Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas

Análisis bioinformático longitudinal de la microbiota intestinal en pacientes con VIH virológicamente suprimidos

---

José Alberto García Gómez

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

Director de la tesis:

Dr. Félix Gutiérrez Rodero

Codirectora de la tesis:

Dra. María del Mar Masiá Canuto

Universidad Miguel Hernández de Elche

2026

La presente Tesis Doctoral, titulada “Análisis bioinformático longitudinal de la microbiota intestinal en pacientes con VIH virológicamente suprimidos ”, se presenta bajo la modalidad de tesis por compendio de las siguientes publicaciones:

- García-Abellán J, García JA, Galdámez R, Gosalbes MJ, Fernández-González M, Padilla S, Mascarell P, Telenti G, Gutiérrez F, Masiá M. Gut microbiota and weight gain in people with HIV on integrase inhibitors: a five-year longitudinal study. J Antimicrob Chemother. 2025 Aug 1;80(8):2145-2157. doi: 10.1093/jac/dkaf182. PMID: 40470774.

- Masiá M, García JA, García-Abellán J, Padilla S, Fernández-González M, Agulló V, Gosalbes MJ, Ruíz-Pérez S, Mascarell P, Botella A, Gutiérrez F. Distinct Gut Microbiota Signatures Associated With Progression of Atherosclerosis in People Living With Human Immunodeficiency Virus. J Infect Dis. 2025 Jul 11;231(6):1371-1381. doi: 10.1093/infdis/jiae243. PMID: 38743815.

El director de la Teis D. Félix Gutiérrez Rodero y la codirectora Dña. María del Mar Masiá Canuto de la tesis doctoral titulada “Análisis bioinformático longitudinal de la microbiota intestinal en pacientes con VIH virológicamente suprimidos”

INFORMA/N:

Que D. José Alberto García Gómez ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo titulado “Análisis bioinformático longitudinal de la microbiota intestinal en pacientes con VIH virológicamente suprimidos.” conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmamos para los efectos oportunos, en …… a ……. de …….. de 202….

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

Firmado: D. Félix Gutiérrez Rodero

Firmado: Dña. María del Mar Masiá Canuto

La Dra. Dña. María del Mar Masiá Canuto", Coordinadora del Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas

INFORMA:

Que D./Dña. José Alberto García Gómez ha realizado bajo la supervisión de nuestro Programa de Doctorado el trabajo titulado "Análisis bioinformático longitudinal de la microbiota intestinal en pacientes con VIH virológicamente suprimidos" conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmo para los efectos oportunos, en …… a ……. de …….. de 202….

Firmado: Dña. María del Mar Masiá Canuto

Agradecimientos:

Deseo expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas las personas que hicieron posible la culminación de este trabajo. Su apoyo y contribución han sido, en todos los sentidos, absolutamente fundamentales.

Mi gratitud se dirige, en primer lugar, y no podía ser de otra manera, a mis directores, el Dr. Félix Gutiérrez y la Dra. Mar Masiá, quienes desde nuestra primera reunión lograron despertar en mí un profundo interés por la investigación. Su inteligencia, excelencia en el trabajo, espíritu crítico y, sobre todo, su inagotable paciencia han sido un constante ejemplo. La oportunidad de haber trabajado a su lado hace que todo el esfuerzo invertido haya merecido, la pena.

Un agradecimiento muy especial al Dr. Javier García Abellán, mi "Bro", por los innumerables correos, las horas de Meet (especialmente durante los fines de semana), esas vueltas y revueltas a los datos, los "latigazos" y las alegrías compartidas. Sin él, esta tesis sencillamente no habría sido posible. Es, sin duda, un gran profesional y una de esas personas que hacen la vida más fácil a quienes le rodean; deseo que podamos seguir colaborando durante muchos años.

A la Dra. Marta Gutiérrez le debo un agradecimiento particular, su incansable entusiasmo es un motor para todos, su increíble capacidad de trabajo logra que cualquier cosa que haga sea garantía de calidad. Pero, independientemente de su enorme valía profesional, es una de las mejores personas que he conocido, me siento muy afortunado de trabajar con ella.

Al Dr. Sergio Padilla, porque desde aquel primer curso de Python que recibimos en la UMH, siempre he admirado como empujado por su constante afán de aprendizaje es capaz de afrontar nuevos retos p ermanentemente.

Gracias también al Dr. Ronald Galdámez, con quien inicié el estudio del incremento de peso en personas con VIH, del cual surgieron las primeras preguntas de investigación; gran persona y grandísimo profesional.

Al Dr. Jose López Escudero, que posee el don de la cercanía; desde el primer momento que coincidimos en la sala de infecciosas me hizo sentirme en casa y no he dejado de sentirme así en ningún momento.

A todos los compañeros de Infecciosas, cuyas aportaciones en todo el proceso de investigación han sido fundamentales. Todos y cada uno de ustedes son eslabones imprescindibles en la confección de este trabajo.

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi familia, especialmente:

A Maribel, mi mujer, por todas las horas que le he "robado", por su incondicional apoyo y su infinita paciencia; nada de esto habría sido posible sin ella.

A mi hija Laura, cuyo optimismo y voluntad me han impedido siquiera plantearme tirar la toalla.

Y a mi hijo Alberto, cuya capacidad de reinvención me ha enseñado a no temer los comienzos.

A mi Padre, cuya fuerza de voluntad sobrepasa lo inimaginable; esta herencia, aunque sea de forma reducida, me ha ayudado en todas las facetas de mi vida.

Y a mi Madre, que siempre creyó en mí más que yo mismo y me enseñó que las oportunidades son efímeras y hay que aprovecharlas sin dudar. Estoy inmensamente orgulloso de ambos.

No quería terminar sin agradecer especialmente a Maribel, mi suegra. Sin su ayuda constante no hubiera sido posible dedicar el tiempo necesario a este trabajo; cada hora que he empleado ha sido posible porque ella estaba cuidando de nuestra familia en todos los aspectos. Siento que este trabajo es tan suyo como mío.

Por último, mi máximo agradecimiento a los pacientes. Su colaboración desinteresada es el principio y el final de cualquier investigación y el verdadero motivo de este trabajo.

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

Tabla de contenido

Índice de Figuras 5
Indices de Tablas 7
Tabla de Abreviaturas 8
RESUMEN 10
1.-INTRODUCCIÓN 14
1.1 Definiciones: 14
1.2 Importancia de la microbiota en la salud humana: 14
1.3 La microbiota intestinal 17
1.4 Breve historia de los estudios de la microbiota: 18
1.5 Desafíos en la aplicación de métodos estadísticos en el análisis de la microbiota: 20
1.5.1 Sobredimensión: 20
1.5.2 Variabilidad: 21
1.5.3 Tipo de datos: 22
1.5.4 Causalidad: 23
2.-JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO 24
3.-HIPÓTESIS 26
4.-OBJETIVOS 27
5.-METODOLOGÍA 28
5.1 Abordaje del objetivo general: 28
5.1.1 Primera Hipótesis: 29
5.1.2 Segunda Hipótesis 31
5.2 Abordaje del objetivo específico: 34
5.2.1 Paso 1: Análisis Descriptivo de las Variables Involucradas: 34
5.2.2 Paso 2: Análisis Longitudinal de Datos: 35
5.2.3 Paso 3: Análisis del Microbioma: 36
6.-RESULTADOS 39
6.1 Distintas firmas de la microbiota intestinal asociadas con la progresión de la aterosclerosis 39

Biblioteca UNIVERSITAS Miguel Hernández

6.1.1 Características de los pacientes 39
6.1.2 Medidas de la diversidad del microbioma intestinal y progresión del cIMT .. 42
6.1.3 Análisis de la abundancia diferencial (ANCOM-BC2) por grupo de progresión de aterosclerosis subclínica 50
6.2 Microbiota intestinal y aumento de peso en personas con VIH con inhibidores de la integrasa: un estudio longitudinal de cinco años 52
6.2.1 Diseño del Estudio, Pacientes y Procedimientos 52
6.2.2 Cambios en el peso corporal a cinco años 52
6.2.3 Microbioma intestinal y peso corporal 59
6.2.4 Composición del microbioma intestinal y regímenes de tratamiento antirretroviral 64
7.-DISCUSIÓN 67
7.1 Discusión sobre el desarrollo y aplicación del protocolo de análisis bioinformático longitudinal de la microbiota intestinal 67
7.1.1 Paso 1: Análisis Descriptivo de las Variables Involucradas: 68
7.1.2 Paso 2: Análisis Longitudinal de Datos: 68
7.1.3 Paso 3: Análisis del Microbioma: 69
7.2 Distinct gut microbiota signatures associated with progression of atherosclerosis in people living with HIV 80
7.3 Gut microbiota and weight gain in people with HIV on integrase inhibitors: a five-year longitudinal study 85
8.- CONCLUSIONES 89
9.- LIMITACIONES Y FORTALEZAS 90
9.1 Limitaciones: 90
9.2 Fortalezas: 91
10.-BIBLIOGRAFÍA 93
11.- PUBLICACIONES 110
Articulo 1 : Distinct Gut Microbiota Signatures Associated With Progression of Atherosclerosis in People Living With Human Immunodeficiency Virus. 111
Articulo 2 : Gut microbiota and weight gain in people with HIV on integrase inhibitors: a five-year longitudinal study 147

Índice de Figuras

Figura 1: Microbiota y Disbiosis.Extraida de Kaijian Hou et al.(1) 14
Figura 2: Interacciones bidireccionales del eje intestino-cerebro y los factores comunes que contibuyen a su actividad. Extraida de Kaijian Hou et al., 2022 (1) 16
Figura 3: Microbioma humano. Extraida de Cho and Blaser, 2012 (15) 17
Figura 4: Diversidad α entre los grupos de progresión del grosor íntima-media carotídeo (cIMT) emparejados con la puntuación de propensión .Extraida de Masiá M, García J et al (68)..... 42
Figura 5: Diversidad α de la microbiota intestinal a nivel de género según la progresión del grosor íntima-media carotídeo (cIMT) .Extraida de Masiá M, García J et al (68)..... 43
Figura 6: Analisis de componentes Principales distancia de Bray-Curtis .Extraida de Masiá M, García J et al (68) 44
Figura 7: Indice de divergencia entre pacientes con progresión y sin progresión de aterosclerosis subclina .Extraida de Masiá M, García J et al (68) 44
Figura 8: Abundancia relativa de los géneros más representativos.Extraida de Masiá M, García J et al (68) 49
Figura 9: Análisis de la abundancia diferencial (ANCOM-BC2) por grupo de progresión de aterosclerosis subclínica .Extraida de Masiá M, García J et al (68) 50
Figura 10: Box-plots mostrando los principales taxones identificados por ANCOM-BC2, por grupo de progresión de aterosclerosis subclínica. .Extraida de Masiá M, García J et al (68) 51
Figura 11:Evolución del índice de masa corporal a lo largo de las visitas de estudio .Extraida de García-Abellán J, García J et al (71) 57
Figura 12: Evolución de peso medio a lo largo de las visitas de estudio. .Extraida de García-Abellán J, García J et al (71) 57
Figura 13:Evolución del índice de masa corporal a lo largo de las visitas de estudio. .Extraida de García-Abellán J, García J et al (71) 58
Figura 14: Alfa Diversidad según ganancia de peso .Extraida de García-Abellán J, García J et al (71)..... 59
Figura 15: Alfa diversidad en las muestras .Extraida de García-Abellán J, García J et al (71) 60
Figura 16: Alfa diversidad en las muestras. .Extraida de García-Abellán J, García J et al (71) 60
Figura 17: Beta Diversidad entre los participantes con o sin aumento de peso significativo .Extraida de García-Abellán J, García J et al (71) 61
Figura 18: Gráficos de análisis de coordenadas principales (PCoA) basados en distancias de Jaccard .Extraida de García-Abellán J, García J et al (71) 62

Figura 19: Gráficos de análisis de coordenadas principales (PCoA) basados en distancias de Aitchison .Extraida de García-Abellán J, García J et al (71) 62
Figura 20: Taxones asociados con un aumento de peso >10% en el análisis de abundancia diferencial (ANCOM-BC2) .Extraida de García-Abellán J, García J et al (71) 63
Figura 21: Taxones asociados con un aumento de peso >5% en el análisis de abundancia diferencial (ANCOM-BC2) .Extraida de García-Abellán J, García J et al (71) 63
Figura 22: Abundancias relativas de taxones bacterianos asociados un aumento de peso significativo (>10%) según el régimen de tratamiento antirretroviral .Extraida de García-Abellán J, García J et al (71) 64
Figura 23: Abundancias relativas de taxones bacterianos asociados con un aumento de peso significativo (≥10%) en los participantes tratados con INSTI, estratificados por categoría de IMC (peso normal vs. IMC >25). .Extraida de García-Abellán J, García J et al (71) 64
Figura 24: Análisis de abundancia diferencial (ANCOM-BC2) entre NNRTI e INSTI.Extraida de García-Abellán J, García J et al (71) 65
Figura 25: Análisis de abundancia diferencial (ANCOM-BC2) entre INSTI con y sin TAF .Extraida de García-Abellán J, García J et al (71) 66

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

Indices de Tablas

Tabla 1: Diagrama de flujo del seguimiento de los participantes y toma de muestras en cada visita . Extraida de Masiá M, García J et al (68)..... 40
Tabla 2: Características de los pacientes estudiados para evaluar los perfiles de la microbiota intestinal asociados con la progresión de la aterosclerosis. Extraida de Masiá M, García J et al (68) 41
Tabla 3: Abundancias relativas a nivel de filos según el grupo de progresión del grosor íntima-media carotídeo. Extraida de Masiá M, García J et al (68) 46
Tabla 4: Phylum Todos los participantes. Extraida de Masiá M, García J et al (68) 47
Tabla 5: Phylum Participantes que muestran progresión del grosor íntima-media caroteideo. Extraida de Masiá M, García J et al (68) 47
Tabla 6: Phylum Participantes que no muestran progresión del grosor íntima-media carotídeo. Extraida de Masiá M, García J et al (68) 48
Tabla 7: Características basales de los participantes en el estudio de la relación de la microbiota con el aumento de peso corporal Extraida de García-Abellán J, García J et al (71)..... 53
Tabla 8: Evolución del peso y el IMC en los participantes en el estudio de la relación de la microbiota con el aumento de peso corporal. Extraida de García-Abellán J, García J et al (71)..... 55
Tabla 9: Evolución del peso corporal y el IMC durante el seguimiento según la composición del régimen antirretroviral. Extraida de García-Abellán J, García J et al (71)56
Tabla 10: Ventajas e inconvenientes del PERMANOVA (Confección propia)..... 73

Tabla de Abreviaturas

A continuación, se presenta una lista de abreviaturas relevantes encontradas en los documentos y sus significados, junto con las citas de las fuentes donde aparecen o se definen:

- ANCOM-BC: Análisis de Composiciones de Microbiomas con Corrección de Sesgo
- ANCOM-BC2: Análisis de Composiciones de Microbiomas con Corrección de Sesgo 2
- ANOVA: Análisis de Varianza
- ARIMA: AutoRegressive Integrated Moving Average (Modelo Autorregresivo Integrado de Media Móvil)
- ART: Tratamiento antirretroviral
- ASV: Variantes de secuencia de amplicones (También **Amplicon Sequence Variants*).*
- ASCVD Enfermedad Cardiovascular Aterosclerótica, *Atherosclerotic Cardiovascular Disease*
- BIC, bictegravir;
- CA: Análisis de Correspondencias (También *Correspondence Analysis*)
- CAB, cabotegravir
- CIBERESP: CIBER de Epidemiología y Salud Pública
- CIBERINFEC: CIBER de Enfermedades Infecciosas
- cIMT: Espesor íntima-media carotídea (También *Carotid Intima-Media Thickness*)
- CVD: Enfermedad cardiovascular
- DADA2: DADA2 (Paquete de R para análisis de secuencias)
- DOR, doravirine;
- EFV, efavirenz
- ETV, etravirine
- EVG, elvitegravir
- FISABIO: Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana
- GLM: Modelos lineales generalizados
- GLMM: Modelos lineales generalizados mixtos
- HSH: Hombres que tienen Sexo con Hombres
- HTS: Secuenciación de alto rendimiento (También *High-Throughput Sequencing*)

- IDU, intravenous drug use.
- IMC: Índice de Masa Corporal
- INSTI: Inhibidores de la transcriptasa inversa integrasa (También *Integrase Strand Transfer Inhibitors*)
- ISCIII: Instituto de Salud Carlos III
- mdFDR: Tasa de falsos descubrimientos direccionales mixtos (También *Mixed directional False Discovery Rate*)
- NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitor
- NNRTI: Inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleosídicos (También *Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors*)
- OR: Odds Ratio
- PCA: Análisis de Componentes Principales (También *Principal Component Analysis*)
- PCoA: Análisis de Coordenadas Principales (También *Principal Coordinates Analysis*)
- PCR: Proteina C reactiva
- PCVIH: Personas que viven con el VIH
- PERMANOVA: Análisis de Varianza Multivariante Permutacional (También *Permutational Multivariate Analysis of Variance*)
- Q1, Q3: Percentiles 25 y 75
- R: R (Lenguaje y entorno para computación estadística)
- RAL, raltegravir
- SAM: Análisis de significancia de microarrays (También *Significance Analysis of Microarrays*)
- SILVA: SILVA ribosomal RNA gene database
- TAF: Tenofovir alafenamida
- TAR: terapia antirretroviral combinada
- TIA: Ataque isquémico transitorio (También *Transient Ischemic Attack*)
- t-SNE: Incrustación estocástica de vecinos con distribución t . t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding
- UMH: Universidad Miguel Hernández de Elche
- VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana
- 16S rRNA: Gen 16S ribosomal RNA

RESUMEN

Antecedentes: La microbiota intestinal es fundamental para la salud humana, y su disbiosis se ha vinculado a diversas enfermedades metabólicas e inflamatorias en la población general. En personas infectadas por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) se ha observado una alteración persistente de la microbiota. Sin embargo, la relación entre esta disbiosis y las comorbilidades no infecciosas asociadas a la infección por el VIH sigue sin estar completamente esclarecida.

Objetivos: El objetivo general de este estudio fue caracterizar longitudinalmente la microbiota intestinal en PCVIH virológicamente suprimidas, evaluando su asociación con la progresión de la aterosclerosis subclínica, el cambio de peso corporal, y el tipo de tratamiento antirretroviral (TAR) recibido. Como objetivo específico, se desarrolló y aplicó un protocolo robusto de análisis bioinformático y estadístico adaptado a las preculiaridades de los datos del microbioma en estudios longitudinales.

Metodología: Se diseñó un protocolo bioinformático y estadístico integral, orientado a maximizar la validez y reproducibilidad de los análisis. Este incluyó:

Análisis descriptivo robusto: uso de medidas resistentes (medianas, percentiles) para variables continuas para minimizar el impacto de *outliers*.

Modelado longitudinal avanzado: Aplicación de modelos lineales generalizados mixtos (GLMMs) para capturar la estructura de correlación entre visitas y sujetos.

Tratamiento adecuado de datos composicionales: Implementación de transformaciones log-ratio para respetar la naturaleza relativa de los datos del microbioma.

Análisis de diversidad microbiana: Evaluación de alfa diversidad (índices de riqueza, Shannon, Simpson) y beta diversidad mediante PERMANOVA, utilizando múltiples métricas de distancia (Bray-Curtis, Jaccard, Aitchison, UniFrac), visualizadas mediante análisis de coordenadas principales (PCoA).

Abundancia diferencial: Empleo de ANCOM-BC2, una herramienta avanzada para identificar taxones diferenciales corrigiendo sesgos y manejando ceros excesivos.

Control de sesgos en estudios observacionales: Aplicación de emparejamiento por índice de propensióncon caliper, simulando condiciones cuasi-experimentales.

Resultados: Se identificaron dieferencias significativas en la composición de la microbiota intestinal asociadas con la progresión de la aterosclerosis subclínica (medida por el grosor íntima-media carotídeo, cIMT). Destacó un enriquecimiento en géneros como *Agathobacter*, *Ruminococcus 2*, *Parasutterella* y *Bilophila*, y una disminución de *Prevotella 7* en participantes con progresión del cIMT.

Se observaron asociaciones entre ciertos taxones bacterianos y el aumento de peso ≥10% en PCVIH. Los géneros *Dialister* y *Tyzzerella*_4 estuvieron enriquecidos en quienes ganaron peso significativamente, mientras que *Phascolarctobacterium* fue más abundante en quienes no presentaron un incremento relevante. En un subanálisis con umbral ≥5%, se enriqucimiento de *Lactobacillus* y reducciones en *Desulfovibrio* y *Roseburia*.

