferiores a 50 copias/mL¹¹⁰. Brevemente, las PVIH presentan Vpr1 circulando en sangre, independientemente de estar bajo TAR y con cargas virales suprimidas. Por otro lado, en este estudio reproducen, en modelos de ratones transgénicos con Vpr1 en sangre, los defectos metabólicos relacionados con la infección por el VIH (hiperglicemia, resistencia a la insulina, EH, lipólisis acelerada y disminución de la masa grasa). Aunque en este trabajo no se hace mención a *CREG1*, sería interesante dilucidar el posible papel de esta proteína en este proceso de desregulación en pacientes infectados por el VIH donde, en un contexto en el que Vpr1 está circulando en sangre, la sobreexpresión de UCP1 podría estar mediada por nuestro gen candidato *CREG1*. Todo esto podría sugerir que una posible interacción entre las rutas moleculares o procesos biológicos, en los que están implicados *CREG1* y

UCP1 podría explicar la importancia de CREG1 en el desarrollo de la EH en la población infectada. Sin embargo, antes de estudiar esa posible interacción, es prioritario validar la asociación del gen *CREG1* con la EH en las PVIH mediante estudios funcionales y de asociación génica. En la figura 7 se muestran los genotipos que se han llevado a cabo en la región genómica de *CREG1* y el SNP que ha mostrado mejor valor de p de asociación. Esta información facilitará la validación de nuestros resultados en futuros trabajos que se realicen en nuestro grupo o en otros grupos de investigación.

Figura 7. Representación por LocusZoom (<http://locuszoom.org/>) de aquellos SNPs asociados con la EHGNA en la región genómica del locus *CREG1*. El SNP en púrpura (rs7513428) representa la mejor asociación.



Es importante destacar que ninguno de los SNPs que se asociaron a la EHG en estudios de asociación génica masiva en población general, ni siquiera el más frecuentemente validado (rs738409) y ligado al gen *PNPLA3*, se asociaron a la EHG en nuestra población de PVIH, ni siquiera de forma nominal ($p < 0,05$) (tabla 8). Este resultado ya fue previamente reportado, parcialmente, por nuestro grupo⁴⁹. Aproximadamente la mitad de la población de estudio incluida en ese trabajo previo es la misma que se

incluye en el presente estudio, por lo que la falta de asociación podría estar condicionada por este hecho. Sin embargo, esta falta de asociación también fue comunicada por otros autores⁵⁰⁻⁵². En ese mismo estudio de Macías *et al.* se observó un polimorfismo de *LPPR4* (rs12743824) asociado a la EHG⁴⁹. Sin embargo, ese marcador no ha sido incluido dentro de los SNPs estudiados en el presente trabajo, y, por tanto no ha sido posible su validación.

Tomados en su conjunto, nuestros datos sugieren que los condicionantes génicos de la EHG en las PVIH pueden ser diferentes a los de la población general, pero, además, pueden tener un efecto marginal, sobre todo teniendo en cuenta el enorme efecto que tienen los condicionantes metabólicos.

El presente estudio tiene algunas limitaciones. En primer lugar, y en relación al estudio llevado a cabo para alcanzar el objetivo 1, éste se diseñó como un estudio retrospectivo y este diseño puede implicar una limitación en la recopilación de datos no planificados en la práctica clínica habitual, como sería el caso de la determinación de la resistencia a la insulina. No obstante, todos los pacientes atendidos en nuestra Unidad, se someten al mismo protocolo en su visita clínica inicial, incluida la evaluación de esteatosis por CAP que sólo no estuvo disponible en aquellos pacientes en los que fue imposible la obtención de imágenes. En segundo lugar, el consumo de alcohol fue autorreferido por los pacientes durante la entrevista clínica y esto podría subestimar la cantidad real de consumo de alcohol y su efecto real sobre el desarrollo de la EHG. En tercer lugar, la EH en el presente estudio podría ser debida a una mezcla de causas que van desde la verdadera EHGNA asociada con factores metabólicos hasta la esteatosis secundaria relacionada con la infección por el genotipo 3 del VHC. A pesar de esto, los principales factores asociados con la EHG en el presente estudio fueron los factores metabólicos típicamente asociados a la EHGNA. Incluso teniendo en cuenta estos aspectos, es importante señalar que la principal fortaleza de este estudio es la comparación de la prevalencia y los factores asociados a la EH en una población homogénea dentro de la misma Unidad, según el mismo protocolo y evaluados con una técnica uniforme a lo largo del estudio.