También se observaron diferencias en la microbiota en función del TAR: las pautas de TAR basadas en inhibidores de la integrasa se asociaron con mayor abundancia relativa de *Tyzzerella*_4 y *Lactobacillus* en comparación con las basadas en inhibidores de la transcriptasa reversa no nucleósidos, lo que sugiere un posible papel de la microbiota en los efectos metabólicos de estos tratamientos.

Conclusiones: La implementación de un protocolo metodológico robusto permitió identificar asociaciones consistentes entre la composición de la microbiota intestinal y determinadas comorbilidades en PCVIH. Los hallazgos sugieren que ciertos perfiles microbianos podrían contribuir a la progresión de la aterosclerosis subclínica y al aumento de peso en esta población. Además, apuntan a la posible influencia del tipo de TAR en la composición microbiana intestinal. Este estudio no solo aporta evidencia relevante sobre la interacción entre microbiota y comorbilidades en el contexto de la infección por el VIH, sino que también establece una base metodológica sólida para futuras investigaciones en este campo.

ABSTRACT:

Background:

The gut microbiota is fundamental to human health, and its dysbiosis has been linked to various metabolic and inflammatory diseases in the general population. A persistent alteration of the microbiota has been observed in people living with human immunodeficiency virus (PWH). However, the relationship between this dysbiosis and non-infectious comorbidities associated with HIV infection remains not fully clarified.

Objectives:

The general objective of this study was to longitudinally characterize the gut microbiota in virologically suppressed PWH, evaluating its association with the progression of subclinical atherosclerosis, body weight change, and the type of antiretroviral treatment (ART) received. As a specific objective, a robust bioinformatic and statistical analysis protocol was developed and applied, adapted to the peculiarities of microbiome data in longitudinal studies.

Methodology:

A comprehensive bioinformatic and statistical protocol was designed, aimed at maximizing the validity and reproducibility of the analyses. This included:

- **Robust Descriptive Analysis:** Use of resistant measures (medians, percentiles) for continuous variables to minimize the impact of outliers.
- **Advanced Longitudinal Modeling:** Application of generalized linear mixed models (GLMMs) to capture the correlation structure between visits and subjects.
- **Appropriate Treatment of Compositional Data:** Implementation of log-ratio transformations to respect the relative nature of microbiome data.
- **Microbial Diversity Analysis:** Evaluation of alpha diversity (richness, Shannon, Simpson indices) and beta diversity using PERMANOVA, utilizing multiple distance metrics (Bray-Curtis, Jaccard, Aitchison, UniFrac), visualized by Principal Coordinate Analysis (PCoA).
- **Differential Abundance:** Employment of ANCOM-BC2, an advanced tool to identify differential taxa by correcting biases and handling excessive zeros.
- **Bias Control in Observational Studies:** Application of propensity score matching with caliper, simulating quasi-experimental conditions.

Results:

Significant differences were identified in the gut microbiota composition associated with the progression of subclinical atherosclerosis (measured by carotid intima-media thickness, cIMT). There was a notable enrichment in genera such as *Agathobacter*, *Ruminococcus 2*, *Parasutterella*, and *Bilophila*, and a decrease in *Prevotella 7* in participants with cIMT progression.

Associations were observed between certain bacterial taxa and body weight gain $\geq 10\%$ in PWH. The genera *Dialister* and *Tyzzerella_4* were enriched in those who gained significant weight, while *Phascolarctobacterium* was more abundant in those who did not show a relevant increase. In a sub-analysis with a $\geq 5\%$ threshold, enrichment of *Lactobacillus* and reductions in *Desulfovibrio* and *Roseburia* were observed.

Differences in the microbiota were also observed based on the ART regimen: Integrase strand transfer inhibitor (INSTI)-based ART regimens were associated with a higher relative abundance of *Tyzzerella_4* and *Lactobacillus* compared to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI)-based regimens, suggesting a possible role of the microbiota in the metabolic effects of these treatments.

Conclusions:

The implementation of a robust methodological protocol allowed for the identification of consistent associations between the gut microbiota composition and determined comorbidities in PWH. The findings suggest that certain microbial profiles might contribute to the progression of subclinical atherosclerosis and body weight gain in this population. Furthermore, they point to the possible influence of the ART type on intestinal microbial composition. This study not only provides relevant evidence about the interaction between microbiota and comorbidities in the context of HIV infection but also establishes a solid methodological basis for future research in this field.

1.-INTRODUCCIÓN

1.1 Definiciones:

La microbiota se refiere a la comunidad de microorganismos (principalmente bacterias, pero también hongos, virus y otros microorganismos) que habitan en un entorno específico.

El microbioma, por su parte, es el conjunto de todos los genes presentes en la microbiota de un entorno determinado, es decir, es el material genético total de todos los microorganismos que conforman la microbiota.

1.2 Importancia de la microbiota en la salud humana:

La microbiota ha emergido como un componente esencial en la comprensión de la salud humana, capturando el interés de la comunidad científica y médica debido a su influencia sobre nuestra fisiología y bienestar. Aunque tradicionalmente se ha asociado principalmente con el aparato digestivo, investigaciones recientes han revelado que su impacto se extiende mucho más allá, afectando de manera significativa a diversos aspectos de la salud (Figura 1).

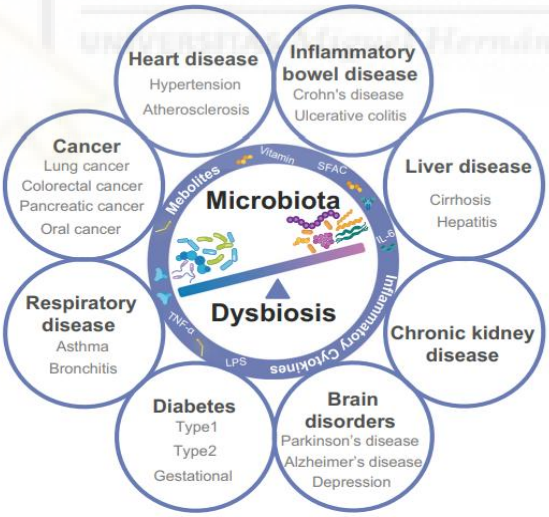


Figura 1: Microbiota y Disbiosis.Extraida de Kaijian Hou et al.(1)

Uno de los roles fundamentales de la microbiota es su interacción con el sistema inmunológico, ya que contribuye al desarrollo y mantenimiento de una respuesta inmunitaria adecuada (2,3)

Además, la microbiota juega un papel vital en la digestión de los alimentos y la absorción de nutrientes. Las bacterias intestinales descomponen compuestos complejos que el

cuerpo humano no puede procesar por sí mismo, facilitando así la obtención de nutrientes esenciales. Turnbaugh *et al.*, 2006; y Flint *et al.*, 2012. (4,5) destacan su contribución al metabolismo de carbohidratos y la producción de vitaminas.

La influencia de la microbiota también se extiende a condiciones metabólicas como la obesidad y la resistencia a la insulina. Se ha observado que una composición microbiana alterada puede favorecer el aumento de peso y el almacenamiento de grasa. Turnbaugh *et al.*, 2006 (5) describieron cómo un microbioma asociado a la obesidad tiene una mayor capacidad para extraer energía de la dieta. Por otro lado, Cani *et al.*, 2007 (6) han demostrado cómo la endotoxemia metabólica, influenciada por la microbiota, puede desencadenar obesidad y resistencia a la insulina, subrayando su impacto en el metabolismo y el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2.

La relación de la microbiota con enfermedades inflamatorias es igualmente notable. Tiene un papel importante en el desarrollo de condiciones como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. Qiu *et al.*, 2022 (7) exploraron cómo las alteraciones en la microbiota intestinal están vinculadas con la inflamación crónica en dichas patologías.

Además de su impacto directo en la salud física, la microbiota desempeña un papel crucial en el metabolismo de fármacos, hormonas y otros compuestos, lo que puede influir en la eficacia de los tratamientos médicos, tal como lo señala Hou et al. (2022)(1) en su estudio sobre microbiota y salud

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

Investigaciones recientes han comenzado a desvelar conexiones entre la microbiota intestinal y la salud mental, sugiriendo que podría influir en trastornos del estado de ánimo como la depresión y la ansiedad Dinan and Cryan, 2017(8) discutieron la importancia del eje microbiota-intestino-cerebro en la modulación de funciones del sistema nervioso central. Los datos disponibles apuntan a que un microbioma equilibrado podría ser crucial no solo para la salud física, sino también para el bienestar emocional y mental (Figura 2).

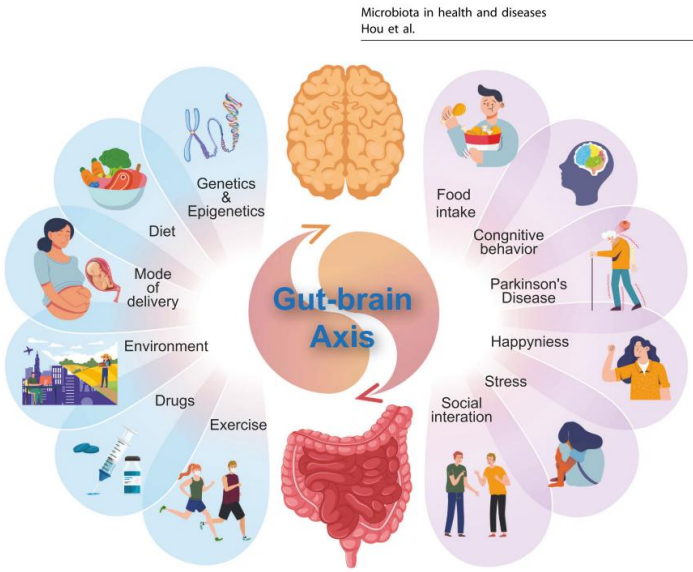


Figura 2: Interacciones bidireccionales del eje intestino-cerebro y los factores comunes que contibuyen a su actividad. Extraida de Kaijian Hou et al., 2022 ***(1)***

En resumen, la microbiota es un ecosistema extraordinariamente complejo que mantiene interacciones con una amplia variedad de aparatos y sistemas corporales. Preservar un equilibrio adecuado en nuestra microbiota podría ser esencial no solo para la prevención y tratamiento de enfermedades físicas, sino también para mejorar nuestro bienestar mental y emocional.

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

1.3 La microbiota intestinal

La microbiota intestinal constituye la mayor parte de la microbiota humana, la mayoría de las bacterias que habitan en el cuerpo se encuentran en el intestino (9–12), es por tanto el componente más abundante en el ecosistema microbiano humano (figura 3)

Esta comunidad microbiana no solo se encarga de la digestión y la absorción de nutrientes, sino que también modula el sistema inmunológico y protege contra infecciones patógenas (5). La microbiota intestinal actúa como una barrera física y metabólica, favoreciendo la homeostasis y previniendo la inflamación (13) . Alteraciones en su composición se han asociado con diversas condiciones de salud, incluyendo obesidad, diabetes tipo 2 y trastornos gastrointestinales. Por lo tanto, mantener un equilibrio en la microbiota intestinal es esencial, y se sugiere que intervenciones dietéticas y probióticas podrían ser estrategias efectivas para promover una microbiota saludable y, en consecuencia, mejorar la salud general (14).

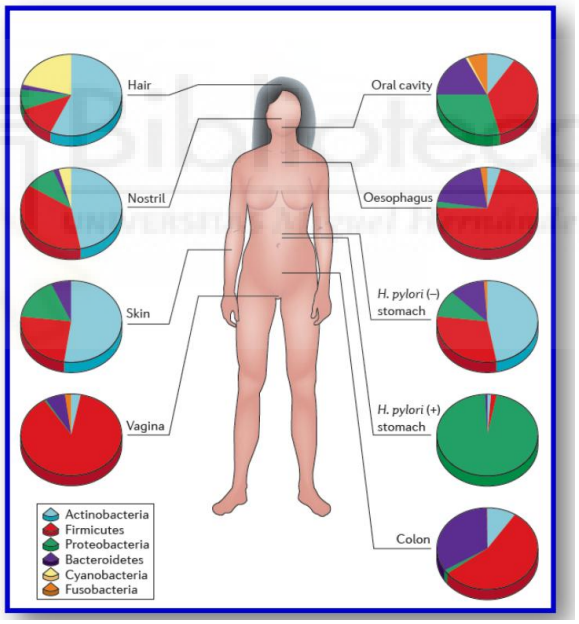


Figura 3: Microbioma humano. Extraida de Cho and Blaser, 2012 (15)

1.4 Breve historia de los estudios de la microbiota:

Siglos XVII y XVIII: Los Primeros “Avistamientos”.

- Anton van Leeuwenhoek (1632-1723): Considerado el "padre de la microbiología", fue el primero en observar y describir microorganismos utilizando microscopios rudimentarios. En 1676, describió "animálculos" en diversas muestras, incluyendo las provenientes de la boca humana. Sus observaciones sentaron las bases para futuras investigaciones.

Siglo XIX: La Era de los Patógenos.

- Louis Pasteur (1822-1895): A mediados del siglo XIX, Pasteur revolucionó la medicina al demostrar que muchos microorganismos eran los responsables de enfermedades infecciosas. Sus trabajos sobre la fermentación y la pasteurización refutaron la teoría de la generación espontánea y establecieron la microbiología como una disciplina científica.
- Robert Koch (1843-1910): Koch formuló los postulados de Koch, un conjunto de criterios para establecer una relación causal entre un microorganismo específico y una enfermedad. Sus investigaciones sobre el bacilo de la tuberculosis y el cólera contribuyeron significativamente al avance de la medicina.

Siglo XX: El Descubrimiento de los Probióticos.

- Élie Metchnikoff (1845-1916): A principios del siglo XX, Metchnikoff propuso la teoría de que la flora intestinal influía en el envejecimiento y la enfermedad. Sus estudios sobre las bacterias del ácido láctico y su posible papel en la prolongación de la vida sentaron las bases para el concepto de probióticos.
- Finales del Siglo XX y Principios del XXI: La Era del Microbioma.
- Norman R. Pace (1942-): A finales del siglo XX, Pace desarrolló técnicas de secuenciación de ARN ribosómico que permitieron estudiar comunidades microbianas sin necesidad de cultivar los microorganismos en el laboratorio. Esta revolución metodológica abrió las puertas al estudio de la microbiota humana en su conjunto.
- El Proyecto del Microbioma Humano: Lanzado en 2007, este ambicioso proyecto internacional tuvo como objetivo caracterizar la microbiota humana y su relación con la salud y la enfermedad. Los resultados obtenidos han transformado nuestra comprensión de la microbiota y su papel en diversas enfermedades.

En el ámbito de la investigación de la microbiota, la estadística se establece como un componente metodológico fundamental, proporcionando las herramientas analíticas necesarias para interpretar el considerable volumen de datos que se obtiene mediante las técnicas de secuenciación de alto rendimiento. Esta convergencia disciplinar, cimentada en

una sólida base de investigación en microbiología, ha alcanzado su máxima expresión en la época contemporánea, especialmente con el desarrollo de la microbiología molecular.

Los inicios de la microbiología, caracterizados por el desarrollo de metodologías de cultivo y aislamiento bacteriano durante el siglo XIX, facilitaron las primeras aproximaciones a la cuantificación y comparación de comunidades microbianas. Sin embargo, la introducción de la secuenciación de ácidos nucleicos transformó sustancialmente el campo, generando un cambio paradigmático en la capacidad de caracterización de la diversidad microbiana. Las tecnologías de secuenciación de nueva generación permiten obtener millones de secuencias de ADN en períodos significativamente reducidos, lo que genera conjuntos de datos de una magnitud y complejidad sin precedentes.

Frente a esta abundancia de información genómica, la implementación de métodos estadísticos avanzados se constituye como un requisito fundamental para la identificación de patrones biológicos significativos. La estadística, en este contexto, trasciende su función descriptiva para establecerse como un marco analítico robusto que permite distinguir señales biológicas intrínsecas entre el ruido inherente a los datos de secuenciación masiva. Por consiguiente, la aplicación de técnicas estadísticas avanzadas resulta esencial para extraer conocimiento biológicamente relevante y formular inferencias válidas sobre la estructura, función y dinámica de las comunidades microbianas complejas.

1.5 Desafíos en la aplicación de métodos estadísticos en el análisis de la microbiota:

Los desafíos inherentes al análisis estadístico del microbioma son extensos y multifacéticos, originándose principalmente en la naturaleza singular de los datos generados. La escasez relativa de muestras en contraposición a la elevada dimensionalidad de las variables, sumada a la presencia de múltiples factores de confusión potenciales y la dificultad intrínseca para discernir relaciones causales, configuran un panorama analítico complejo. A continuación, se examinarán las principales dificultades metodológicas y las estrategias más comunes para su resolución.

1.5.1 Sobredimensión:

En el análisis de la microbiota intestinal se presenta frecuentemente una característica distintiva: la existencia de múltiples dimensiones que se analizan con un número limitado de muestras. Esta sobredimensionalidad constituye uno de los desafíos fundamentales en este campo de estudio. Ante esta complejidad, resulta indispensable aplicar técnicas de reducción dimensional para optimizar la interpretación y el análisis de datos. Dichas técnicas permiten simplificar la estructura compleja de la información, mientras se preservan los componentes relevantes y se facilita la identificación de patrones significativos. Entre las metodologías más empleadas se encuentran:

- El Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés)(16): Es una técnica estadística utilizada para la reducción de dimensionalidad en conjuntos de datos multivariantes. Su objetivo principal es transformar un gran número de variables correlacionadas en un menor número de variables no correlacionadas, denominadas componentes principales. Estos componentes se ordenan de tal manera que el primero captura la mayor parte de la variabilidad presente en los datos, seguido por el segundo, y así sucesivamente.
- El Análisis de Correspondencias (CA , por sus siglas en inglés) (17) es una técnica estadística utilizada para explorar y visualizar las relaciones entre dos o más variables categóricas. Su objetivo es representar gráficamente la asociación y la estructura de los datos en un espacio de menor dimensión. A través del CA, se pueden identificar patrones y asociaciones en tablas de contingencia, permitiendo observar cómo se relacionan las categorías entre sí. Esta técnica transforma las frecuencias observadas en coordenadas que se pueden graficar, facilitando la interpretación de las relaciones entre las categorías,es especialmente útil en estudios de microbiota intestinal, donde las interacciones entre diferentes especies bacterianas pueden ser exploradas y visualizadas de manera efectiva. Al representar visualmente estas relaciones, el CA permite una comprensión más profunda de la estructura subyacente de los datos categóricos.

- Incrustación estocástica de vecinos con distribución t o t-*SNE (t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding):* El t-SNE (18) es una técnica de reducción de dimensionalidad que se utiliza principalmente para la visualización de datos de alta dimensión. Esta metodología se basa en la idea de que se pueden representar datos complejos en un espacio de menor dimensión, preservando las relaciones de proximidad entre los puntos de datos. A diferencia de otras técnicas, como el PCA, que se centran en la varianza global de los datos, el t-SNE se enfoca en mantener la estructura local, lo que permite que puntos similares en el espacio original permanezcan cercanos en el espacio reducido. El t-SNE transforma las distancias en probabilidades, utilizando una distribución t de *Student* para modelar la similitud entre puntos. Esto ayuda a destacar las estructuras locales y a revelar patrones complejos en los datos, lo que lo hace especialmente útil en campos como la biología, el análisis de la microbiota intestinal y el aprendizaje automático. Gracias a su capacidad para generar visualizaciones intuitivas y significativas, el t-SNE se ha convertido en una herramienta popular para explorar y comprender conjuntos de datos de alta dimensión.

Estas técnicas no son excluyentes; lo habitual es utilizar varias de ellas de forma simultánea, especialmente en un primer análisis exploratorio.

1.5.2 Variabilidad:

Este tipo de datos presenta una alta variabilidad debido a la diversidad interindividual en la composición de la microbiota(11,12) atribuibles a factores como la genética del huésped, la dieta y el estilo de vida (11,19); incluso cambios en la dieta a corto plazo pueden producir variabilidad, lo que resalta la plasticidad y la dinámica de esta comunidad microbiana.

Es por lo tanto un gran desafío analítico que exige una identificación y evaluación exhaustivas de sus fuentes para la obtención de estimaciones e inferencias robustas y precisas. Dentro de este contexto, se distinguen principalmente la variación intraindividual, referida a las fluctuaciones temporales dentro de un mismo sujeto influenciadas por factores dietéticos, ambientales o fisiológicos; la variación interindividual, que alude a las diferencias en las mediciones entre distintos individuos, tanto en un momento dado como a lo largo del tiempo, crucial para comprender la diversidad composicional y funcional de la microbiota; y la variación temporal, que engloba los cambios que se suceden a lo largo del tiempo, ya sean de naturaleza estacional, cíclica o de largo plazo. La adecuada consideración de estas distintas fuentes de variabilidad resulta esencial para garantizar la validez y la solidez de los hallazgos derivados del análisis de la microbiota intestinal. En este sentido, las metodologías estadísticas tradicionales como el Análisis de Varianza (ANOVA), en su formulación clásica, resultan inadecuadas para abordar la complejidad inherente a la

estructura de estos datos. Se requiere, por consiguiente, la implementación de modificaciones y extensiones de estos métodos (20–24) que permitan modelar y tener en cuenta las correlaciones y dependencias que surgen de las mediciones repetidas en el tiempo y de las diferencias entre individuos.