En cuanto a las limitaciones relacionadas con el estudio para alcanzar el objetivo 2, en primer lugar, se utilizó un número de pacientes relativamente bajo para llevar a cabo

un GWAS. Así, este estudio tuvo una potencia del 80% para poder detectar alelos con una frecuencia de 0,35 que tuvieran un tamaño de efecto (*odds ratio*) de 3,4 al nivel de significación exigido para estos estudios. Por tanto, aunque sí es suficiente para detectar efectos potentes, no lo es para detectar tamaños de efecto relativamente bajos como es el caso de la mayoría de los efectos de locus discretos en las enfermedades multifactoriales como la EHG. Sin embargo, el tamaño muestral usado fue más que suficiente para validar los SNPs previamente asociados a la EH en la población general. Sin embargo, ninguno de los que fueron incluidos en nuestro estudio mostraron asociación nominal con la enfermedad. A pesar de todo, y hasta donde alcanza nuestro conocimiento, este estudio supone el primer GWAS llevado a cabo en la EGH en PVIH. Segundo, no se incluyó una muestra de validación. Por este motivo, son necesarios estudios de validación de aquellas señales identificadas como sugestivas de estar asociadas para confirmar nuestros resultados. Tercero, se incluyeron pacientes con infección activa por el VHC y/o con carga viral detectable del VIH que podrían haber distorsionado los resultados. Sin embargo, el efecto de estos factores, según hemos visto en esta tesis, no parece ser determinante en la aparición de la EGH. A pesar de ello, nuestros resultados se ajustaron por todos aquellos factores asociados a la EHG en esta población específica. Finalmente, se incluyeron en este estudio sólo aquellos pacientes de los que se disponía de una muestra de ADN por lo que es posible que haya desviaciones no controladas. A pesar de ello, volvemos a constatar que las principales señales involucradas en la susceptibilidad a la EHG en la población general no se observan en las PVIH, tal y como previamente ya habíamos reportado⁴⁹.

9. Conclusiones

1. La infección por el VIH no parece estar relacionada con el desarrollo de la EHG.
2. El factor más importante de riesgo para desarrollar EHG en las PVIH es la obesidad.
3. Los factores genéticos implicados en el riesgo a desarrollar EHG en la población general no tienen efecto en las PVIH.
4. Los resultados obtenidos en los estudios de asociación genética sugieren la implicación de otros genes diferentes a los observados en la población general en el desarrollo de la EH en las PVIH.

10. Bibliografía

1. Mitra S, De A, Chowdhury A. Epidemiology of non-alcoholic and alcoholic fatty liver diseases. *Translational Gastroenterology and Hepatology*. 2020;5.
2. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2018;67:328–357.
3. Karlas T, Petroff D, Sasso M, et al. Individual patient data meta-analysis of controlled attenuation parameter (CAP) technology for assessing steatosis. *J Hepatol*. 2017;66:1022–1030.
4. Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease – A global public health perspective. *Journal of Hepatology*. 2019;70:531–544.
5. Demir M, Lang S, Steffen HM. Nonalcoholic fatty liver disease - current status and future directions. *J Dig Dis*. 2015;16:541–557.
6. Juanola O, Martínez-López S, Francés R, Gómez-Hurtado I. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Metabolic, Genetic, Epigenetic and Environmental Risk Factors. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18.
7. Eslam M, Sanyal AJ, George J, et al. MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2020;158:1999-2014.e1.
8. Shiha G, Mousa N. Non-alcoholic steatohepatitis or metabolic-associated fatty liver: time to change. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2021;10:123–125.
9. Bedossa P, Poitou C, Veyrie N, et al. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology*. 2012;56:1751–1759.
10. Loomba R, Friedman SL, Shulman GI. Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease. *Cell*. 2021;184:2537–2564.

11. Diehl AM, Day C. Cause, Pathogenesis, and Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis. *N Engl J Med*. 2017;377:2063–2072.
12. Singh SP, Singh A, Misra D, et al. Risk Factors Associated With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Indians: A Case-Control Study. *J Clin Exp Hepatol*. 2015;5:295–302.
13. Angulo P, Machado MV, Diehl AM. Fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: Mechanisms and clinical implications. *Semin Liver Dis*. 2015;35:132–145.
14. Scheuer PJ. The nomenclature of chronic hepatitis: time for a change. *J Hepatol*. 1995;22:112–114.
15. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 1996;24:289–293.
16. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64:73–84.
17. Anstee QM, Targher G, Day CP. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10:330–344.
18. Musso G, Gambino R, Tabibian JH, et al. Association of non-alcoholic fatty liver disease with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med*. 2014;11.
19. Vodkin I, Valasek MA, Bettencourt R, Cachay E, Loomba R. Clinical, biochemical and histological differences between HIV-associated NAFLD and primary NAFLD: a case-control study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2015;41:368–378.
20. Macías J, Berenguer J, Japón MA, et al. Hepatic steatosis and steatohepatitis in human immunodeficiency virus/hepatitis C virus-coinfected patients. *Hepatology*. 2012;56:1261–1270.
21. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: A proposal for grading and staging the histological

lesions. *Am J Gastroenterol*. 1999;94:2467–2474.

22. Guaraldi G, Squillace N, Stentarelli C, et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease in HIV-Infected Patients Referred to a Metabolic Clinic: Prevalence, Characteristics, and Predictors. *Clin Infect Dis*. 2008;47:250–257.

23. Vuille-Lessard É, Lebouché B, Lennox L, et al. Nonalcoholic fatty liver disease diagnosed by transient elastography with controlled attenuation parameter in unselected HIV monoinfected patients. *AIDS*. 2016;30:2635–2643.

24. Macías J, González J, Tural C, et al. Prevalence and factors associated with liver steatosis as measured by transient elastography with controlled attenuation parameter in HIV-infected patients. *AIDS*. 2014;28:1279–1287.

25. van Welzen BJ, Mudrikova T, El Idrissi A, Hoepelman AIM, Arends JE. A Review of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in HIV-Infected Patients: The Next Big Thing? *Infect Dis Ther*. 2019;8:33–50.

26. Sterling RK, Smith PG, Brunt EM. Hepatic steatosis in human immunodeficiency virus: A prospective study in patients without viral hepatitis, diabetes, or alcohol abuse. *J Clin Gastroenterol*. 2013;47:182–187.

27. Morse CG, McLaughlin M, Matthews L, et al. Nonalcoholic steatohepatitis and hepatic fibrosis in HIV-1-monoinfected adults with elevated aminotransferase levels on antiretroviral therapy. In: *Clinical Infectious Diseases*. *Clin Infect Dis*; 2015. p. 1569–1578.

28. Machado MV, Oliveira AG, Cortez-Pinto H. Hepatic steatosis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus/hepatitis C virus: A meta-analysis of the risk factors. *Hepatology*. 2010;52:71–78.

29. Price JC, Seaberg EC, Latanich R, et al. Risk factors for fatty liver in the Multicenter AIDS Cohort Study. *Am J Gastroenterol*. 2014;109:695–704.

30. Aepfelbacher JA, Balmaceda J, Purdy J, et al. Increased Prevalence of Hepatic Steatosis in Young Adults with Lifelong HIV. *J Infect Dis*. 2019;220:266–269.

31. Sulyok M, Makara M, Rupnik Z, et al. Hepatic steatosis in individuals living with HIV measured by controlled attenuation parameter: a cross-sectional study. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2015;27:679–85.
32. Fernandez-Botran R, Plankey MW, Ware D, Bordon J. Changes in liver steatosis in HIV-positive women are associated with the BMI, but not with biomarkers. *Cytokine*. 2021;144.
33. Brouwers MCGJ, Cantor RM, Kono N, et al. Heritability and genetic loci of fatty liver in familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res*. 2006;47:2799–2807.
34. Schwimmer JB, Celedon MA, Lavine JE, et al. Heritability of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2009;136:1585–1592.
35. Speliotes EK, Yerges-Armstrong LM, Wu J, et al. Genome-wide association analysis identifies variants associated with nonalcoholic fatty liver disease that have distinct effects on metabolic traits. *PLoS Genet*. 2011;7.
36. Ghodsian N, Abner E, Emdin CA, et al. Electronic health record-based genome-wide meta-analysis provides insights on the genetic architecture of non-alcoholic fatty liver disease. *Cell Reports Med*. 2021;2.
37. Chung GE, Lee Y, Yim JY, et al. Genetic polymorphisms of PNPLA3 and SAMM50 are associated with nonalcoholic fatty liver disease in a Korean population. *Gut Liver*. 2018;12:316–323.
38. Park SL, Li Y, Sheng X, et al. Genome-Wide Association Study of Liver Fat: The Multiethnic Cohort Adiposity Phenotype Study. *Hepatol Commun*. 2020;4:1112–1123.
39. Miao Z, Garske KM, Pan DZ, et al. Identification of 90 NAFLD GWAS loci and establishment of NAFLD PRS and causal role of NAFLD in coronary artery disease. *Hum Genet Genomics Adv*. 2022;3.
40. Fairfield CJ, Drake TM, Pius R, et al. Genome-Wide Association Study of NAFLD Using Electronic Health Records. *Hepatol Commun*. 2022;6:297–308.