Adicionalmente, se debe enfatizar la necesidad de un conocimiento exhaustivo y preciso de la estructura particular de los datos de la microbiota intestinal, una exigencia que adquiere una relevancia significativamente mayor en comparación con otros tipos de estudios (25).

1.5.3 Tipo de datos:

La abundancia de variables en los estudios del microbioma es un fenómeno complejo que varía de un individuo a otro, lo cual plantea desafíos significativos en el análisis de datos. Esta variabilidad sugiere que cada persona tiene un perfil microbiológico único, lo que complica la tarea de obtener conclusiones generalizables utilizando métodos estadísticos tradicionales.

Debido a esta variabilidad, es crucial utilizar formatos de datos composicionales (25–28). Los datos composicionales son aquellos que se expresan en términos de proporciones relativas en lugar de valores absolutos. Este enfoque es esencial porque el microbioma está compuesto por una multitud de especies microbianas cuya abundancia relativa, más que su cantidad absoluta, determina su función y su impacto en la salud. Aitchison(25) fue pionero en el análisis estadístico de datos composicionales, sentando las bases para los métodos modernos, mientras que Gloor *et al.*, 2017 (26)destacaron la importancia del análisis composicional en los datos del microbioma.

Ignorar la naturaleza composicional de estos datos puede llevar a interpretaciones erróneas (26)Por ejemplo, un aumento en la cantidad absoluta de una especie microbiana no necesariamente indica un cambio positivo o negativo en la composición general del microbioma. Sin un análisis composicional, los resultados pueden estar sesgados porque las variaciones en la abundancia total podrían no reflejar cambios significativos en la composición real del microbioma. Gloor *et al*. (26)enfatizan que los conjuntos de datos del microbioma son intrínsecamente composicionales, y no abordar esta característica puede llevar a conclusiones incorrectas.

El uso de métodos estadísticos tradicionales que no están diseñados para datos composicionales puede introducir variabilidad artificial en los análisis. Esto podría llevar a la identificación de patrones espurios o a la falta de detección de patrones importantes, lo que a su vez resultaría en conclusiones incorrectas.

Por estas razones, es necesario adoptar técnicas estadísticas más avanzadas y realizar transformaciones en los datos que tengan en cuenta la naturaleza composicional de los mismos. Las transformaciones isométricas log ratio, como las propuestas por Egozcue *et al.*,

2003 (27), son una de las metodologías desarrolladas para manejar estas complejidades. Además, Martín-Fernández, Barceló-Vidal y Pawlowsky-Glahn, 2003 (29) abordaron cómo tratar ceros y valores faltantes en conjuntos de datos composicionales. Al implementar esta técnica se obtiene una comprensión más precisa y significativa del papel que juega el microbioma en la salud y la enfermedad humanas.

1.5.4 Causalidad:

La causalidad es la relación fundamental entre dos eventos, en la que uno (la causa) produce o contribuye a la ocurrencia del otro (el efecto). Esta relación implica:

- Temporalidad: La causa debe preceder al efecto en el tiempo.
- Conexión: Debe existir una conexión lógica o empírica entre la causa y el efecto.
- No aleatoriedad: La relación no debe ser el resultado de coincidencias o correlaciones espurias.

Establecer la causalidad en los estudios de microbiota es un desafío por diversos motivos, como la naturaleza compleja y dinámica de la relación huésped-microbiota, la influencia de múltiples factores en la composición de la microbiota, así como la complejidad de las interacciones microbianas, y las propias limitaciones de los estudios. En el informe técnico de Pearl, 2009 (30) se discute el tratamiento estadístico de la inferencia causal, mientras que otros estudios como el de Serrano-Villar *et al.*, 2019a (31) y Rocafort *et al.*, 2019 (32). exploran la evolución del microbioma en contextos específicos como la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Como aproximación metodológica a esta causalidad pueden emplearse diversos diseños experimentales y técnicas estadísticas, entre los que destacan los ensayos controlados aleatorizados y los modelos estadísticos avanzados. Estos incluyen Modelos de Regresión, Modelos de Ecuaciones Estructurales (SEM), ANOVA, Modelos de Propensión *(Propensity Score Matching*), Redes Bayesianas, Análisis de Series Temporales (Modelos ARIMA), estimadores robustos e incluso Grafos Causales. Estos últimos representan visualmente las relaciones causales entre variables, permitiendo identificar caminos de causalidad y controlar variables de confusión.

2.-JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La relación entre el VIH y la composición de la microbiota intestinal constituye un área de estudio poco explorada. Se ha reconocido el papel fundamental de la microbiota intestinal en el mantenimiento de la salud general del organismo, pero su interacción específica con el VIH no ha sido objeto de investigaciones exhaustivas. Estudios como el de Nowak *et al.*, 2015 (33) sugirieron una asociación entre una menor diversidad de la microbiota intestinal y un peor estado inmunológico en individuos con VIH, subrayando la potencial influencia del microbioma en la evolución de la infección. Más recientemente, Borgognone *et al.*, 2022 (34) identificaron firmas específicas en la microbiota intestinal vinculadas al tamaño del reservorio viral y al control de la viremia, lo que apunta a un posible papel del microbioma en la respuesta al tratamiento antirretroviral (TAR) y la persistencia viral. Además, la investigación de Serrano-Villar *et al.*, 2016 (35) mostró que la infección por el VIH induce alteraciones metabólicas en la microbiota intestinal que son distintas a las observadas en otras enfermedades, lo que refuerza la idea de que el VIH tiene un impacto único en esta comunidad microbiana. En consecuencia, se necesita llevar a cabo investigaciones adicionales que profundicen en esta conexión. Para ello es esencial desarrollar un protocolo de análisis estadístico que permita evaluar con precisión la composición y diversidad del microbioma intestinal en PCVIH.

Dentro del diseño de este protocolo, y dado el carácter dinámico y variable de los ecosistemas microbianos en el intestino humano, es esencial incluir métodos longitudinales. A diferencia de los estudios transversales (36), que proporcionan una instantánea de la composición microbiana en un momento específico, la investigación longitudinal (37) permite observar cómo la microbiota evoluciona en respuesta a factores cambiantes como la dieta, el uso de antibióticos o las alteraciones en la salud del huésped. Este enfoque es crucial para identificar patrones de estabilidad e inestabilidad en la microbiota y para comprender cómo sus cambios se relacionan con enfermedades específicas, como la aterosclerosis o el incremento de peso. Además, estos estudios pueden ayudar a establecer relaciones causales al correlacionar las variaciones en la microbiota con eventos clínicos, lo que podría abrir nuevas vías para intervenciones terapéuticas basadas en la modulación de la microbiota(38).

Con la terapia antirretroviral, la esperanza de vida para las PCVIH ha experimentado una mejora notable. Sin embargo, a pesar de los avances logrados, aún no alcanza los niveles de la población general (39). Una de las principales razones de esta brecha persistente es la elevada carga de comorbilidades que afecta a las PCVIH, incluso en aquellos con supresión virológica mantenida (40)

Entre estas comorbilidades, las enfermedades cardiovasculares y metabólicas han adquirido un protagonismo creciente como causas principales de morbilidad y mortalidad en esta población (40,41). Diversos estudios han demostrado que el riesgo de infarto de miocardio y enfermedad cerebrovascular es al menos el doble en comparación con personas seronegativas (42). Este aumento se explica por una compleja interacción entre factores tradicionales de riesgo cardiovascular, los efectos adversos de algunos fármacos antirretrovirales y mecanismos patogénicos propios del VIH, como la inflamación crónica sistémica.(43,44)

La inflamación persistente, incluso en personas en tratamiento antirretroviral, se traduce en niveles elevados de marcadores como la proteína C reactiva (PCR) y el dímero D, los cuales se asocian de forma robusta con eventos cardiovasculares (45–47) En paralelo, la aterosclerosis presenta características distintivas en las PCVIH, con un riesgo relativo de enfermedad coronaria que ha aumentado significativamente en las últimas décadas. No obstante, los mecanismos específicos detrás de esta aterogénesis acelerada permanecen en gran medida desconocidos

Recientemente, ha cobrado interés el papel potencial de la microbiota intestinal en la fisiopatología de estas comorbilidades. Se ha sugerido que la disbiosis intestinal, frecuentemente observada en PCVIH, podría contribuir tanto al estado inflamatorio crónico como a las alteraciones metabólicas (48,49) lo cuál resulta particularmente relevante en el contexto de la creciente prevalencia de obesidad y diabetes tipo 2 en esta población, tendencia que refleja lo observado en la población general (50,51) .

En esta investigación se analizará el papel emergente de la microbiota intestinal en el desarrollo de la aterosclerosis y la ganancia de peso en PCVIH, explorando su posible contribución como mediador clave entre la infección crónica, la inflamación y el metabolismo.

El protocolo propuesto tiene como objetivo generar un marco de referencia para futuros análisis de datos del microbioma, contribuyendo así al entendimiento de cómo la microbiota influye en la salud de las PCVIH. Se espera que facilite el análisis y la interpretación de los resultados para los investigadores, proporcionando un marco de actuación homogéneo.

3.-HIPÓTESIS

Proponemos dos hipótesis principales en relación con la microbiota intestinal en pacientes con VIH:

1. La composición de la microbiota intestinal puede influir en la progresión de la aterosclerosis en PCVIH.
2. El aumento de peso PCVIH podría estar relacionado con la composición de la microbiota, así como con el tratamiento antirretroviral.

En la evaluación de estas hipótesis, se aplicará un protocolo exhaustivo para estudiar longitudinalmente la composición y diversidad de la microbiota intestinal, empleando técnicas específicas para la investigación del microbioma

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

4.-OBJETIVOS

Objetivo general:

Estudiar la composición de la microbiota intestinal en personas con VIH estables y los posibles efectos de las variaciones de la misma sobre la progresión de la aterosclerosis y el cambio de peso corporal, asi como su asociación con el tipo de tratamiento antirretroviral.

Objetivo específico:

Desarrollar un protocolo de análisis que permita estudiar la composición de la microbiota intestinal en personas con VIH estables y los posibles efectos de las variaciones de la misma.

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

5.-METODOLOGÍA

5.1 Abordaje del objetivo general:

En esta sección, se presentará una descripción detallada de la metodología empleada, centrando la atención en el cumplimiento de los objetivos planteados de manera individual. Se proporcionará un análisis exhaustivo de las estrategias metodológicas utilizadas tanto para el objetivo general como para el objetivo específico, haciendo hincapié en la interrelación entre ambos.

El objetivo general del estudio es analizar la composición de la microbiota intestinal en personas con VIH estables y evaluar los posibles efectos de sus variaciones sobre la progresión de la aterosclerosis , el cambio de peso, y su asociación con el tipo de tratamiento antirretroviral recibido. Este objetivo se apoya en dos hipótesis centrales: en primer lugar, se plantea que la composición de la microbiota intestinal puede tener una influencia significativa en la progresión de la aterosclerosis en personas con VIH. En segundo lugar, se sugiere que el aumento de peso observado en personas con VIH podría estar relacionado tanto con la composición de la microbiota como con la administración de tratamientos antirretrovirales. La validez de ambas hipótesis ha sido corroborada mediante la publicación de artículos científicos revisados por pares, lo cual aporta una sólida base de evidencia empírica al estudio.

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

5.1.1 Primera Hipótesis:

Revisión de la Literatura:

Se realizaron búsquedas en PubMed y Web of Science hasta septiembre de 2023, utilizando los términos de búsqueda "(microbiota OR microbiome) AND HIV AND (cardiovascular disease OR cardiovascular events OR atherosclerosis OR atherogenesis OR atherosclerosis progression OR carotid intima-media thickness OR carotid plaque)" sin restricciones de idioma o tipo de artículo. También revisamos listas de referencias de informes seleccionados. Sólo unos pocos estudios transversales han investigado la relación entre el microbioma intestinal y las complicaciones cardiovasculares en PCVIH, pero no se han identificado patrones consistentes. El diseño transversal impide el análisis de la relación temporal entre la microbiota y el riesgo cardiovascular posterior, incluido el perfil de la microbiota que precede a la aparición de eventos. Además, la microbiota intestinal constituye una comunidad dinámica de microorganismos que experimenta cambios intra e interindividuales en su composición a lo largo del tiempo.

Recolección de Datos:

Para obtener los datos, hemos realizado un estudio de cohortes longitudinal de 96 semanas en el Hospital General Universitario de Elche, España. El estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital General Universitario de Elche y todos los participantes firmaron un consentimiento informado. Se administró un cuestionario en la visita inicial que incluía la actividad física y los hábitos dietéticos detallados. Se instruyó a los participantes sobre la conveniencia de conservar información sobre el consumo de antibióticos.
Al inicio del estudio y a las 48 y 96 semanas se realizó examen físico y medidas antropométricas, incluidos niveles de presión arterial, peso, altura, índice de masa corporal y perímetro cintura-cadera, junto con mediciones del espesor íntima-media de las arterias carotídeas (cIMT) como marcador de aterosclerosis. Se obtuvieron también muestras de sangre para mediciones bioquímicas, metabólicas y virológicas. Las muestras fecales se recolectaron utilizando un kit de auto-recogida domiciliaria y las muestras se almacenaron en un refrigerador hasta que las trajeron a sus visitas. Se instruyó a los pacientes para que no recogieran muestra de heces si habían usado antibióticos dentro de los 90 días anteriores a la fecha de recogida.

Sujetos y Ámbito del Estudio:

Los pacientes se reclutaron entre el 26 de octubre de 2017 y el 18 de febrero de 2019, y se les finalizó el seguimiento el 12 de enero de 2022.

Criterios de Inclusión:

- Adultos (>18 años) con infección por VIH que recibían regímenes antirretrovirales basados en inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos (ITINN) o inhibidores de la integrasa (INSTI), con carga viral plasmática indetectable durante los últimos 6 meses (niveles de ARN <50 copias/mL).

Criterios de Exclusión:

- Se excluyeron los participantes con enfermedad cardiovascular conocida, exposición a inhibidores de proteasa, mujeres embarazadas o mujeres con intención de quedar embarazadas durante el estudio.

Variables:

- Datos demográficos
- Parámetros relacionados con la infección por el VIH
- Tratamiento antirretroviral y medidas antropométricas
- Mediciones del cIMT
- Puntuación de riesgo de Framingham
- Puntuación de riesgo ASCVD (52)
- Muestras de sangre y heces para estudiar la microbiota intestinal
- Datos bioquímicos y hematológicos de rutina
- Biomarcadores inflamatorios y protrombóticos

Procedimientos de Recolección de Datos:

- **Periodo de Reclutamiento:** Se realizó durante los 3 primeros meses del estudio.
- **Evaluaciones Clínicas y Recolección de Muestras:** Todos los pacientes interesados en participar en el estudio firmaron el consentimiento informado y en las visitas se recogieron datos demográficos, parámetros relacionados con la infección por el VIH y el tratamiento antirretroviral y medidas antropométricas, y se realizaron mediciones del cIMT. Además, se extrajeron muestras de sangre y heces para estudiar la microbiota intestinal, parámetros bioquímicos y hematológicos, y biomarcadores inflamatorios y protrombóticos. Se congelaron alícuotas de plasma para determinar biomarcadores adicionales en el futuro.
- **Análisis de las Secuencias:** Las lecturas del gen 16S rRNA con una puntuación de baja calidad y una longitud de lectura corta, así como posibles quimeras, se eliminaron utilizando las herramientas DADA2 (53) implementadas en el paquete R para analizar datos de secuenciación de amplicones Illumina de alta resolución. Además, las lecturas se alinearon con el genoma humano (GRCh38.p13) usando Bowtie2 y se descartaron las coincidencias. La herramienta DADA2 también se utilizó para crear las variantes de secuencia de amplicones (ASV). La información taxonómica de los ASV se obtuvo mediante comparación de similitud utilizando el algoritmo BLAST contra la base de datos SILVA (v.138) (54)

Análisis del Microbioma

Aplicación del Protocolo General de Análisis desarrollado en el objetivo específico.

5.1.2 Segunda Hipótesis

Revisión de la Literatura:

Existe limitada información sobre la relación entre la microbiota, el VIH y el aumento de peso corporal. Se destaca la necesidad de investigar esta conexión debido al conocimiento actual sobre el papel de la microbiota intestinal en la ganancia de peso y la posible influencia del tratamiento antirretroviral en esta comunidad microbiana.

Sujetos y Ámbito del Estudio:

Este fue un estudio de cohortes longitudinal prospectivo de 5 años. Se llevó a cabo en el Hospital General Universitario de Elche, España. Se incluyeron participantes adultos (>18 años) con infección por VIH. Los participantes debían estar recibiendo regímenes antirretrovirales (TAR) basados en inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos (ITINN) o inhibidores de la integrasa (INSTI). Era requisito que tuvieran una carga viral plasmática indetectable durante los últimos 6 meses (niveles de ARN del VIH-1 <50 copias/mL).

Se administró un cuestionario en la visita inicial para obtener información sobre actividad física y hábitos dietéticos detallados, así como datos sobre el uso de antibióticos, consumo de probióticos y problemas digestivos.

En las visitas inicial, a las 48, 96, 144, 192 y 240 semanas, se registraron los resultados de los exámenes físicos y medidas antropométricas.

Se obtuvieron muestras de sangre en estas visitas.

No se recogieron muestras fecales si los pacientes habían usado antibióticos dentro de los 90 días previos.

Los participantes fueron incluidos entre octubre de 2017 y febrero de 2019 y seguidos hasta septiembre de 2024.

Criterios de Inclusión:

- Adultos (>18 años) con infección por VIH.
- Recibir regímenes TAR basados en ITINN o INSTI.
- Carga viral plasmática indetectable (<50 copias/mL) durante los 6 meses previos.

Criterios de Exclusión:

- Presencia conocida de enfermedad cardiovascular.
- Embarazo.
- Tratamiento antirretroviral con regímenes TAR basados en inhibidores de proteasa (excluidos para minimizar el riesgo de confusión, dada la vinculación de estos fármacos con eventos metabólicos y cardiovasculares).

Variables: Las variables recopiladas incluyeron:

- Exámenes físicos.
- Medidas antropométricas.
- Muestras de sangre.
- Información de cuestionarios (actividad física, dieta, uso de antibióticos/probióticos, problemas digestivos).
- Muestras fecales.
- Mediciones de Peso:
    - Se utilizó la misma balanza calibrada en todas las visitas.
    - Las mediciones se realizaron sin prendas exteriores.
- Se definió el aumento de peso significativo como un incremento de peso de ≥10% entre dos mediciones consecutivas o un aumento de peso de ≥10% en comparación con el peso corporal inicial. Este umbral de aumento de peso se basó en recomendaciones cardiometabólicas (55,56). Se realizó un subanálisis menos estricto utilizando un umbral de ≥5% de aumento de peso.

Recolección de Muestras Fecales y Extracción de ADN:

- Las muestras fecales fueron recogidas por los pacientes en casa.
- Se utilizaron kits de auto-recogida domiciliaria y se siguieron instrucciones predefinidas.
- El ARN de las muestras se preservó en el medio *RNAlater®* . Se instruyó a los pacientes para llenar el tubo hasta un nivel indicado y mezclar con el líquido.
- Las muestras debían almacenarse en un refrigerador a 4°C hasta la entrega.
- La preservación a 4°C y posterior almacenamiento a -80°C dentro de un máximo de 24 horas fue crítica para evitar alteraciones en la composición de las muestras. Se desaconsejó la congelación a -20°C.
- El ADN total se extrajo de las muestras fecales mediante un sistema de extracción automática *MagNA PURE LC System (Roche).*
- El ADN se cuantificó con el kit *Qubit dsDNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific).*

Análisis de las Secuencias:

- Se llevó a cabo la amplificación y secuenciación de la región hipervariable V3–V4 del gen 16S ribosomal RNA.
- Se siguió el protocolo de Illumina.
- La secuenciación se realizó con la plataforma Illumina MiSeq (MiSeq Reagent kit v3, 2 x 300 cycles) en el Área de Genómica y Salud de FISABIO-Salud Pública.
- Se generó un promedio de 91.602 lecturas por muestra.
- Las lecturas del gen 16S rRNA con puntuación de baja calidad, longitud de lectura corta y posibles quimeras se eliminaron utilizando la canalización DADA2 (57)en el paquete R (58).
- Las lecturas se alinearon al genoma humano (GRCh38.p13) utilizando Bowtie2 y se descartaron las coincidencias.
- La herramienta DADA2 (57) también se utilizó para crear las variantes de secuencia de amplicones (ASV).
- La información taxonómica de los ASV se obtuvo mediante comparación de similitud utilizando el algoritmo BLAST y la base de datos SILVA (v.138) (54). Se usó MegaBLAST para asignación a nivel de especie si solo se identificaba el género.