41. Adams LA, White SW, Marsh JA, et al. Association between liver-specific gene polymorphisms and their expression levels with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2013;57:590–600.
42. Anstee QM, Darlay R, Cockell S, et al. Genome-wide association study of non-alcoholic fatty liver and steatohepatitis in a histologically characterised cohort ☆. *J Hepatol*. 2020;73:505–515.
43. Namjou B, Lingren T, Huang Y, et al. GWAS and enrichment analyses of non-alcoholic fatty liver disease identify new trait-associated genes and pathways across eMERGE Network. *BMC Med*. 2019;17:1–19.
44. Chalasani N, Guo X, Loomba R, et al. Genome-wide association study identifies variants associated with histologic features of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2010;139.
45. Kozlitina J, Smagris E, Stender S, et al. Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet*. 2014;46:352–356.
46. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet*. 2008;40:1461–1465.
47. Kawaguchi T, Sumida Y, Umemura A, et al. Genetic polymorphisms of the human PNPLA3 gene are strongly associated with severity of non-alcoholic fatty liver disease in Japanese. *PLoS One*. 2012;7:e38322.
48. Kitamoto T, Kitamoto A, Yoneda M, et al. Genome-wide scan revealed that polymorphisms in the PNPLA3, SAMM50, and PARVB genes are associated with development and progression of nonalcoholic fatty liver disease in Japan. *Hum Genet*. 2013;132:783–792.
49. Macias J, Rivero-Juarez A, Neukam K, et al. Impact of genetic polymorphisms associated with nonalcoholic fatty liver disease on HIV-infected individuals. *AIDS*. 2015;29:1927–1935.

50. Jimenez-Sousa MA, Berenguer J, Garcia-Alvarez M, et al. Impact of patatin-like phospholipase domain-containing 3 gene polymorphism (rs738409) on severity of liver disease in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. *AIDS*. 2016;30:465–470.
51. Scheiner B, Mandorfer M, Schwabl P, et al. The impact of PNPLA3 rs738409 SNP on liver fibrosis progression, portal hypertension and hepatic steatosis in HIV/HCV coinfection. *PLoS One*. 2015;10.
52. Dold L, Luda C, Schwarze-Zander C, et al. Genetic polymorphisms associated with fatty liver disease and fibrosis in HIV positive patients receiving combined antiretroviral therapy (cART). *PLoS One*. 2017;12.
53. Núñez-Torres R, Macías J, Rivero-Juarez A, et al. Fat mass and obesity-associated gene variations are related to fatty liver disease in HIV-infected patients. *HIV Med*. 2017;18:546–554.
54. Yang X, Li X, Qiao S, Zhang Q, Shen Z, Zhou Y. Immunological and virologic outcomes of people living with HIV in Guangxi, China: 2012-2017. *PLoS One*. 2019;14.
55. Domingo P, Lozano F. Management of antiretroviral drug toxicity. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29:535–544.
56. Dionne B. Key Principles of Antiretroviral Pharmacology. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2019;33:787–805.
57. Cunha J da. Impact of antiretroviral therapy on lipid metabolism of human immunodeficiency virus-infected patients: Old and new drugs. *World J Virol*. 2015;4:56.
58. Surial B, Mugglin C, Calmy A, et al. Weight and metabolic changes after switching from tenofovir disoproxil fumarate to tenofovir alafenamide in people living with HIV: A Cohort Study. *Ann Intern Med*. 2021;174:758–767.
59. Bischoff J, Gu W, Schwarze-Zander C, et al. Stratifying the risk of NAFLD in patients with HIV under combination antiretroviral therapy (cART). *eClinicalMedicine*. 2021;40:101116.

60. Crane HM, Grunfeld C, Willig JH, et al. Impact of NRTIs on lipid levels among a large HIV-infected cohort initiating antiretroviral therapy in clinical care. *AIDS*. 2011;25:185–195.
61. Sankatsing RR, Wit FW, Vogel M, et al. Increased carotid intima-media thickness in HIV patients treated with protease inhibitors as compared to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Atherosclerosis*. 2009;202:589–595.
62. Apostolova N, Blas-García A, Esplugues J V. Mitochondrial interference by anti-HIV drugs: Mechanisms beyond Pol- γ inhibition. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2011;32:715–725.
63. Schank M, Zhao J, Moorman JP, Yao ZQ. The impact of hiv-and art-induced mitochondrial dysfunction in cellular senescence and aging. *Cells*. 2021;10:1–21.
64. Wei Y, Rector RS, Thyfault JP, Ibdah JA. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World Journal of Gastroenterology*. 2008;14:193–199.
65. Zhao J, Nguyen LNT, Nguyen LN, et al. ATM Deficiency Accelerates DNA Damage, Telomere Erosion, and Premature T Cell Aging in HIV-Infected Individuals on Antiretroviral Therapy. *Front Immunol*. 2019;10.
66. Piekna-Przybylska D, Sharma G, Maggirwar SB, Bambara RA. Deficiency in DNA damage response, a new characteristic of cells infected with latent HIV-1. *Cell Cycle*. 2017;16:968–978.
67. Van Epps P, Kalayjian RC. Human Immunodeficiency Virus and Aging in the Era of Effective Antiretroviral Therapy. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2017;31:791–810.
68. Kirkegaard-Klitbo DM, Thomsen MT, Gelpi M, Bendtsen F, Nielsen SD, Benfield T. Hepatic Steatosis Associated with Exposure to Elvitegravir and Raltegravir. *Clin Infect Dis*. 2021;73:E811–E814.
69. Macías J, Mancebo M, Merino D, et al. Changes in liver steatosis after switching from efavirenz to raltegravir among human immunodeficiency virus-infected patients

with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Infect Dis*. 2017;65:1012–1019.

70. Thomas DL. Global control of hepatitis C: Where challenge meets opportunity. *Nature Medicine*. 2013;19:850–858.

71. Leandro G, Mangia A, Hui J, et al. Relationship Between Steatosis, Inflammation, and Fibrosis in Chronic Hepatitis C: A Meta-Analysis of Individual Patient Data. *Gastroenterology*. 2006;130:1636–1642.

72. Rodríguez-Torres M, Govindarajan S, Solá R, et al. Hepatic steatosis in HIV/HCV co-infected patients: Correlates, efficacy and outcomes of anti-HCV therapy: A paired liver biopsy study. *J Hepatol*. 2008;48:756–764.

73. Estes C, Anstee QM, Arias-Loste MT, et al. Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016–2030. *J Hepatol*. 2018;69:896–904.

74. Dyson JK, Anstee QM, McPherson S. Non-alcoholic fatty liver disease: A practical approach to treatment. *Frontline Gastroenterology*. 2014;5:277–286.

75. Brown E, Hydes T, Hamid A, Cuthbertson DJ. Emerging and Established Therapeutic Approaches for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clinical Therapeutics*. 2021. doi:10.1016/j.clinthera.2021.07.013

76. Kaplan A, Price JC. HIV-Associated NAFLD: Disease Burden and Management. *Curr Hepatol Reports*. 2019;18:482–491.

77. Safadi R, Konikoff FM, Mahamid M, et al. The Fatty Acid-Bile Acid Conjugate Aramchol Reduces Liver Fat Content in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014;12:2085-2091.e1.

78. Ajmera VH, Cachay E, Ramers C, et al. MRI Assessment of Treatment Response in HIV-associated NAFLD: A Randomized Trial of a Stearoyl-Coenzyme-A-Desaturase-1 Inhibitor (ARRIVE Trial). *Hepatology*. 2019;70:1531–1545.

79. Stanley TL, Feldpausch MN, Oh J, et al. Effect of tesamorelin on visceral fat and

liver fat in HIV-infected patients with abdominal fat accumulation: A randomized clinical trial. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2014;312:380–389.

80. Stanley TL, Fourman LT, Feldpausch MN, et al. Effects of Tesamorelin on Nonalcoholic Fatty Liver Disease in HIV: A Randomized, Double-Blind, Multicenter Trial. *lancet HIV.* 2019;6:e821.

81. Castera L, Forns X, Alberti A. Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. *J Hepatol.* 2008;48:835–847.

82. Recio E, Cifuentes C, Macías J, et al. Interobserver concordance in controlled attenuation parameter measurement, a novel tool for the assessment of hepatic steatosis on the basis of transient elastography. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2013;25:905–911.

83. Barsh GS, Copenhaver GP, Gibson G, Williams SM. Guidelines for genome-wide association studies. *PLoS Genet.* 2012;8.

84. McLaren W, Gil L, Hunt SE, et al. The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol.* 2016;17.

85. de Leeuw CA, Mooij JM, Heskes T, Posthuma D. MAGMA: generalized gene-set analysis of GWAS data. *PLoS Comput Biol.* 2015;11.

86. Ge SX, Jung D, Jung D, Yao R. ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics.* 2020;36:2628–2629.

87. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet.* 2000;25:25–29.

88. Carbon S, Douglass E, Good BM, et al. The Gene Ontology resource: enriching a GOLD mine. *Nucleic Acids Res.* 2021;49:D325–D334.

89. Mohr R, Boesecke C, Dold L, et al. Return-to-health effect of modern combined antiretroviral therapy potentially predisposes HIV patients to hepatic steatosis. *Medicine (Baltimore).* 2018;97:e0462.