Análisis del Microbioma

- Aplicación del Protocolo General de Análisis desarrollado en el objetivo específico

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

5.2 Abordaje del objetivo específico:

Desarrollar un protocolo de análisis que permita estudiar la composición de la microbiota intestinal en personas con VIH estables y los posibles efectos de las variaciones de la misma.

El objetivo específico del estudio se centra en desarrollar un protocolo de análisis que permita examinar de manera detallada la composición de la microbiota intestinal en personas con VIH estables, así como los posibles efectos de sus variaciones.

Este objetivo específico es fundamentalmente complementario al objetivo general, ya que el protocolo desarrollado ha sido una herramienta esencial para avanzar en la consecución del objetivo general. El protocolo proporciona un marco metodológico riguroso y sistemático que ha permitido abordar con eficacia las preguntas de investigación planteadas, asegurando así la integración coherente de los hallazgos en el ámbito de estudio.

Por lo tanto, este objetivo específico está estrechamente relacionado con el general, ya que el protocolo desarrollado ha sido utilizado para alcanzar el objetivo general, proporcionando el marco metodológico necesario para el estudio.

Para el cumplimiento de este objetivo, se desarrolló una serie de pasos que permitió realizar un análisis robusto, el cual sirvió para contestar las preguntas planteadas en el primer objetivo.

5.2.1 Paso 1: Análisis Descriptivo de las Variables Involucradas:

Este paso es básico e imprescindible en cualquier tipo de análisis estadistico es la piedra sobre la que comenzamos a cimentar. Las peculiaridades que vamos a aplicar en este protocolo son:

- Las variables continuas se expresarón como medianas ± percentiles 25 y 75 (Q1, Q3), proporcionando una mayor robustez al estudio, al relajar la normalidad de las variables y reducir la influencia de posibles *outliers* algo habitual en los estudios de microbiota.
- Las variables categóricas se expresarón como porcentajes.
- Se utilizo la prueba t de Wilcoxon o de Student para comparar variables continuas cuando se pudo aceptar la normalidad, y la prueba de chi-cuadrado o exacta de Fisher para las comparaciones categóricas.

5.2.2 Paso 2: Análisis Longitudinal de Datos:

Uno de los requisitos deseables en cualquier estudio de microbiota es disponer de datos longitudinales, pues permite la posibilidad del seguimiento temporal y también el control de la variabilidad al tener muestras repetidas de los mismos individuos. En nuestro caso es así.

El carácter de los datos es longitudinal, tenemos las variables medidas en distintos periodos de tiempo, a los que denominamos "visitas", por lo que es necesario repetir el análisis en cada una de las visitas durante el periodo de estudio e identificar de forma clara el diagrama de flujo de los pacientes.

Se debe comprobar si el comportamiento de la variable dependiente es constante a lo largo de la muestra, pues cambios en la misma durante el periodo de seguimiento que no se puedan relacionar con ninguna variable dependiente nos indicaria una tendencia temporal. Para este tipo de análisis, utilizamos modelos lineales generalizados (GLMs)(59) y modelos lineales generalizados mixtos (GLMMs) (60), herramientas fundamentales que permiten abordar la naturaleza estructurada y correlacionada de estos datos. Los (GLMs)(59) posibilitan el modelado de relaciones entre variables dependientes y una o más variables independientes, ampliando el enfoque a diversas distribuciones de la variable de respuesta. No obstante, en presencia de datos con múltiples niveles de variabilidad, como sucede en estudios longitudinales con mediciones repetidas, se optará por los GLMMs (60)Estos modelos integran efectos aleatorios que captan la variabilidad intra-sujeto, optimizando la precisión e inferencia del modelo al considerar la correlación y heterogeneidad presentes en los datos.

Los efectos aleatorios se analizaron de dos formas:

1. Se consideró el paciente como efecto aleatorio lo que permitió modelar la variabilidad interindividual. Este enfoque asume que cada paciente presenta un intercepto (y/o pendiente) propio que puede diferir entre individuos. De esta forma, se incorpora la heterogeneidad entre pacientes, aspecto crucial cuando se prevén respuestas diferenciales a las variables independientes.
2. Se incorporó la visita como efecto aleatorio de esta forma se pudo modelar la variabilidad entre las distintas visitas. Este planteamiento asume que las mediciones pueden fluctuar entre visitas. Resulta particularmente útil cuando se anticipan cambios en las condiciones entre visitas, como efectos temporales, terapéuticos o factores externos.

La selección del modelo más apropiado requiere una comprensión precisa de los objetivos de investigación. No obstante, se valoró la posibilidad de incorporar ambos efectos en el modelo.

5.2.3 Paso 3: Análisis del Microbioma:

Paso 3.1 Descriptivos:

- Realizamos el recuento de las muestras disponibles en cada una de las visitas.
- Para calcular la abundancia de cada bacteria, estimamos tanto la abundancia media como la prevalencia utilizando la función *taxa_sums()* del paquete phyloseq en R (61)
- Reconocimos la relevancia de que los conjuntos de datos del microbioma generados mediante secuenciación de alto rendimiento (HTS) son intrínsecamente composicionales(26). Estos datos, obtenidos a través de la secuenciación de amplificadores del gen 16S rRNA, metagenomas o metatranscriptomas, poseen un total arbitrario determinado por el instrumento de secuenciación, lo cual les confiere su naturaleza composicional. Ignorar esta característica composicional, como sucede frecuentemente con métodos tradicionales, puede conducir a resultados engañosos e impredecibles
- Para la representación gráfica de las bacterias identificadas, se utilizaron diagramas de barras. La representación se limitó a las Secuencias de Variantes Amplicónicas (ASVs) más frecuentes, generalmente entre 30 y 50, con el fin de evitar que un número excesivo de ASVs comprometiera la función descriptiva de los gráficos. Se empleó el comando plot_bar de la librería Phyloseq(59), reconocida por su versatilidad y calidad gráfica. Estos gráficos se generaron de manera repetida para cada nivel taxonómico.

    1. **Phylum (Filo)**: Agrupa organismos que comparten un conjunto de características comunes.
    2. **Clase**: Subdivisión dentro de un phylum.
    3. **Orden**: Subdivisión dentro de una clase.
    4. **Familia**: Subdivisión dentro de un orden.
    5. **Género**: Subdivisión dentro de una familia.
    6. **Especie**: El nivel más específico de clasificación.

Paso 3.2 Análisis de la Beta Diversidad:

La beta diversidad representa la variación en la composición de especies entre distintas comunidades o muestras. Para su cálculo, se empleó la prueba PERMANOVA (20) implementada en el paquete vegan (62) de R.

Paso 3.3 Análisis de la Alfa Diversidad:

La alfa diversidad es una medida que evalúa la diversidad microbiana dentro de un único entorno o muestra. Esta diversidad puede ser cuantificada utilizando varios índices, se calcularon los más relevantes que son:

1. **Riqueza de especies:** Este índice simplemente contabiliza el número total de especies presentes en una muestra, proporcionando una medida básica de la diversidad.
2. **Índice de Shannon:** Este índice mide la diversidad considerando tanto la riqueza de especies como la equidad en la distribución de sus abundancias. Es una medida que otorga mayor peso a la rareza de las especies (63).
3. **Índice de Simpson:** Similar al Índice de Shannon, este índice también considera la abundancia y equidad de las especies, pero es menos sensible a las especies raras y más influenciado por las más dominantes (64).

Se calcularon estos índices de alfa diversidad para cada muestra y para cada categoría de la variable dependiente dentro del estudio. Una vez completada esta etapa de cálculo, se visualizaron los resultados mediante gráficos tipo box-plot, dado que estos gráficos facilitan la interpretación y comprensión de la distribución de los datos de manera clara y concisa. Además, es crucial evaluar si existen diferencias significativas entre las distintas categorías mediante el uso de pruebas de permutación. Para la ejecución de estos análisis, se dispone de múltiples librerías en R que permiten realizar los cálculos de manera eficiente y sencilla. Se optó por el comando plot_richness de la librería Phyloseq (65) el cuál no solo efectúa el cálculo de los índices de diversidad, sino que también permite la representación gráfica de los resultados de manera integrada.

Paso 3.4 Análisis de la Microbiota para Detectar Cambios Significativos en la Abundancia Relativa de Taxones Microbianos:

Para la detección de cambios en la abundancia relativa de la microbiota, se empleó la técnica de Análisis de Composiciones de Microbiomas con Corrección de Sesgo 2 (ANCOM-BC2) (66). Esta versión ampliada y perfeccionada mejora la metodología del Análisis de Composiciones de Microbiomas con Corrección de Sesgo (ANCOM-BC) previamente publicada por Lin y Peddada en 2020 (67). La técnica ANCOM-BC2 (66) ofrece una aproximación más precisa y robusta para el análisis de datos microbiológicos, permitiendo corregir sesgos de manera efectiva.

Paso 3.5 Ajuste del Cálculo Mediante Técnicas de Emparejamiento:

En este estudio, utilizamos la técnica de emparejamiento por puntuación del índice de propensión (propensity score) para controlar sesgos en estudios observacionales no aleatorizados, donde la asignación a tratamientos no es al azar. Nos centramos en variables como el índice de masa corporal (IMC), edad, sexo, tratamiento, modo de transmisión (especialmente en hombres que tienen sexo con hombres, HSH), dieta y el uso de tenofovir alafenamida (TAF). A través de este método, podemos evaluar si la alfa diversidad es similar o no, independientemente de estas variables.

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

6.-RESULTADOS

La aplicación del protocolo de análisis bioinformático y estadístico desarrollado, tal como se detalla en la sección 5.-METODOLOGÍA, ha permitido el estudio exhaustivo de la composición longitudinal de la microbiota intestinal en la cohorte de pacientes con VIH virológicamente suprimidos. Los hallazgos principales derivados de este análisis se presentan a continuación, estructurados en función de las hipótesis planteadas y los artículos publicados que resumen estas investigaciones.

6.1 Distintas firmas de la microbiota intestinal asociadas con la progresión de la aterosclerosis

Este apartado presenta los resultados correspondientes a la primera hipótesis, que plantea que la composición de la microbiota intestinal puede influir en la progresión de la aterosclerosis en individuos diagnosticados con VIH. La metodología específica utilizada para abordar esta hipótesis se describe en la sección 5.-METODOLOGÍA bajo "Primera Hipótesis"y "Análisis del Microbioma" (Paso 3)

6.1.1 Características de los pacientes

De los 202 participantes reclutados inicialmente para el estudio, 190 y 173 completaron las visitas de seguimiento de 48 y 96 semanas, respectivamente. Las razones de abandono durante el seguimiento incluyeron fallecimiento, embarazo, reubicación y pérdida de seguimiento. Para la evaluación de la progresión de la aterosclerosis, un total de 191 y 172 participantes contaron con 2 y 3 mediciones de espesor íntima-media de las arterias carotídeas (cIMT), respectivamente. La progresión del cIMT se definió como un aumento ≥10% y/o la detección de una nueva placa carotídea Entre los participantes con al menos 2 mediciones de cIMT, 87 experimentaron un aumento del cIMT ≥10%, y 54 desarrollaron nuevas placas carotídeas La recolección de muestras fecales se realizó al inicio, a las 48 y 96 semanas, obteniéndose un total de 548 muestras secuenciales de 191 participantes con al menos 2 muestras fecales y 2 mediciones de cIMT (Tabla 1).

Tabla 1: Diagrama de flujo del seguimiento de los participantes y toma de muestras en cada visita . Extraida de Masiá M, García J et al (68)

Participantes con al menos 2 mediciones de cIMT	**Muestras fecales**			
	Visita Basal	**Visita 48 semanas**	**Visita 96 semanas**	**Total**
Participantes con 3 muestras fecales disponibles	166	166	166	191 Participantes con al menos 2 muestras fecales y 2 mediciones de cIMT
Participantes con 2 muestras fecales disponibles	1	0	1	
Participantes con 2 muestras fecales disponibles	24	24	0	
Número de muestras fecales	191	190	167	548 muestras fecales

Los datos incluyen participantes con al menos 2 muestras fecales y 2 mediciones del espesor de la íntima-media carotídea (cIMT).

Tal como se detalla en la Tabla 2, los participantes con progresión del cIMT eran significativamente mayores, mostraron una mayor frecuencia de dislipidemia, una puntuación de riesgo de Framingham más alta y una tendencia a una mayor frecuencia de hipertensión, en comparación con aquellos sin progresión. No se observaron diferencias significativas en la prevalencia de diabetes, hábito de fumar, hábitos dietéticos, actividad física, composición del tratamiento antirretroviral o aumento de peso entre los grupos de progresión del cIMT. Dieciséis participantes (8%) cambiaron su tratamiento antirretroviral durante el estudio.

Tabla 2: Características de los pacientes estudiados para evaluar los perfiles de la microbiota intestinal asociados con la progresión de la aterosclerosis. Extraida de Masiá M, García J et al (68)

		Progresion del cIMT		
		Si	No	p-valu e
Pacientes No.		87(45,5)	104(54,5)	…
Sexo masculino		71(81,6)	82(7936)	0,85
Varibles HIV	**Modo de Trasmision**			
	HSH	37 (42,5)	59 (56,7)	0,007
	Heterosexual	19 (21,8)	23 (22,1)	
	UDI	23 (26,4)	9(8,7)	
	Desconocido	8(9,2)	13(12,5)	
	Recuento de células T CD4 nadir células/µL	245 (139–318)	254 (147–411)	0,29
	Recuento de células T CD4, células/µL	654 (450–876)	719 (544–866)	0,22
	Proporción de células T CD4, %	34 (28–40)	38 (32- 43)	0,03
	Relación CD4/CD8)	0.9 (0.7–1.3)	0.9 (0.7–1.3)	0,24
	Duración de la exposición al último tratamiento antirretroviral (TAR) meses	33 (19–52)	33 (18–44)	0,37
	Tratamiento con NRTI en el inicio	72 (82.8)	79 (76)	0,14
	Tratamiento con NNRTI en el inicio	55 (63.2)	69 (66.3)	0,76
	Tratamiento con INSTI en el inicio	48 (55.2	59 (56.7)	0,88
Factores de riesgo cardiovascular	**Tabaquismo actual**	45 (51.7)	51 (49)	0,77
	Hipertensión	13 (14.9)	6 (5.8)	0,051
	Dislipidemia	17 (19.5)	5 (5)	0,003
	Diabetes	3 (3.4)	2 (1.9)	0,66
	Puntuación de riesgo de Framingham	11 (5.5–20.3)	4.8 (3.1–8.1)	0,001
	Riesgo de ASCVD a 10 años	5.9 (2.4–11)	1.8 (1–3.7)	0,001
Variables cardiovasculares y metabólicas, mediana (IQR)	**Presión arterial, mm Hg**			
	Sistólica	127 (114–138)	118 (109–126)	0,001
	Diastólica	73 (66–80)	67 (62–74)	0,001
	IMC	25.6 (22.7–28.2)	24 (22–27.4)	0,03
	Aumento de peso, kg	3 (1–5.2)	2 (0.5–4.8)	0,25
	Relación cintura-cadera	1 (0.9–1)	0.9 (0.9–1)	0,001
	Índice de hígado graso	46.8 (17–70.9)	28 (11.7–70.9)	0,002
	Índice de triglicéridos y glucosa	4.6 (4.4–4.8)	4.5 (4.3–4.6)	0,004
	Colesterol total, mg/dL	177 (151–199.5)	168.5 (147–186.2	0,14
	Colesterol LDL, mg/dL	110 (90.5–132)	99 (87–116)	0,03
	Colesterol HDL, mg/dL	43 (36–51)	48 (40–57)	0,01
	Triglicéridos, mg/dL	107(73-17035)	88 (6639–123)	0,003
	Glucosa, mg/dL	89 (84–97)	90 (82–95)	0,45

TAR, terapia antirretroviral; ASCVD, enfermedad cardiovascular aterosclerótica; IMC, índice de masa corporal; cIMT, espesor íntima-media carotídeo; HDL, lipoproteína de alta densidad; VIH, virus de la inmunodeficiencia humana; UDI, uso de drogas inyectables; INSTI, inhibidor de la transferencia de la cadena de la integrasa; IQR, rango intercuartil; LDL, lipoproteína de baja densidad; HSH, hombres que tienen sexo con hombres; NNRTI, inhibidor no nucleósido de la transcriptasa inversa; NRTI, inhibidor nucleósido de la transcriptasa inversa. a Se utilizó la prueba exacta de Fisher para la comparación de grupos entre variables categóricas y la prueba U de Mann-Whitney para la comparación de grupos entre variables continuas. b El IMC se calculó dividiendo el peso en kilogramos entre el cuadrado de la altura en metros.c.-El índice de higdo graso se calculo mediante la formula para FLI (Fatty Liver Index, FLI) desarrolada por Giorgio Bedogni et al (69)

6.1.2 Medidas de la diversidad del microbioma intestinal y progresión del cIMT

El análisis de la Alfa Diversidad, tal como se describe en el Paso 3.3 de la sección 5.- METODOLOGÍA, no mostró diferencias significativas en los índices de diversidad (frecuencias observadas, Shannon e Inversa Simpson) entre los grupos de progresión del cIMT en la visita inicial, tanto en el análisis ajustado por covariables como la puntuación de riesgo de Framingham, el recuento de células CD4 del nadir, el modo de transmisión de la infección por el VIH y el IMC (Figura 4), como en el análisis no ajustado (Figura 5).

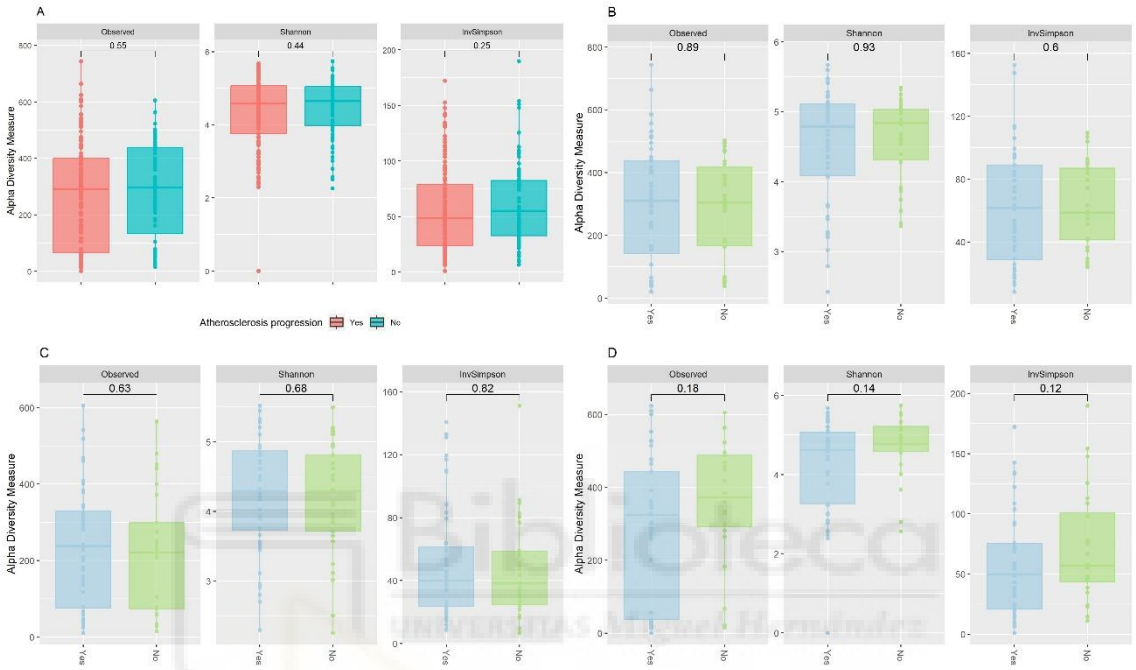


Figura 4: Diversidad α entre los grupos de progresión del grosor íntima-media carotídeo (cIMT) emparejados con la puntuación de propensión. Extraida de Masiá M, García J et al ***(68)***

A: Los diagramas de caja indican la α-diversidad según el grupo de progresión del grosor íntima-media carotídeo utilizando diferentes métricas: variantes de secuencia de amplicón observadas (ASV), índices de Shannon y Simpson inverso. El análisis incluye 39 participantes emparejados en cada grupo de progresión del grosor íntima-media carotídeo, con muestras recogidas en las tres visitas (224 muestras en total).
B: α-diversidad en la visita basal entre los grupos emparejados de progresión del grosor íntima-media carotídeo.
C: α-diversidad en la visita de las 48 semanas entre los grupos emparejados de progresión del grosor íntima-media carotídeo.
D: diversidad α en la visita de la semana 96 entre los grupos emparejados de progresión del grosor íntima-media carotídeo. Los valores de p se calcularon mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon. El número de muestras en la visita inicial fue de 78, en la visita de la semana 48, de 77, y en la visita de la semana 96, de 69.

Sí se observaron cambios temporales en la alfa diversidad a lo largo del seguimiento, pero sin diferencias significativas entre los índices iniciales y los obtenidos a las 96 semanas, ni en los cambios temporales entre los grupos con y sin progresión del cIMT.

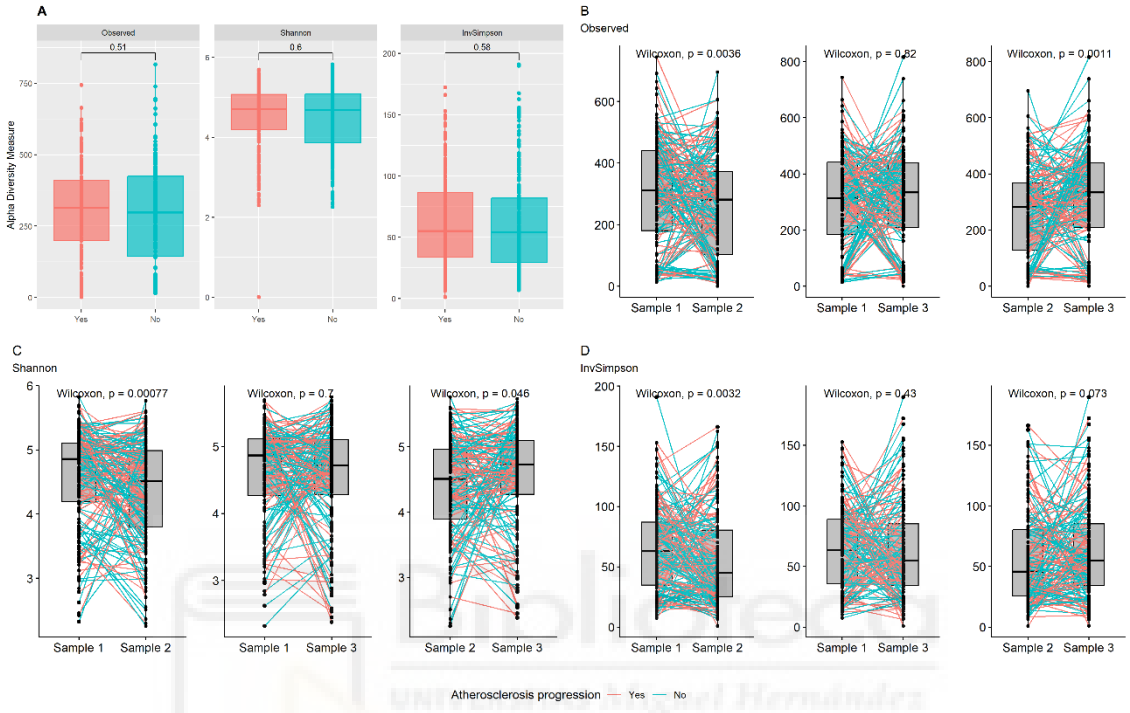


Figura 5: Diversidad α de la microbiota intestinal a nivel de género según la progresión del grosor íntima-media carotídeo (cIMT). Extraida de Masiá M, García J et al (68)

A: Los diagramas de cajas muestran la diversidad α según el grupo de progresión del cIMT utilizando diferentes métricas: variantes de secuencia de amplicón observadas (ASV), índices de Shannon e índices de Simpson inverso. El análisis incluye todas las muestras del estudio. Los números en la parte superior de los cuadros representan los valores de p.
B: Comparación de la diversidad α entre las visitas de estudio utilizando las ASV observadas.
C:Comparación de la diversidad α entre las visitas de estudio utilizando el índice de Shannon.
D: Comparación de la diversidad α entre las visitas de estudio utilizando el índice de Simpson inverso. Todos los valores de p se calcularon mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon.

Para evaluar las diferencias globales en la composición de la microbiota, se realizó un análisis de Beta Diversidad utilizando el método PERMANOVA con la distancia de Bray-Curtis, conforme al Paso 3.2 de la sección 5.-METODOLOGÍA. Este análisis reveló que las muestras se agruparon significativamente en función de la progresión del cIMT (P = .03). La visualización de esta agrupación se realizó mediante un análisis de Coordenadas Principales (PCoA) (70), que se presenta en la Figura 6.

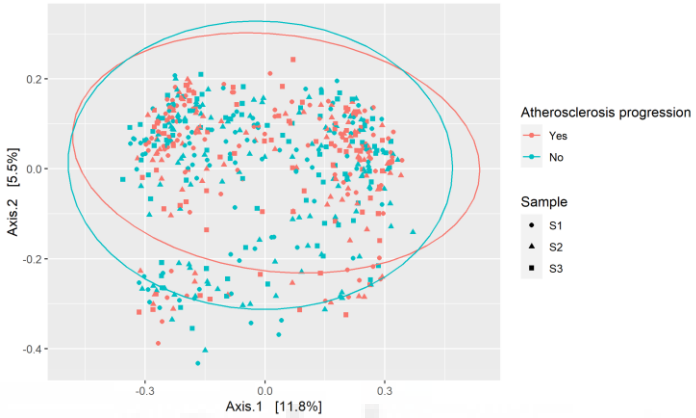


Figura 6: Analisis de componentes Principales distancia de Bray-Curtis. Extraida de Masiá M, García J et al (68)

El análisis PERMANOVA arrojó un tamaño del efecto (ω^2) de 0,001, lo que sugiere un efecto modesto. Inicialmente, se observó una tendencia hacia diferencias en la beta diversidad utilizando el índice de divergencia (P = .15), aunque no resultó estadísticamente significativa (figura 7).

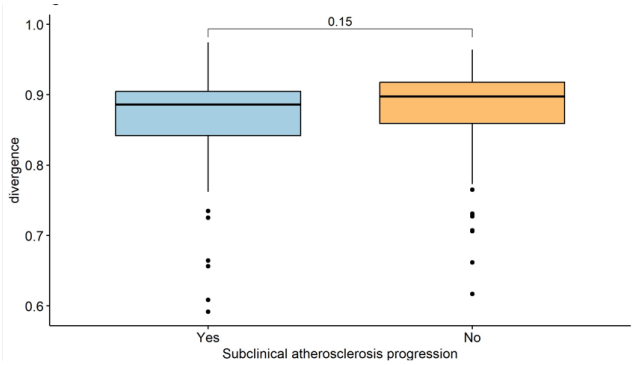


Figura 7: Indice de divergencia entre pacientes con progresión y sin progresión de ateroscleroses subclina .Extraida de Masiá M, García J et al (68)

En el análisis de secuencia se identificaron un total de 16 filos bacterianos. La Tabla 3 muestra la abundancia relativa a nivel de filo para los grupos con y sin progresión de cIMT en la visita inicial

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

Tabla 3: Abundancias relativas a nivel de filos según el grupo de progresión del grosor íntima-media carotídeo. Extraida de Masiá M, García J et al (68)

Phylum	**All**	**Progresores del cIMT**	**No progresores del cIMT**	**P**
Firmicutes	59.9	60.8	59.9	p<0.001
Bacteroidetes	30.6	29.6	30.6	p<0.001
Proteobacteria	4.2	42.2	4.2	0.389
Actinobacteria	3.4	3.5	3.4	0.120
Tenericutes	0.5	0.5	0.5	0.095
Cyanobacteria	0.3	0.3	0.3	0.056
Verrucomicrobia	0.2	0.2	0.2	0.160
Euryarchaeota	0.2	0.2	0.2	0.296
Lentisphaerae	0.2	0.2	0.2	0.788
Fusobacteria	0.1	0.1	0.1	0.738
Patescibacteria	0.1	0.1	0.1	0.946
Epsilonbacteraeota	0.1	0.1	0.1	0.187
Spirochaetes	0.1	0.1	0.1	0.129
Elusimicrobia	0.1	0.0	0.1	0.468
Synergistetes	0.1	0.0	0.1	0.521
Kiritimatiellaeota	0.0	0.0	0.0	0.026

Los filos más representativos en ambos grupos fueron *Firmicutes* (60,8% y 59,1% respectivamente; P < 0,001), *Bacteroidetes* (29,6% y 31,5% respectivamente; P < 0,001), *Proteobacteria* (4,2% y 4,1%; P = 0,39) y *Actinobacteria* (3,5% y 3,4%; P = 0,120).

A lo largo del período de seguimiento, se encontraron disminuciones y aumentos significativos en la abundancia de algunos filos, pero sin diferencias observadas entre los grupos de progresión del cIMT, (Tablas 4,5,6).

Tabla 4: Phylum Todos los participantes. Extraida de Masiá M, García J et al (68)

Phylum	Visita 1 %	Visita 2 %	Visita 3%	p-valor, Friedman
k__Bacteria;p__Firmicutes	49.5	50.8	50.6	0.32
k__Bacteria;p__Bacteroidota	37.0	39.2	38.6	0.072
k__Bacteria;p__Actinobacteriota	6.0	3.7	3.9	p<0.001
k__Bacteria;p__Proteobacteria	5.5	4.5	4.4	0.038
k__Bacteria;p__Verrucomicrobiota	0.7	0.7	0.8	p<0.001
k__Bacteria;p__Desulfobacterota	0.6	0.5	0.7	p<0.001
k__Archaea;p__Euryarchaeota	0.3	0.2	0.2	0.562
k__Bacteria;p__Spirochaetota	0.1	0.1	0.2	p<0.001
k__Bacteria;p__Cyanobacteria	0.1	0.1	0.2	p<0.001
k__Bacteria;p__Fusobacteriota	0.1	0.0	0.2	p<0.001

Visita 1, Muestra Basal; Visita 2, Muestra 48 semanas; Visita3, Muestra 96 semanas

Tabla 5: Phylum Participantes que muestran progresión del grosor íntima-media caroteideo. Extraida de Masiá M, García J et al (68)

Phylum	Visita 1 %	Visita 2 %	Visita 3%	p-valor, Friedman
k__Bacteria;p__Firmicutes	50.3	51.4	51.0	0.688
k__Bacteria;p__Bacteroidota	35.7	38.6	38.1	0.063
k__Bacteria;p__Actinobacteriota	6.6	3.5	3.8	p<0.001
k__Bacteria;p__Proteobacteria	5.3	4.5	4.6	0.094
k__Bacteria;p__Verrucomicrobiota	1.0	0.8	0.8	0.059
k__Bacteria;p__Desulfobacterota	0.7	0.5	0.7	p<0.001
k__Archaea;p__Euryarchaeota	0.2	0.2	0.1	0.921
k__Bacteria;p__Cyanobacteria	0.1	0.1	0.2	0.014
k__Bacteria;p__Fusobacteriota	0.1	0.0	0.2	0.261

Visita 1, Muestra Basal; Visita 2, Muestra 48 semanas; Visita3, Muestra 96 semanas

Tabla 6: Phylum Participantes que no muestran progresión del grosor íntima-media carotídeo. Extraida de Masiá M, García J et al (68)

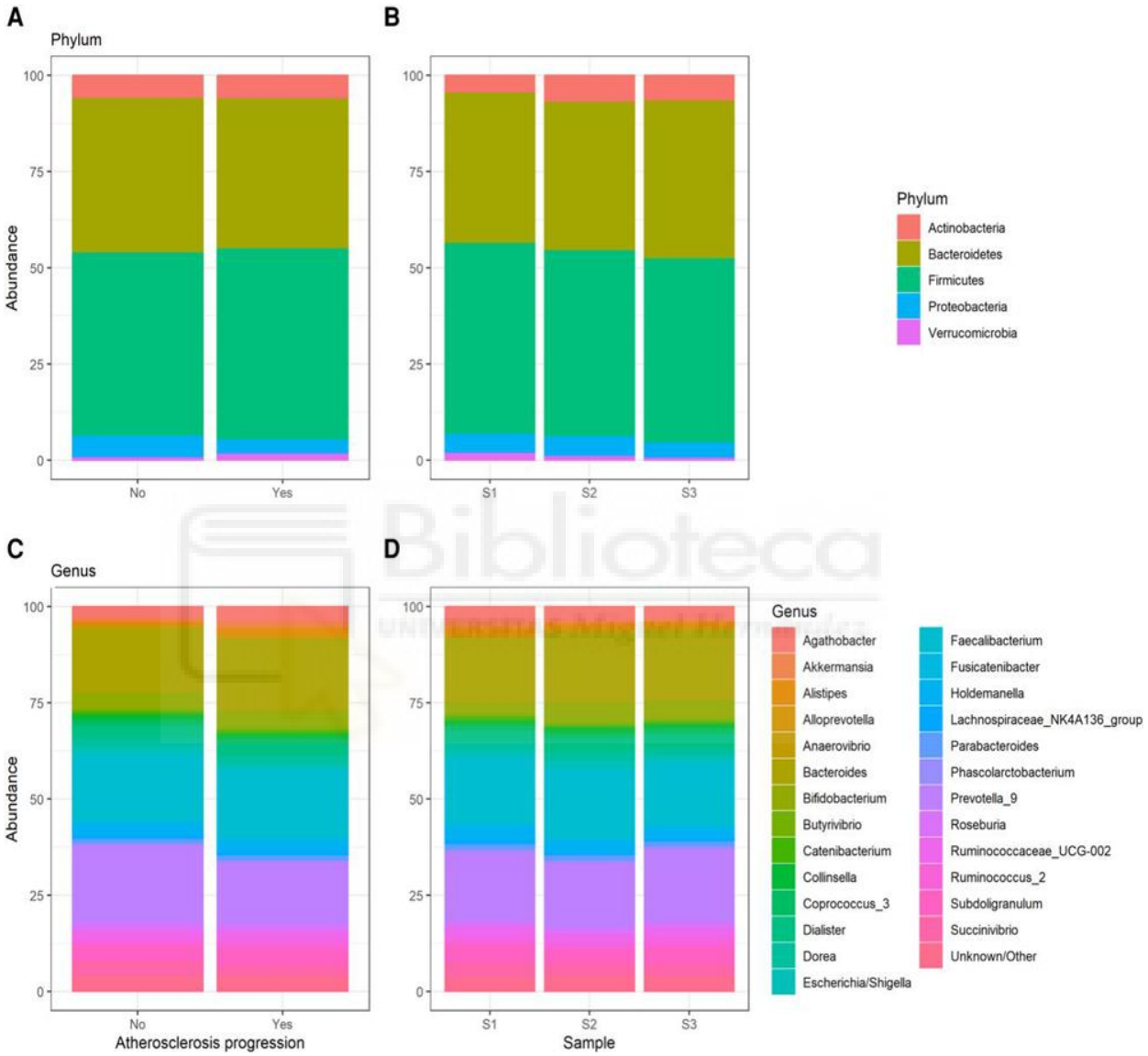
Phylum	Visita 1 %	Visita 2 %	Visita 3%	p-valor, Fri
k__Bacteria;p__Firmicutes	48.5	50.5	50.4	0.322
k__Bacteria;p__Bacteroidota	38.5	39.8	39.0	0.464
k__Bacteria;p__Proteobacteria	5.8	4.6	4.3	0.295
k__Bacteria;p__Actinobacteriota	5.4	3.9	3.9	0.005
k__Bacteria;p__Desulfobacterota	0.6	0.4	0.7	0.002
k__Archaea;p__Euryarchaeota	0.4	0.2	0.2	0.521
k__Bacteria;p__Verrucomicrobiota	0.4	0.5	0.9	p<0.001
k__Bacteria;p__Spirochaetota	0.2	0.0	0.1	p<0.001
k__Bacteria;p__Cyanobacteria	0.1	0.0	0.2	p<0.001
k__Bacteria;p__Fusobacteriota	0.1	0.0	0.1	p<0.001

Visita 1, Muestra Basal; Visita 2, Muestra 48 semanas; Visita3, Muestra 96 semanas

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

Se identificaron un total de 312 géneros bacterianos. La abundancia relativa de los géneros más representativos se muestra en la Figura 8.

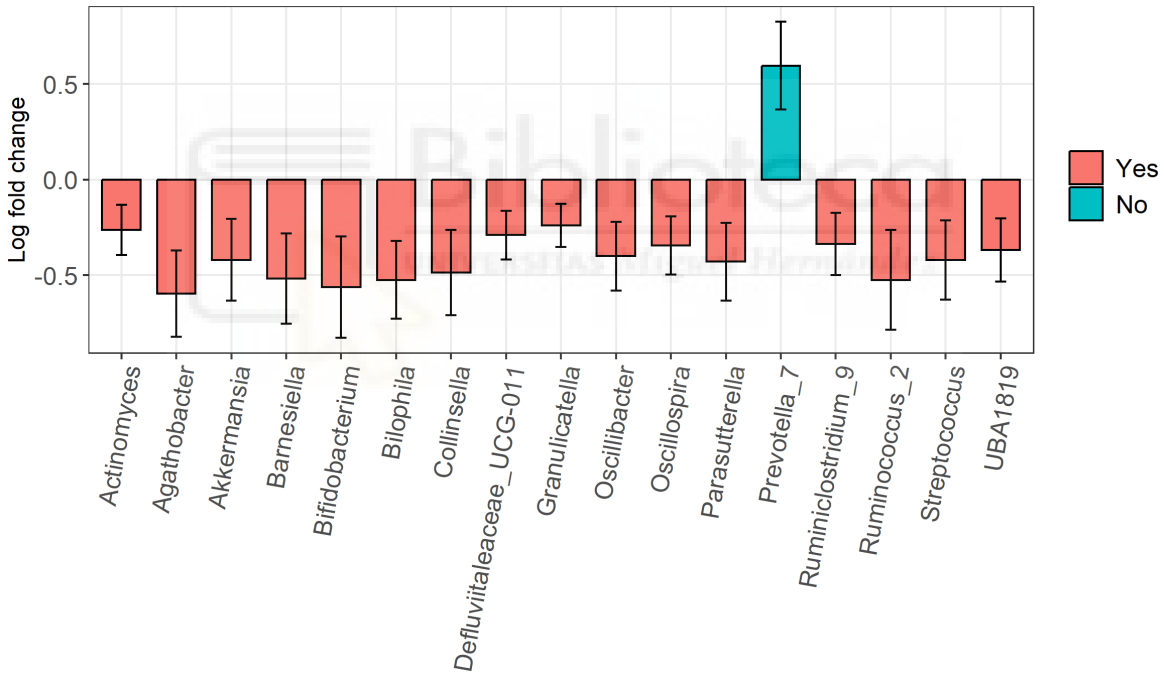
Figura 8: Abundancia relativa de los géneros más representativos. Extraida de Masiá M, García J et al ***(68)***



6.1.3 Análisis de la abundancia diferencial (ANCOM-BC2) por grupo de progresión de aterosclerosis subclínica

Para identificar taxones bacterianos específicos con cambios significativos en la abundancia relativa se aplicó la metodología ANCOM-BC2(66). Este análisis longitudinal, ajustado por edad, sexo, modo de transmisión HSH, IMC, hipertensión, dislipidemia, hábito tabáquico y recuento de células CD4 del nadir, reveló distintas asociaciones entre los grupos de progresión de cIMT y la abundancia de taxones bacterianos específicos. Específicamente, los géneros *Agathobacter, Ruminococcus 2, Bilophila, y Bifidobacterium* se asociaron con la progresión del cIMT. Otros géneros como *Parasutterella y Barnesiella* también mostraron asociación con la progresión de cIMT. Por el contrario, *Prevotella* 7 se asoció con no progresión del cIMT (Figura 9).