90. Pembroke T, Deschenes M, Lebouché B, et al. Hepatic steatosis progresses faster in HIV mono-infected than HIV/HCV co-infected patients and is associated with liver fibrosis. *J Hepatol.* 2017;67:801–808.
91. Sansom SE, Martin J, Adeyemi O, et al. Steatosis Rates by Liver Biopsy and Transient Elastography With Controlled Attenuation Parameter in Clinical Experience of Hepatitis C Virus (HCV) and Human Immunodeficiency Virus/HCV Coinfection in a Large US Hepatitis Clinic. *Open Forum Infect Dis.* 2019;6:ofz099.
92. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology.* 2004;40:1387–95.
93. Macías J, Pineda JA, Real LM. Non-alcoholic fatty liver disease in HIV infection. *AIDS Rev.* 2017;19:35–46.
94. Zanini S, Giovinazzo F, Alaimo D, et al. GNA15 expression in small intestinal neuroendocrine neoplasia: Functional and signalling pathway analyses. *Cell Signal.* 2015;27:899–907.
95. Wu J, Qu J, Cao H, et al. Monoclonal antibody AC10364 inhibits cell proliferation in 5-fluorouracil resistant hepatocellular carcinoma via apoptotic pathways. *Oncotargets Ther.* 2019;12:5053–5067.
96. Innamorati G, Wilkie TM, Malpeli G, et al. Gα15 in early onset of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Sci Rep.* 2021;11.
97. Li M, Liu Y, Liu Y, et al. Downregulation of GNA15 Inhibits Cell Proliferation via P38 MAPK Pathway and Correlates with Prognosis of Adult Acute Myeloid Leukemia With Normal Karyotype. *Front Oncol.* 2021;11.
98. Fløyel T, Mirza AH, Kaur S, et al. The Rac2 GTPase contributes to cathepsin H-mediated protection against cytokine-induced apoptosis in insulin-secreting cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2020;518.
99. Liao YC, Lo SH. Tensins - emerging insights into their domain functions, biological

roles and disease relevance. *J Cell Sci.* 2021;134.

100. Zheng JY, Wang CY, Gao C, et al. MLL3 suppresses tumorigenesis through regulating TNS3 enhancer activity. *Cell Death Dis.* 2021;12.

101. Nizioł M, Zińczuk J, Zaręba K, Guzińska-Ustymowicz K, Pryczynicz A. Immunohistochemical analysis of the expression of adhesion proteins: Tns1, tns2 and tns3 in correlation with clinicopathological parameters in gastric cancer. *Biomolecules.* 2021;11.

102. Salichs E, Ledda A, Mularoni L, Albà MM, De La Luna S. Genome-Wide analysis of histidine repeats reveals their role in the localization of human proteins to the nuclear speckles compartment. *PLoS Genet.* 2009;5:e1000397.

103. Kirovski G, Stevens AP, Czech B, et al. Down-regulation of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) induces progression of hepatocellular carcinoma via accumulation of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine (MTA). *Am J Pathol.* 2011;178:1145–1152.

104. Czech B, Dettmer K, Valletta D, et al. Expression and Function of Methylthioadenosine Phosphorylase in Chronic Liver Disease. *PLoS One.* 2013;8:80703.

105. Wu M, Yin F, Wei X, et al. Hepatocyte-specific deletion of cellular repressor of E1A-stimulated genes 1 exacerbates alcohol-induced liver injury by activating stress kinases. *Int J Biol Sci.* 2022;18:1612–1626.

106. Hashimoto M, Kusudo T, Takeuchi T, Kataoka N, Mukai T, Yamashita H. CREG1 stimulates brown adipocyte formation and ameliorates diet-induced obesity in mice. *FASEB J.* 2019;33:8069–8082.

107. Endo Y, Hashimoto M, Kusudo T, et al. CREG1 improves diet-induced obesity via uncoupling protein 1-dependent manner in mice. *Genes to Cells.* 2022. doi:10.1111/gtc.12920

108. Kusudo T, Okada T, Hashimoto M, et al. CREG1 administration stimulates BAT thermogenesis and improves diet-induced obesity in mice. *J Biochem.* 2022;171:63–73.

109. Tian X, Yan C, Liu M, et al. CREG1 heterozygous mice are susceptible to high fat diet-induced obesity and insulin resistance. *PLoS One*. 2017;12.
110. Agarwal N, Iyer D, Saha P, et al. HIV-1 Viral Protein R Couples Metabolic Inflexibility With White Adipose Tissue Thermogenesis. *Diabetes*. 2021;70:2014–2025.
111. Agarwal N, Iyer D, Patel SG, et al. HIV-1 Vpr induces adipose dysfunction in vivo through reciprocal effects on PPAR/GR co-regulation. *Sci Transl Med*. 2013;5.

11. Anexos

Anexo I: Polimorfismos genéticos identificados en estudios GWAS como asociados con la susceptibilidad a desarrollar EHGNA. Se indican los tamaños de efecto, los fenotipos concretos analizados y las etnias sobre las que se han realizado cada uno de los estudios.

SNP	Cr	Gen	A1/A2	Fenotipo	Efecto ^a	Etnia	Ref
rs2642442	1	MARC1	C/T	Diagnóstico EHGNA por códigos Read	1,15 (1,10-1,20)	Población europea	40
rs12137855	1	LYPLAL1	C/T	EH medida por CT	0,08	Población Amish y europea (Meta-GWAS)	35
rs12743824	1	LPPR4	C/A	EH medida por CT	2,30	Adolescentes caucásicos	41
rs1260326	2	GCKR	T/C	Diagnóstico EHGNA por códigos Read	0,87 (0,84-0,91)	Población europea	40
rs1260326	2	GCKR	T/C	EHGNA caracterizada clínicamente	0,11	Población europea	36
rs780094	2	GCKR	A/G	EH medida por CT	0,06	Población Amish y europea (Meta-GWAS)	35
rs780094	2	GCKR	A/G	EHGNA por RM	8,47x10 ³	Población europea	39
rs1260326	2	GCKR	T/C	EHGNA caracterizada clínicamente	0,11	Población europea	36
rs1919127	2	GCKR	C/T	EHGNA caracterizada histológicamente	1,31 (1,19-1,44)	Población europea	42
rs9992651	4	HSD17B13	A/G	EHGNA caracterizada histológicamente	0,75 (0,67-0,83)	Población europea	42

rs222054	4	GC	C/G	EH medida por CT	2,54	Adolescentes caucásicos	41
rs77249491	6	LMBRD1/ COL19A1	A/G	Contenido graso por RM	0,18	Poblaciones afroamericana, de ascendencia europea, hispana y otras ascendencias.	38
rs77249491	6	LMBRD1/ COL19A1	A/G	Contenido graso por RM	0,18	Poblaciones afroamericana, de ascendencia europea, hispana y otras ascendencias.	38
rs2645424	8	FDFT1	T/C	Clasificación histológica para EHGNA	0,76	Mujeres caucásicas	44
rs2954038	8	TRB1	C/T	EHGNA caracterizada clínicamente	1,35 (1,20-1,52)	Población europea	43
rs2980888	8	TRB1	T/C	EHGNA caracterizada clínicamente	1,36 (1,20-1,53)	Población europea	43
rs2980888	8	TRB1	T/C	EHGNA por RM	0,01	Población europea	39
rs2954021	8	TRB1	A/G	EHGNA por RM	$1,06 \times 10^{-2}$	Población europea	39
rs28601761	8	TRB1	C/G	EHGNA caracterizada clínicamente	0,12	Población europea	36
rs17321515	8	TRB1	G/A	Diagnóstico EHGNA por códigos Read	0,86 (0,82-0,89)	Población europea	40

rs4240624	8	<i>PPP1R3B</i>	A/G	EH medida por CT	0,29	Población Amish y europea (Meta-GWAS)	35
rs7324845*	13	<i>LCP1</i>	A/G	EH medida por CT	3,29	Adolescentes caucásicos	41
rs11864146	16	<i>SLC38A8</i>	A/G	EH medida por CT	3,14	Adolescentes caucásicos	41
rs10500212	19	<i>PBX4</i>	T/C	EHGNA caracterizada histológicamente	1,56 (1,36-1,79)	Población europea	42
rs58542926	19	<i>TM6SF2</i>	T/C	EHGNA caracterizada histológicamente	1,65 (1,40-1,94)	Población europea	42
rs58542926	19	<i>TM6SF2</i>	T/C	Contenido de grasa hepática por RMN	NR	Poblaciones afroamericana, de ascendencia europea, hispana y otras ascendencias.	45
rs58542926	19	<i>TM6SF2</i>	T/C	Diagnóstico EHGNA por métodos ultrasonográficos	1,67 (1,39-2,01)	Población coreana	37
rs58542926	19	<i>TM6SF2</i>	T/C	EHGNA por RM	$9,55 \times 10^{-3}$	Población europea	39
rs73001065	19	<i>MAU2/TM6SF2</i>	C/G	EHGNA caracterizada clínicamente	0,28	Población europea	36
rs73001065	19	<i>MAU2/TM6SF2</i>	C/G	EHGNA por RM	NR	Población europea	39
rs73001065	19	<i>MAU2/TM6SF2</i>	C/G	Diagnóstico EHGNA por códigos Read	1,41 (1,32-1,51)	Población europea	40
rs429358	19	<i>APOE</i>	C/T	Diagnóstico EHGNA por códigos Read	0,82 (0,77-0,87)	Población europea	40