Figura 9: Análisis de la abundancia diferencial (ANCOM-BC2) por grupo de progresión de aterosclerosis subclínica . Extraida de Masiá M, García J et al (68)



Las abundancias relativas de los taxones identificados por ANCOM-BC2(66) se ilustran mediante diagramas de caja, que muestran los principales taxones identificados por grupo de progresión de aterosclerosis subclínica. A*, Agathobacter*. B, *Ruminococcus*_2. C, *Bilophila*. D, *Prevotella_7*. Los valores p se calcularon utilizando ANCOM-BC2 con datos longitudinales y efectos aleatorios, ajustando por edad, sexo, modo de transmisión HSH, recuento mínimo de CD4, índice de masa corporal (IMC), hipertensión, tabaquismo e hiperlipidemia. El análisis incluye 548 muestras fecales (figura 10)

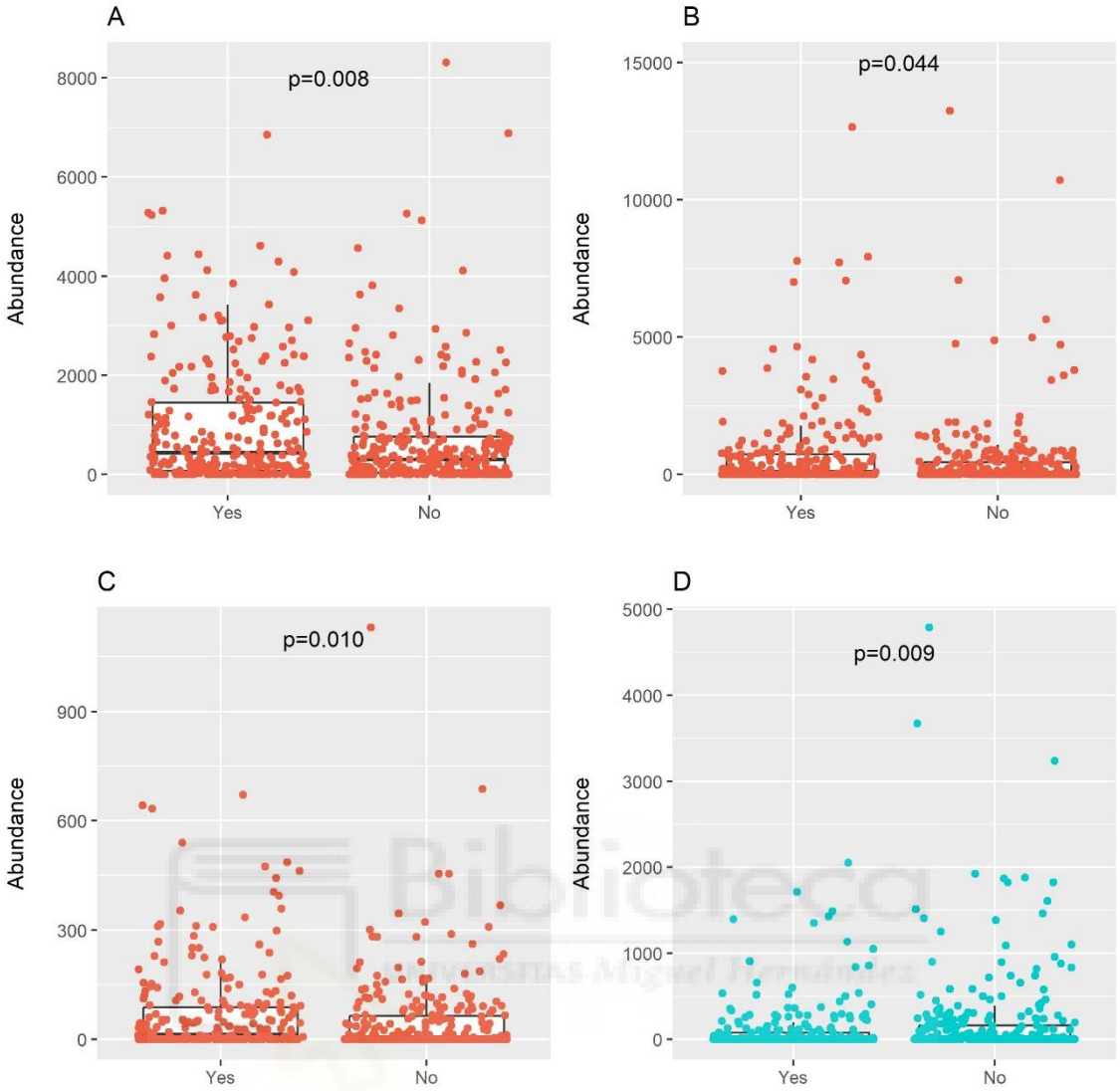


Figura 10: Box-plots mostrando los principales taxones identificados por ANCOM-BC2, por grupo de progresión de aterosclerosis subclínica. Extraida de Masiá M, García J et al ***(68)***

6.2 Microbiota intestinal y aumento de peso en personas con VIH con inhibidores de la integrasa: un estudio longitudinal de cinco años

Este apartado presenta los resultados correspondientes a la segunda hipótesis, que sugiere que el aumento de peso en personas con VIH podría estar relacionado tanto con la composición de la microbiota como con el tratamiento antirretroviral. La metodología específica utilizada para abordar esta hipótesis se describe en la sección 5 (Metodologia) y Análisis del Microbioma (Paso 3).

6.2.1 Diseño del Estudio, Pacientes y Procedimientos

Este fue un estudio de cohorte longitudinal prospectivo de 5 años. Se incluyeron participantes adultos con infección por VIH que recibían regímenes antirretrovirales basados en NNRTI o INSTI, con carga viral indetectable, excluyendo aquellos con enfermedad cardiovascular conocida, embarazo o que recibían inhibidores de proteasa. El estudio fue aprobado éticamente y todos los participantes firmaron consentimiento informado. Se recopiló información detallada en las visitas de seguimiento (inicial, 48, 96, 144, 192 y 240 semanas), incluyendo exámenes físicos, medidas antropométricas, muestras de sangre y, cuando no hubo uso reciente de antibióticos, muestras fecales. El seguimiento de los pacientes se extendió hasta el 18 de septiembre de 2024.

6.2.2 Cambios en el peso corporal a cinco años

Las mediciones de peso se estandarizaron en todas las visitas utilizando la misma balanza calibrada. El aumento de peso significativo se definió como un aumento de peso de ≥10% entre dos mediciones consecutivas o un aumento de peso de ≥10% en comparación con el peso corporal inicial. Se realizó un subanálisis con un umbral inferior de ≥5%. Las características basales se resumen en la tabla 7.

Tabla 7: Características basales de los participantes en el estudio de la relación de la microbiota con el aumento de peso corporal Extraida de García-Abellán J, García J et al (71)

			Aumento significativo de peso				
	Todos		**Yes**		**No**		***P valor***
Pacientes (no.)	**202**	**(100)**	**70**	**(34.7)**	**132**	**(65.3)**	**—**
Hombre (sexo)	153	(80.5)	47	(74.6)	106	(83.5)	0.174
Edad (años)	50	(40–56)	48	(38–54)	50	(40.5–56.5)	0.119
Variables relacionadas con el VIH							
Mode trasmision del VIH							0.257
HSH	101	-50	36	(51.4)	65	(49.2)	
Heterosexual	46	(22.8)	18	(25.7)	28	(21.2)	
UDI	33	(16.3)	10	(14.3)	23	(17.4)	
Desconocido	22	(10.9)	6	(8.5)	16	(12.1)	
CD4T- recuento celular nadir (cells/mm3)	250	(139–351)	218	(148–310)	258	(136–375)	0.209
CD4T- recuento celular (cells/mm3)	687	(530–935)	688	(539–810)	686	(530–983)	0.631
CD4T-porcentaje celular (%)	36.7	(30–42)	36	(29–42)	37	(30–42)	0.590
CD4/CD8 ratio	1	(0.7–1.4)	1	(0.7–1.4)	1	(0.7–1.3)	0.751
Meses de exposición al último TAR	33	(18–50)	34.5	(18–54)	33	(19–46)	0.504
NRTI-en el tratamiento basal, no. (%)	162	(80.2)	56	-80	106	(80.3)	1.000
TAF- en el tratamiento basal, no (%)	14	(6.9)	4	(5.7)	10	(7.6)	0.775
NNRTI- en el tratamiento basal, no (%)	92	(45.5)	33	(47.1)	59	(44.7)	0.854
Basados en RPV	72	(35.6)	27	(38.6)	45	(34.1)	0.442
Basados en EFV	14	-7	5	(7.1)	9	(6.9)	1.000
Basados en NVP	5	(2.5)	1	(1.4)	4	(3.1)	0.659
Basados en DOR	1	(0.5)	0	0	1	(0.8)	—
INSTI- en el tratamiento basal, no (%)	69	(34.2)	21	-30	48	(36.4)	0.452
Basados en DTG	55	(27.5)	18	(25.7)	37	(28.5)	0.741
Basados en RAL	7	(3.5)	1	(1.4)	6	(4.6)	0.425
Basados en EVG	6	-3	1	(1.4)	5	(3.8)	0.442
Basados en BIC	1	(0.5)	1	(1.4)	0	0	—
NNRTI+INSTI combinado en el basal, no (%)	41	(20.3)	16	(22.9)	25	(18.9)	0.635
Basados en RPV+CAB	26	-13	13	(18.6)	13	-10	0.121
Basados en RPV+DTG n	13	(6.5)	1	(1.4)	12	(9.2)	0.036
Basados en ETV+DTG	1	(1.5)	1	(1.4)	0	0	—
Basados en	1	(1.5)	1	(1.4)	0	0	—
CVD, no. (%)							
Tabaquismo actual	96	(50.3)	36	(57.1)	60	(46.9)	0.219
Hipertension	20	-10	4	(5.7)	16	(12.2)	0.215
Dislipemia	22	(11.7)	4	(6.3)	18	(14.4)	0.149
Diabetes	5	(2.5)	1	(1.4)	4	(3.1)	0.66
Puntuacion en la escala de Framingham(%)	7.5	(3.9–12.5)	6.1	(2.6–11.1)	7.8	(4.9–14.7)	0.018
Puntuacion en la escala ASCVD (%)	2.6	(1.3–7.1)	1.9	(1–5.8)	3.1	(1.4–8.3)	0.106
Parámetros cardiometabólicos, no. (%)							
Presión arterial (mm Hg)							
Sistólica	121	(111–134)	119	(108–132)	122	(113–135)	0.067
Diastólica	70	(63–77)	67	(61–77)	71	(65–77)	0.175
IMC (kg/m2)	25.4	(23–28.1)	24.8	(22.4–28.4)	25.6	(23.3–28)	0.508
Colesterol total (mg/dL)	178	(155–207.5)	175	(155–194)	183	(155–210)	0.189
LDL colesterol (mg/dL)	110	(85–131)	109	(84–126)	110	(87–132)	0.402
HDL colesterol (mg/dL)	46.5	(39–56)	48	(41–56)	45.5	(38–56)	0.173
Trigliceridos (mg/dL)	107	(73–139.2)	93	(66–119)	116	(76–163)	0.003

Las variables categóricas se expresan como número (porcentaje) y las variables continuas como mediana (IQR)

IDU: Usuario de drogas intravenosas; VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana; HSH: Hombre que tiene sexo con hombres; UDI: Ususario de drogas inyectables; TAF: Fumarato de tenofovir alafenamida; INSTI: Inhibidor de la Integrasa; INRT: Inhibidor de la transcriptasa inversa de nucleósidos; CVD: Factores de riesgo cardivascular; ASCVD: Ecuaciones de Cohortes Agrupadas de la *American College of Cardiology / American Heart Association* para estimar el riesgo de enfermedad cardiovascular aterosclerótica ; IMC: Indice de masa corporal; EFV: efavirenz ; DOR: doravirina; RAL:raltegravir; EVG:elvitegravir; BIC:bictegravir; CAB:cabotegravir;ETV:etravirina.

Al inicio del estudio, 105 participantes tenían peso normal, 77 sobrepeso y 20 eran obesos. Durante el seguimiento, 180 y 169 participantes tuvieron cuatro y cinco mediciones de peso, respectivamente.

La mediana de aumento de peso a 5 años fue de 1,3 kg. Setenta participantes experimentaron un aumento de peso significativo (20 con ≥10% entre mediciones consecutivas y 50 con ≥10% desde el inicio).

Los participantes con aumento significativo de peso consumían significativamente más calorías al día ($p = 0,03$), mientras que los niveles de actividad física fueron similares. No se observaron diferencias significativas en el aumento de peso entre los regímenes basados en INSTI y en NNRTI ($p = 0,967$), ni entre los regímenes que contenían TAF más INSTI frente a solo INSTI ($p = 0,171$) o frente a TAF más NNRTI ($p = 0,164$). La información detallada sobre los cambios en el peso y el IMC se muestra en la Tabla 8

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

Tabla 8: Evolución del peso y el IMC en los participantes en el estudio de la relación de la microbiota con el aumento de peso corporal. Extraida de García-Abellán J, García J et al (71)

	Aumento de peso significativo*		Todos los participantes	
	Si	No		P valor
Pacientes no.	70 (34.7)	132 (65.3)	202 (100)	-
IMC, kg/m2				
Basal	23.7 (21.7- 25.8)	25.5 (23.3- 27.9)	24.7 (22.5 - 27.7)	0.005
Visita de la semana 48	24.6 (22.2- 27.9)	25.4 (23.3- 28.1)	25.2 (22.9 - 28.1)	0.275
Visita de la semana 96	25.8 (22.8- 28.4)	25.4 (23.1- 27.9)	25.5 (22.9 - 28.2)	0.629
Visita de la semana 144	26.0 (23.5- 28.1)	25.5 (22.9- 27.6)	25.6 (23.1 - 27.8)	0.263
Visita de la semana 192	25.8 (22.8- 28.3)	25.4 (23.1- 27.8)	25.5 (23.0 - 28.0)	0.511
Visita de la semana 240	26.0 (22.9- 29.1)	25.7 (22.9- 28.0)	25.7 (22.9 - 28.4)	0.285
IMC categoria mediana (%)				
Basal				0.073
Normopeso	44 (62.9)	61 (46.2)	105 (52.0)	
Sobrepeso	20 (28.6)	57 (43.2)	77 (38.1)	
Obeso	6 (8.6)	14 (10.6)	20 (9.9)	
Visita de la semana 48				0.345
Normopeso	39 (55.7)	61 (46.2)	100 (49.5)	
Sobrepeso	23 (32.9)	57 (43.2)	80 (39.6)	
Obeso	8 (11.4)	14 (10.6)	22 (10.9)	
Visita de la semana 96				0.705
Normopeso	29 (42.6)	63 (48.5)	92 (46.5)	
Sobrepeso	30 (44.1)	53 (40.8)	83 (41.9)	
Obeso	9 (13.2)	14 (10.8)	23 (11.6)	
Visita de la semana 144				0.198
Normopeso	30 (44.8)	53 (42.4)	83 (43.2)	
Sobrepeso	26 (38.8)	61 (48.8)	87 (45.3)	
Obeso	11 (16.4)	11 (8.8)	22 (11.5)	
Visita de la semana 192				0.360
Normopeso	25 (39.7)	55 (47.0)	80 (44.4)	
Sobrepeso	28 (44.4)	51 (43.6)	79 (43.9)	
Obeso	10 (15.9)	11 (9.4)	21 (11.7)	
Visita de la semana 240				0.520
Normopeso	25 (41.7)	49 (45.0)	74 (43.8)	
Sobrepeso	26 (43.3)	50 (45.9)	76 (45.0)	
Obeso	9 (15.0)	10 (9.2)	19 (11.2)	
Peso, kg				
Basal	67.8 (61.0- 80.1)	73.5 (66.0- 85.0)	72.0 (64.0 - 83.0)	0.010
Visita de la semana 48	74.8 (62.2- 82.0)	74.5 (66.9- 85.2)	74.5 (65.0 - 84.0)	0.201
Visita de la semana 96	75.8 (65.4- 83.3)	74.0 (66.3- 85.0)	74.0 (65.5 - 84.4)	0.986
Visita de la semana 144	76.5 (65.5- 82.5)	74.2 (66.0- 84.0)	75.1 (65.9 - 83.5)	0.521
Visita de la semana 192	77.5 (64.2- 83.2)	74.0 (66.8- 83.5)	75.0 (66.2 - 83.5)	0.669
Visita de la semana 240	76.5 (64.3- 85.2)	74.6 (67.0- 84.5)	75.0 (65.8 - 84.5)	0.574
Ganancia de peso en relación con el basal, kg				
Visita de la semana 48	2.5 (0.0- 5.0)	0.2 (-1.6- 1.8)	0.7 (-1.2 - 2.5)	<0.001
Visita de la semana 96	4.8 (0.4- 8.5)	0.5 (-2.0- 2.2)	0.9 (-1.5 - 4.5)	<0.001
Visita de la semana 144	5.8 (0.4- 9.0)	0.0 (-3.0- 2.5)	0.9 (-2.0 - 4.5)	<0.001
Visita de la semana 192	5.5 (0.0- 8.8)	-0.1 (-2.5- 2.6)	1.0 (-2.0 - 5.3)	<0.001
Visita de la semana 240	4.6 (1.0- 9.1)	0.0 (-3.5- 2.6)	1.1 (-3.0 - 4.3)	<0.001

Los cambios de peso y IMC según el régimen de TAR se muestran en la figura 11-13 y en la tabla 9.

Tabla 9: Evolución del peso corporal y el IMC durante el seguimiento según la composición del régimen antirretroviral. Extraida de García-Abellán J, García J et al (71)

Las variables categóricas se expresan como número (porcentaje) y las variables continuas como mediana (IQR).

	Antiretroviral treatment		
	Régimen que contiene INSTI	Régimen que contiene NNRTI	P valor
Pacientes, no.	63 (44.3)	79 (55.6)	-
IMC, kg/m2			
Basal	25 (22.2- 27.8)	24.7 (22.5- 27.6)	1.000
Visita de la semana 48	25.2 (23.1- 27.7)	25.3 (22.7- 28.6)	0.933
Visita de la semana 96	26 (22.9- 27.9)	25.5 (22.8- 28)	0.892
Visita de la semana 144	25.6 (22.7- 27.3)	25.6 (23.3- 27.6)	0.651
Visita de la semana 192	26 (23- 27.7)	25.6 (22.7- 28.1)	0.772
Visita de la semana 240	26.2 (22.7- 28.1)	25.8 (22.4- 28.7)	0.783
Ganancia de peso en relación con el basal, kg			
Visita de la semana 48	0.5 (-1.6- 3.5)	1 (-1- 2.5)	0.728
Visita de la semana 96	0.8 (-1.0- 4.4)	1.0 (-1.8- 5.1)	0.795
Visita de la semana 144	0.5 (-2.5- 3.5)	1.5 (-1- 5)	0.333
Visita de la semana 192	0.0 (-1.8- 5.9)	1.5 (-2- 5.5)	0.908
Visita de la semana 240	1.5 (-3.5- 4.9)	1.1 (-3- 4.9)	0.967

IMC, índice de masa corporal.INSTI, inhibidores de la transferencia de cadenas de la integrasa.INNRTI, inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos

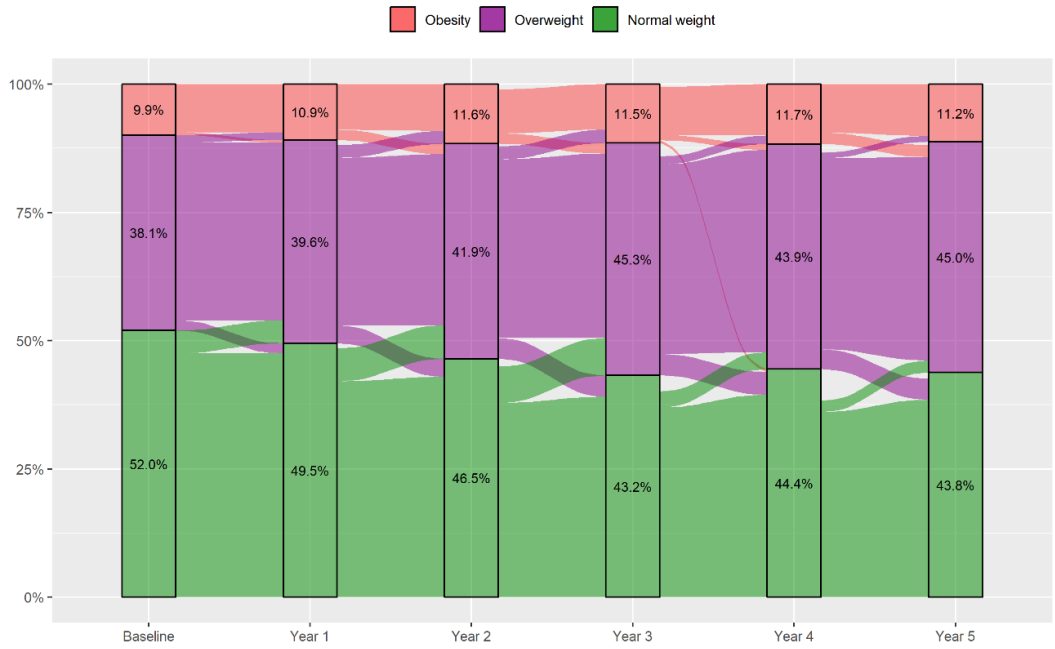


Figura 11:Evolución del índice de masa corporal a lo largo de las visitas de estudio. Extraida de García-Abellán J, García J et al (71)

a)