rs2228603	19	NCAN	T/C	EH medida por CT	0,24	Población Amish y europea (Meta-GWAS)	35
rs3747207	22	PNPLA3	A/G	EHGNA caracterizada clínicamente	0,29	Población europea	36
rs3747207	22	PNPLA3	A/G	Diagnóstico EHGNA por códigos Read	1,45 (1,38-1,51)	Población europea	40
rs738409	22	PNPLA3	G/C	EHGNA caracterizada clínicamente	1,79 (1,58-2,02)	Población europea	43
rs738409	22	PNPLA3	G/C	EHGNA por RM	$1,19 \times 10^{-2}$	Población europea	39
rs738409	22	PNPLA3	G/C	Contenido de grasa hepática por RMN	NR	Poblaciones afroamericana, europea e hispana	46
rs738409	22	PNPLA3	G/C	EH medida por CT	0,26	Población Amish y europea (Meta-GWAS)	35
rs738409	22	PNPLA3	G/C	EHGNA caracterizada histológicamente	1,66 (1,43-1,94)	Población japonesa	47
rs738409	22	PNPLA3	G/C	EHGNA caracterizada histológicamente	1,83 (1,69-1,98)	Población europea	42
rs738409	22	PNPLA3	G/C	EHGNA caracterizada histológicamente	2,21 (1,46-3,35)	Población japonesa	48

rs738409	22	<i>PNPLA3</i>	G/C	Contenido de grasa hepática por RMN	NR	Poblaciones afroamericana, de ascendencia europea, hispana y otras ascendencias.	45
rs738409	22	<i>PNPLA3</i>	G/C	Diagnóstico EHGNA por métodos ultrasonográficos	1,54 (1,38–1,71)	Población coreana	37
rs738409	22	<i>PNPLA3</i>	G/C	Contenido graso por RM	0,08	Poblaciones afroamericana, de ascendencia europea, hispana y otras ascendencias.	38
rs12483959	22	<i>PNPLA3</i>	A/G	Diagnóstico EHGNA por métodos ultrasonográficos	1,53 (1,37–1,69)	Población coreana	37
rs2281135	22	<i>PNPLA3</i>	A/G	Diagnóstico EHGNA por métodos ultrasonográficos	1,52 (1,37–1,69)	Población coreana	37
rs3747207	22	<i>PNPLA3</i>	A/G	EHGNA caracterizada clínicamente	1,78 (1,58–2,02)	Población europea	43
rs2294915	22	<i>PNPLA3</i>	T/C	EHGNA caracterizada clínicamente	1,75 (1,55–1,97)	Población europea	43
rs5748926	22	<i>IL17RA</i>	T/C	Clasificación histológica para EHGNA	0,91	Población europea	43
rs5764455	22	<i>PARVB</i>	A/G	EHGNA caracterizada histológicamente	1,63 (1,38–1,93)	Población japonesa	48
rs6006473	22	<i>PARVB</i>	T/C	EHGNA caracterizada histológicamente	1,96 (1,65–2,32)	Población japonesa	48

rs6006611	22	PARVB	G/A	EHGNA caracterizada histológicamente	1,58 (1,33- 1,88)	Población japonesa	48
rs738491	22	SAMM50	T/C	EHGNA caracterizada histológicamente	1,54 (1,30- 1,83)	Población japonesa	48
rs2143571	22	SAMM50	A/G	EHGNA caracterizada histológicamente	1,68 (1,42- 1,99)	Población japonesa	48
rs2143571	22	SAMM50	A/G	Diagnóstico EHGNA por métodos ultrasonográficos	1,44 (1,29- 1,59)	Población coreana	37
rs3761472	22	SAMM50	C/T	EHGNA por RM	$8,97 \times 10^{-3}$	Población europea	39
rs3761472	22	SAMM50	C/T	EHGNA caracterizada histológicamente	1,74 (1,47- 2,06)	Población japonesa	48
rs3761472	22	SAMM50	C/T	Diagnóstico EHGNA por métodos ultrasonográficos	1,43 (1,29- 1,59)	Población coreana	37
rs2073080	22	SAMM50	T/C	Diagnóstico EHGNA por métodos ultrasonográficos	1,43 (1,29- 1,59)	Población coreana	37

^aOdds ratio con el 95% intervalo de confianza o Coeficiente de correlación.

Abreviaturas: SNP: polimorfismo de nucleótido simple; Cr: cromosoma; A1: alelo menos frecuente (alelo al que se refiere el efecto); A2: alelo más frecuente (alelo de referencia); EHGNA: enfermedad hepática grasa no alcohólica; CT: tomografía computerizada; RM: resonancia magnética; RMN: resonancia magnética nuclear; NR: no reportado.