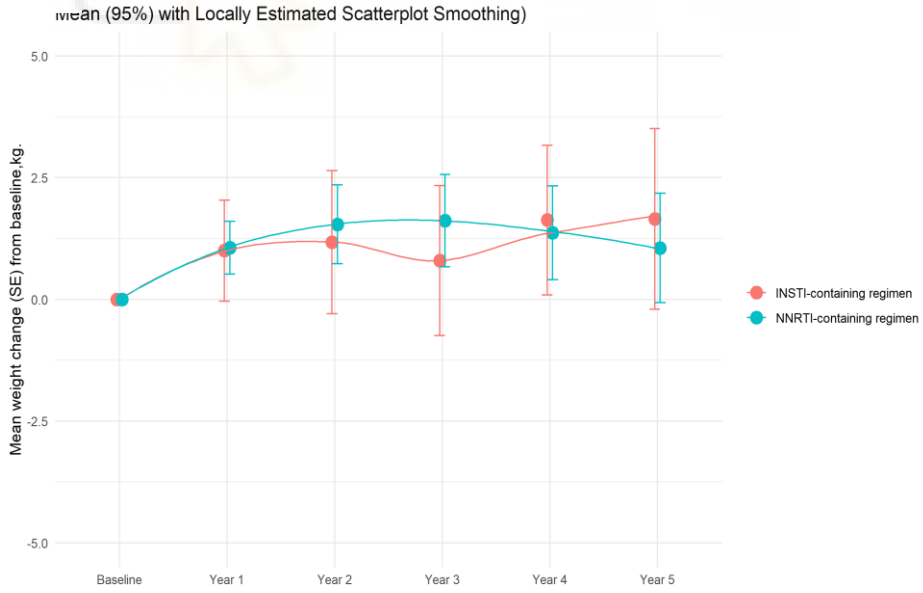


Figura 12: Evolución de peso medio a lo largo de las visitas de estudio. .Extraida de García-Abellán J, García J et al (71)

b)

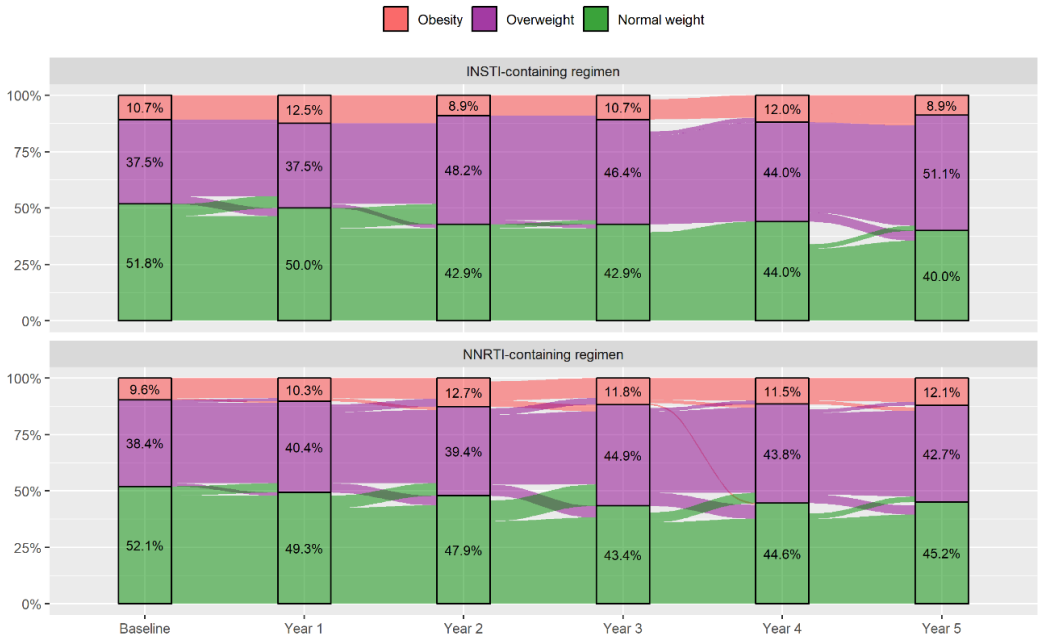


Figura 13:Evolución del índice de masa corporal a lo largo de las visitas de estudio. Extraida de García-Abellán J, García J et al (71)

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

6.2.3 Microbioma intestinal y peso corporal

De los participantes con al menos 2 mediciones de peso, 193, 192 y 168 proporcionaron muestras fecales al inicio, a las 48 y 96 semanas, resultando en 553 muestras secuenciales. Las muestras fecales fueron recolectadas en casa siguiendo un protocolo predefinido y almacenadas a 4°C antes de ser congeladas a −80°C. El ADN se extrajo utilizando el sistema MagNA PURE LC. y se realizó la secuenciación del gen 16S ribosomal RNA (región V3–V4). Las lecturas se procesaron utilizando la canalización DADA2 y se clasificaron taxonómicamente utilizando la base de datos SILVA.

El análisis de la **Alfa Diversidad** (Paso 3.3) no mostró diferencias significativas entre los participantes con o sin aumento de peso significativo en todas las muestras.

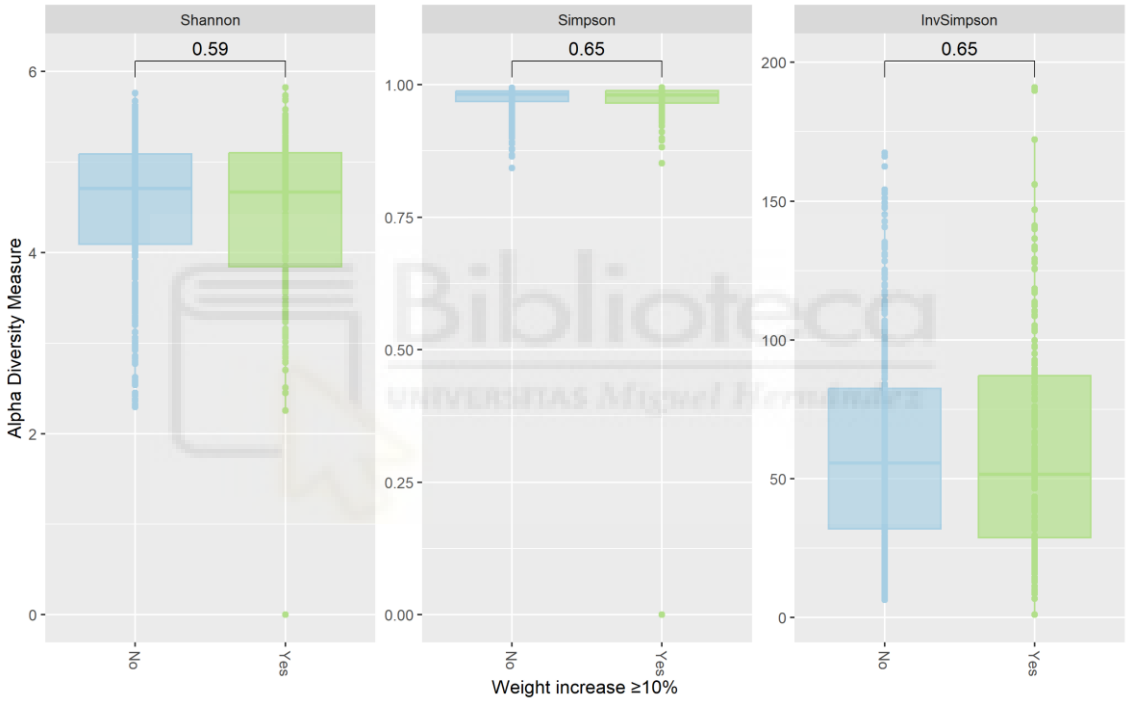


Figura 14: Alfa Diversidad según ganancia de peso. Extraida de García-Abellán J, García J et al (71)

Los resultados ajustados por covariables como edad, sexo, régimen de tratamiento antirretroviral, modo de transmisión HSH, actividad física, ingesta calórica total e IMC basal arrojaron resultados similares.

Se observaron cambios temporales en la alfa diversidad a lo largo del tiempo, pero sin diferencias significativas entre los índices iniciales y los de 96 semanas (figuras 15,16) .

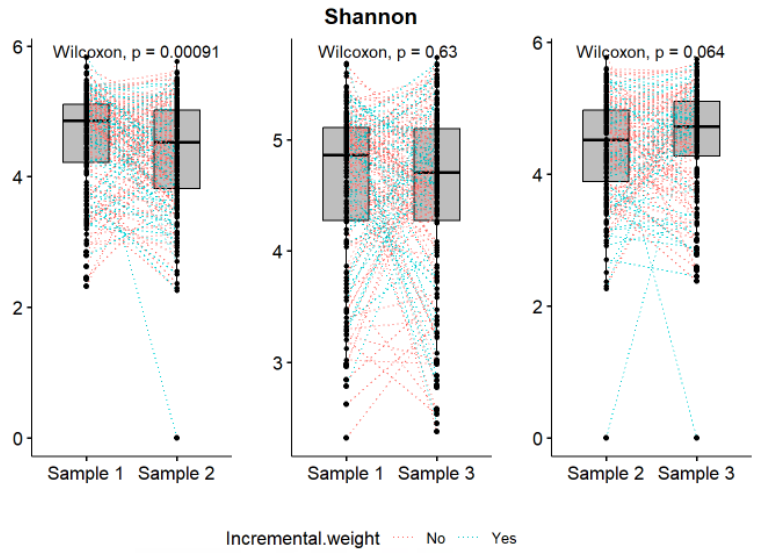


Figura 15: Alfa diversidad en las muestras. Extraida de García-Abellán J, García J et al (71)

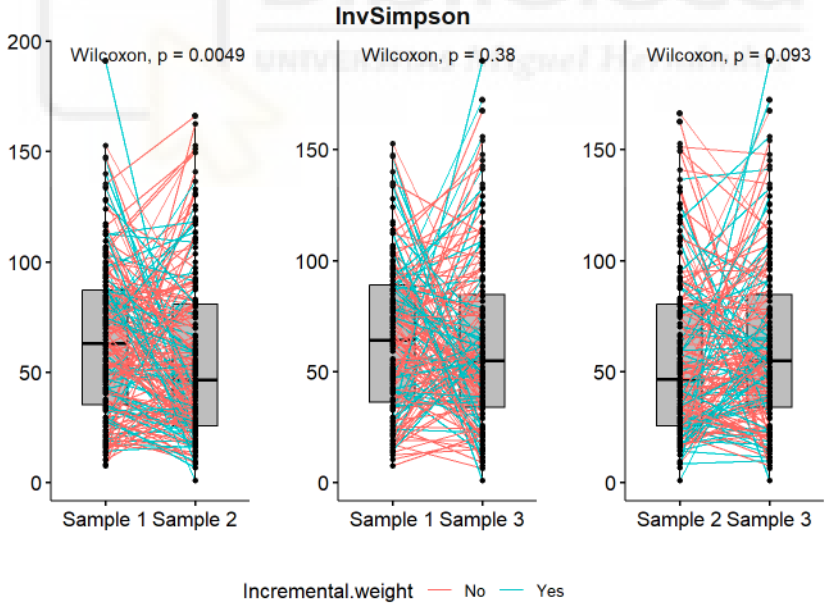


Figura 16: Alfa diversidad en las muestras. .Extraida de García-Abellán J, García J et al (71)

El análisis de la **beta diversidad** (Paso 3.2) utilizando PERMANOVA con la distancia de Bray-Curtis no reveló diferencias significativas en la composición global de la microbiota (p=0.24) entre los participantes con o sin aumento de peso significativo. La distribución de las muestras se visualiza mediante PCoA (70) en la Figura 17. Lo mismo ocurre cuando utilizamos unas distancias diferentes a la de Bray Curtis como Jaccard (p = 0.065, Figura 18 y Aitchison (p = 0.159, Figura 19).

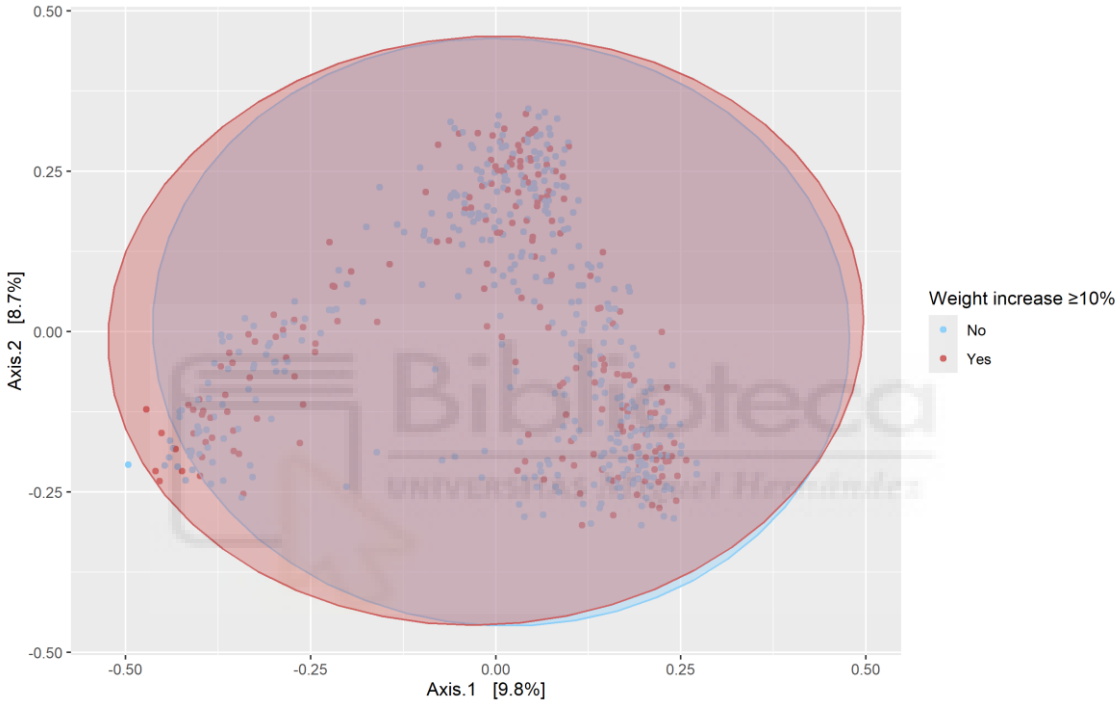


Figura 17: Beta Diversidad entre los participantes con o sin aumento de peso significativo. Extraida de García-Abellán J, García J et al (71)

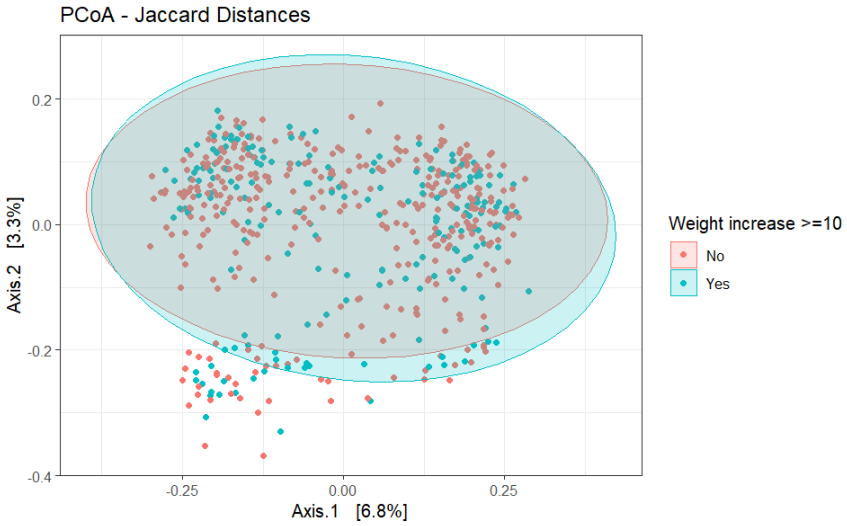


Figura 18: Gráficos de análisis de coordenadas principales (PCoA) basados en distancias de Jaccard. Extraida de García-Abellán J, García J et al (71)

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

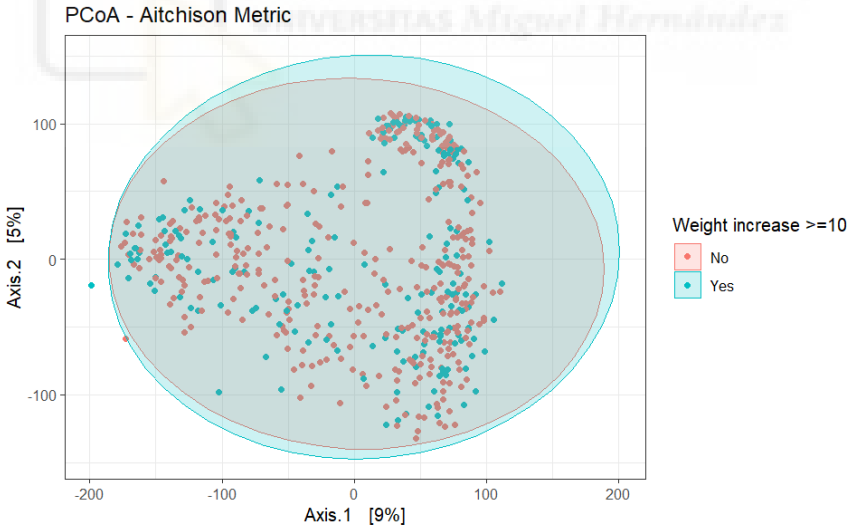


Figura 19: Gráficos de análisis de coordenadas principales (PCoA) basados en distancias de Aitchison. Extraida de García-Abellán J, García J et al (71)

El análisis de abundancia diferencial (ANCOM-BC2)(66) (Paso 3.4) se utilizó para identificar taxones bacterianos asociados con un aumento de peso significativo (≥10%) Figura 20.

En los modelos ajustados se encontraron asociaciones positivas con *Dialister* y *Tyzzerell*a_4 en el grupo con aumento de peso significativo. Por otro lado, se observí enriquecimiento de *Phascolarctobacterium* en participantes que no experimentaron un aumento de peso significativo.

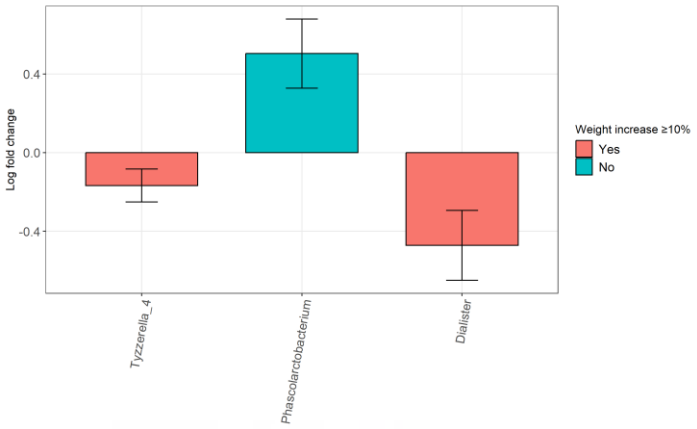


Figura 20: Taxones asociados con un aumento de peso >10% en el análisis de abundancia diferencial (ANCOM-BC2). Extraida de García-Abellán J, García J et al (71)

Los subanálisis con un umbral inferior de ganancia de peso (≥5%) identificaron asociaciones con *Lactobacillus* para el aumento de peso y con *Desulfovibrio* y *Roseburia* para el no aumento de peso (Figura 21).

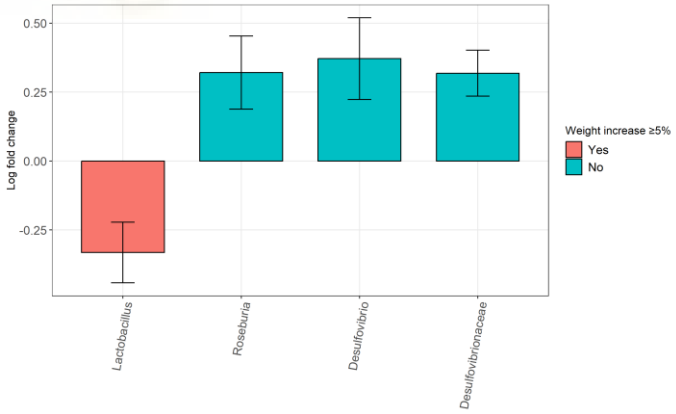


Figura 21: Taxones asociados con un aumento de peso >5% en el análisis de abundancia diferencial (ANCOM-BC2). Extraida de García-Abellán J, García J et al (71)

6.2.4 Composición del microbioma intestinal y regímenes de tratamiento antirretroviral

Se analizaron los taxones bacterianos relacionados con un aumento de peso significativo en base a la composición del régimen de tratamiento antirretroviral. Los regímenes basados en INSTI mostraron una abundancia relativa significativamente mayor de *Tyzzerella*_4 (0,05% vs. 0,02%, p=0,017) y *Lactobacillus* (0,29% vs. 0,22%, p=0,009) en comparación con los regímenes basados en NNRTI (Figura 22)

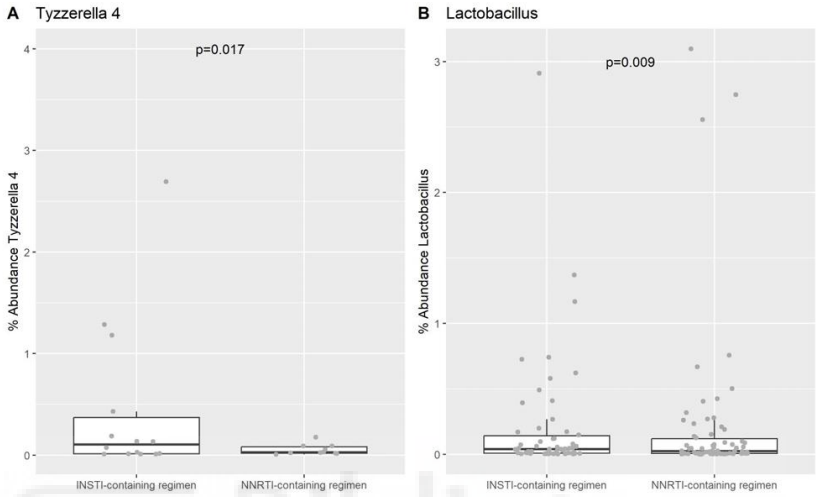


Figura 22: Abundancias relativas de taxones bacterianos asociados un aumento de peso significativo (>10%) según el régimen de tratamiento antirretroviral. Extraida de García-Abellán J, García J et al (71)

En un subanálisis estratificado por IMC, no se encontraron diferencias significativas en la abundancia de *Tyzzerella*_4 o *Lactobacillus* entre los participantes del INSTI con IMC normal y alto (figura 24).

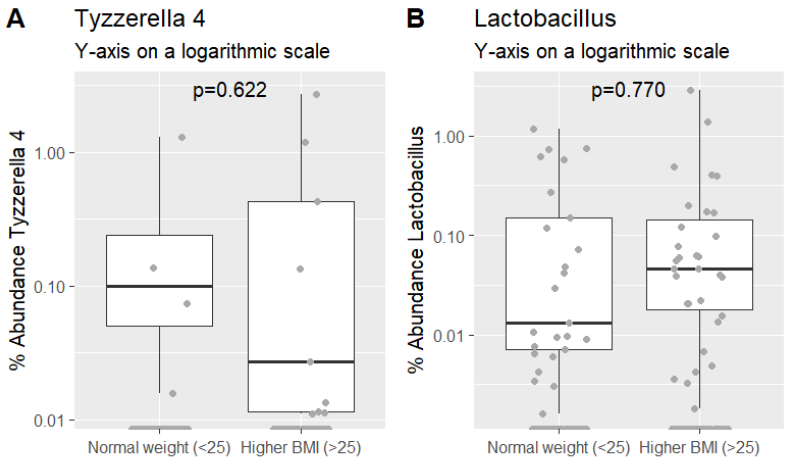


Figura 23: Abundancias relativas de taxones bacterianos asociados con un aumento de peso significativo (≥10%) en los participantes tratados con INSTI, estratificados por categoría de IMC (peso normal vs. IMC >25). Extraida de García-Abellán J, García J et al (71)

Los modelos ANCOM-BC2 (66) ajustados revelaron que **Tyzzerella_4 se asoció positivamente con los regímenes basados en INSTI**, acercándose a la significación estadística (p=0,098). Otros taxones enriquecidos en el grupo INSTI fueron *Eggerthella*, Brachyspira y *Atopobium*. En el grupo NNRTI, los géneros enriquecidos incluían *Catenibacterium*, *Coprococcus*_2, *Acidaminococcus*, *Methanobrevibacter* y *Ruminoclostridium*_6 y _9 (Figura 24).

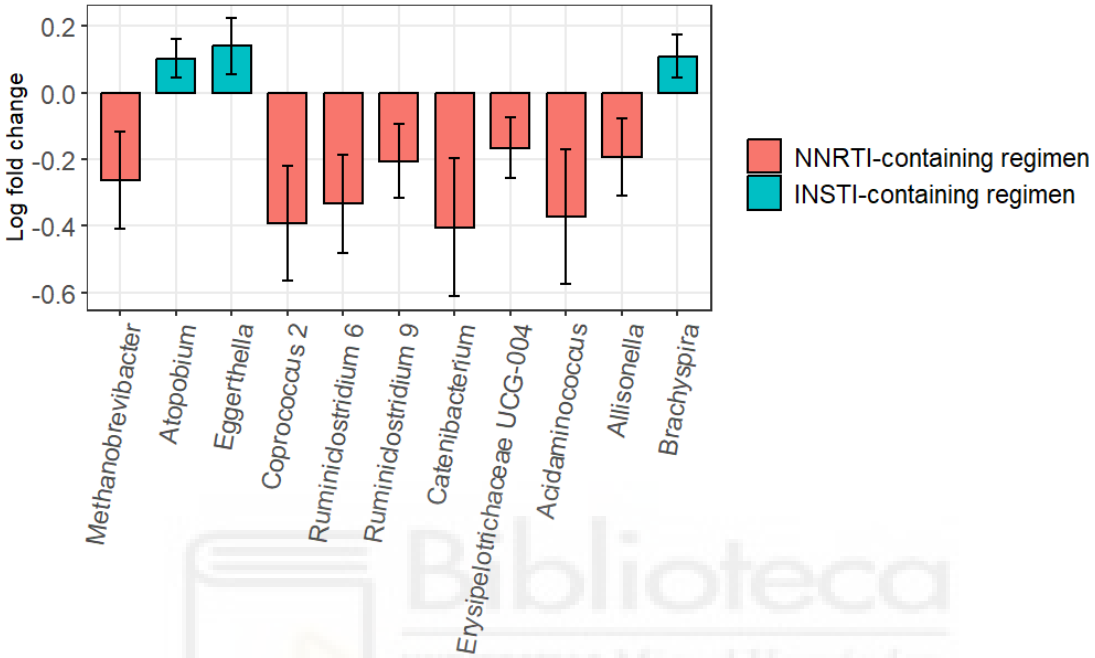


Figura 24: Análisis de abundancia diferencial (ANCOM-BC2) entre NNRTI e INSTI. Extraida de García-Abellán J, García J et al (71)

La abundancia de taxones bacterianos asociados con un aumento de peso significativo no difirió entre los regímenes que contenían TAF más INSTIs frente a INSTIs sin TAF, o TAF más INSTIs frente a TAF más NNRTIs. Según ANCOM-BC2 (66), los regímenes que contenían TAF más INSTIs mostraron una mayor abundancia de taxones *Ruminococcaceae*_UCG-013, *Ruminococcaceae*_004 y *Oscillospira* (figura 25) que los regímenes basados en INSTI sin TAF. No se identificaron diferencias significativas en la abundancia de taxones entre los grupos TAF más INSTIs y TAF más NNRTIs.

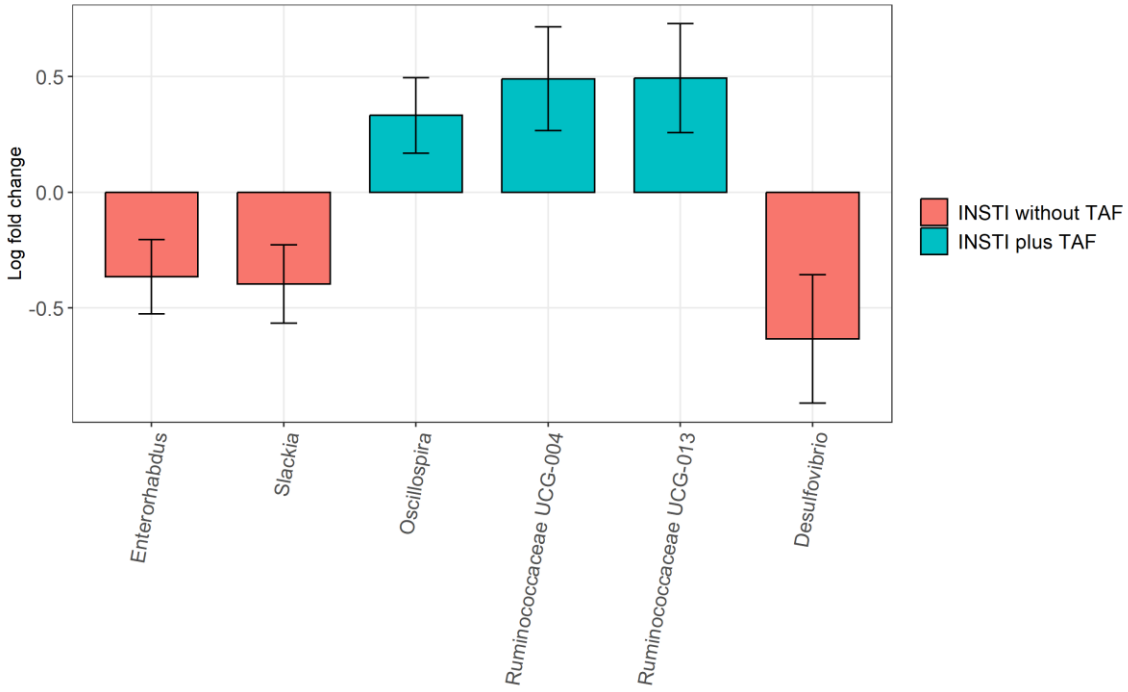


Figura 25: Análisis de abundancia diferencial (ANCOM-BC2) entre INSTI con y sin TAF. Extraida de García-Abellán J, García J et al (71)

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

7.-DISCUSIÓN

7.1 Discusión sobre el desarrollo y aplicación del protocolo de análisis bioinformático longitudinal de la microbiota intestinal

El presente estudio, reconociendo la complejidad intrínseca y la naturaleza dinámica de la microbiota intestinal en el contexto de la infección crónica por VIH, tuvo como objetivo específico el desarrollo de un protocolo de análisis riguroso que permitiera estudiar de manera detallada la composición de esta comunidad microbiana en personas con VIH virológicamente suprimidas y evaluar los posibles efectos de sus variaciones a lo largo del tiempo. Este protocolo no fue un fin en sí mismo, sino que se convirtió en una herramienta esencial y un marco metodológico sistemático para responder con eficacia a las preguntas de investigación y avanzar en la consecución del objetivo general del estudio, que buscaba analizar la influencia de la microbiota en la progresión de la aterosclerosis subclínica y el cambio de peso, así como el impacto del tratamiento antirretroviral.

La justificación para el desarrollo de este protocolo reside en la necesidad de enfrentar los desafíos analíticos propios de los datos del microbioma, que son particularmente complejos debido a su naturaleza composicional (26), su alta variabilidad tanto interindividual como intraindividual (11,12,19), su sobredimensión, y la dificultad para establecer relaciones causales directas(30). Además, el enfoque longitudinal del estudio, exigió el uso de métodos capaces de capturar y modelar adecuadamente esta dinámica.

El protocolo desarrollado se estructuró como una serie de pasos que integran técnicas bioinformáticas y estadísticas especializadas, adaptadas a las características particulares de los datos de secuenciación del gen 16S rRNA y al diseño longitudinal del estudio para extraer la máxima información de los datos.

Esta diseñado, por tanto, para analizar datos de microbioma en estudios longitudinales orientados a identificar diferencias en la composición microbiana entre dos grupos.

7.1.1 Paso 1: Análisis Descriptivo de las Variables Involucradas:

Se realizó un análisis descriptivo preliminar, en el que las variables continuas se describieron mediante medianas y percentiles 25-75 (Q1, Q3), con el fin de aumentar la robustez y minimizar la influencia de *outliers*. Este enfoque fue preferido sobre el uso de medias y desviaciones estándar, dado que raramente se cumplía la normalidad y los tamaños muestrales no nos permitían asumirla de forma asintótica con garantías.

Las variables categóricas se presentaron como porcentajes. Para las comparaciones entre grupos, se emplearon pruebas no paramétricas como la prueba t de Wilcoxon (o la t de Student si en algún caso se podía asumir la normalidad) para variables continuas, y la prueba de chi-cuadrado o exacta de Fisher para variables categóricas, según correspondiera.

7.1.2 Paso 2: Análisis Longitudinal de Datos:

Dado que los datos se recopilaron en múltiples momentos (visitas), se consideró fundamental repetir los análisis en cada punto temporal.

En virtud de esta naturaleza longitudinal, se estimaron Modelos Lineales Generalizados Mixtos (GLMMs) (60) debido a su capacidad para incorporar de manera eficaz la estructura temporal de los datos del microbioma (72)

Estos modelos han demostrado ser especialmente adecuados para este tipo de datos, dada su eficiencia en el manejo de la variabilidad y la complejidad asociadas(73–76)

Loss GLMMs (60,72) fueron, por tanto, la opción preferida para modelar la dependencia temporal inherente a las mediciones repetidas en los mismos sujetos, permitiendo la inclusión de efectos aleatorios que capturan tanto la variabilidad intraindividual como la interindividual (por ejemplo, considerando al paciente y/o la visita como efectos aleatorios). Este enfoque nos permitió abordar de forma efectiva la correlación y la heterogeneidad presentes en los datos, lo que contribuye a una mayor precisión en las estimaciones. En contraste, para los análisis transversales realizados en cada uno de los puntos temporales por separado, se utilizaron modelos GLMs (59) por su idoneidad en escenarios sin estructura de dependencia temporal.

7.1.3 Paso 3: Análisis del Microbioma:

Paso 3.1 Descriptivos:

Se calculó la abundancia media y la prevalencia de cada taxón utilizando la función taxa_sums del paquete phyloseq(65) del software R (58). Se tuvo en cuenta que los datos derivados de la secuenciación de alto rendimiento del microbioma son intrínsecamente composicionales (26), enfantizando que ignorar esta naturaleza puede llevar a resultados engañosos e impredecibles, por lo que fueron tratados como tal. La visualización de los taxones, por motivos de claridad, se limitó a los 20~50 más frecuentes, sin menoscabo de los pertinentes análisis de sensibilidad para comprobar que no se producía alguna variabilidad en la composición no esperada, y se realizó mediante diagramas de barras utilizando el comando plot_bar de la librería phyloseq (65),del software R (58)Esta representación se realizó para todos los niveles taxonómicos, aunque en los artículos no se incluyeron todas.

1. **Phylum (Filo)**: Agrupa organismos que comparten un conjunto de características comunes.
2. **Clase**: Subdivisión dentro de un phylum.
3. **Orden**: Subdivisión dentro de una clase.
4. **Familia**: Subdivisión dentro de un orden.
5. **Género**: Subdivisión dentro de una familia.
6. **Especie**: El nivel más específico de clasificación.

Biblioteca UNIVERSITAS Miguel Hernández

Paso 3.2 Análisis de la Beta Diversidad:

Análisis de Varianza Multivariante Permutacional (PERMANOVA)

La beta diversidad se refiere a la variación en la composición de especies entre diferentes comunidades o muestras. Es una medida clave para entender cómo cambian las comunidades biológicas en respuesta a distintos factores ambientales o condiciones experimentales. En el protocolo, para evaluar la beta diversidad, se utiliza el análisis PERMANOVA (20), que es un método para probar si dos o más grupos de objetos (muestras) son significativamente diferentes en su composición o estructura. Se calculó mediante el paquete vegan (62) de R.

La variación en la composición de especies entre las diferentes muestras se analizó mediante la técnica PERMANOVA (20). Se evaluaron distintas métricas de diversidad, tanto alfa como beta, dado que su elección puede influir significativamente en el poder estadístico de los estudios de microbioma (74).

Las matrices de disimilitud que se usaron fueron la distancia de Bray-Curtis (77) Jaccard (78), Aitchison (79) y UniFrac (80), empleando la función adonis del paquete vegan (62) de R(58).

La visualización de las *disimilitudes* entre muestras se llevó a cabo mediante Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) (70) que es preferido al Análisis de Componentes Principales (PCA) (81) ya que mientras que el PCA se basa en matrices de covarianza o correlación y asume distancias euclidianas, el PCoA (70) puede tomar cualquier matriz de disimilitud (no solo distancias euclidianas) y proyectar los puntos en un espacio euclidiano de baja dimensión, de modo que las distancias entre los puntos en este nuevo espacio se aproximaran lo mejor posible a las disimilitudes originales.

La representación se realizó utilizando el comando plot_ordination de la librería phyloseq (65), buscando reducir la dimensionalidad para facilitar la interpretación.

El análisis PERMANOVA tiene como ventajas:

- **Análisis Multivariado:** Permite el análisis simultáneo de múltiples variables, lo cual resulta particularmente útil en el estudio de la ecología microbiana. A diferencia de los métodos tradicionales que suelen enfocarse en una única variable, PERMANOVA (20) ofrece la capacidad de evaluar las diferencias en la composición de comunidades microbianas complejas, considerando varias variables al mismo tiempo. Esto es especialmente relevante en microbiología, donde las comunidades están influenciadas por una multitud de factores ambientales, genéticos y fisiológicos. El análisis PERMANOVA (20) emplea permutaciones para evaluar la significación de las diferencias observadas en la estructura comunitaria, lo que proporciona una mayor flexibilidad y precisión en la interpretación de datos

complejos y de alta dimensionalidad. Esta capacidad de manejar múltiples variables permite a los investigadores obtener una visión más integral de cómo diferentes factores pueden interactuar y afectar la composición de comunidades microbianas, favoreciendo así un entendimiento más completo de los ecosistemas microbiológicos.

- **No Asume Distribuciones Normales:** A diferencia del análisis de varianza tradicional (ANOVA), el PERMANOVA (20) no exige que los datos cumplan con el supuesto de normalidad en su distribución. Esta característica es especialmente pertinente en el campo de la microbiología, donde es común que los datos de abundancia de especies microbianas presenten sesgos y no sigan una distribución normal. Las comunidades microbianas suelen exhibir distribuciones altamente variables y asimétricas, debido a factores como la alta diversidad, la presencia de especies raras y la variabilidad ambiental. Al no depender de la normalidad de los datos, PERMANOVA (20) ofrece una ventaja significativa al permitir un análisis más preciso y confiable de la variación en la composición microbiana, sin las limitaciones impuestas por los métodos estadísticos tradicionales. Esto facilita la identificación de patrones y tendencias en los datos microbiológicos, proporcionando una herramienta poderosa para explorar la complejidad de los ecosistemas microbiológicos.
- **Flexibilidad con Diferentes Distancias:** Es una herramienta versátil que puede emplearse con diversas medidas de distancia, tales como Bray-Curtis (77), Jaccard (78), UniFrac, Aitchison (79) y UniFrac ponderado (80), entre otras. Esta flexibilidad permite que el análisis se adapte mejor a la naturaleza específica de los datos microbiológicos. La capacidad de utilizar diferentes métricas de distancia es crucial porque cada una de ellas ofrece una perspectiva única sobre las relaciones entre las muestras. Por ejemplo, la distancia de Bray-Curtis es particularmente útil para evaluar la disimilitud en función de la abundancia de especies, mientras que la distancia de Jaccard (78) se centra en la presencia o ausencia de especies. Por otro lado, las distancias UniFrac (80)(tanto la ponderada como la no ponderada) consideran la información filogenética, proporcionando una visión más profunda sobre las relaciones evolutivas entre las comunidades microbianas. Evaluar múltiples distancias es esencial porque permite capturar diferentes aspectos de la diversidad microbiana y elegir la métrica que mejor refleje las características biológicas y ecológicas de las muestras en estudio. Esta capacidad de adaptación se traduce en un análisis más robusto y exhaustivo, facilitando la interpretación de resultados y la obtención de conclusiones más precisas sobre las dinámicas y estructuras comunitarias en los ecosistemas microbiológicos.
- **Robustez ante Desigualdades en la Varianza:** El análisis PERMANOVA (20) ofrece una ventaja significativa al ser menos sensible a las desigualdades en la varianza

entre grupos, una situación común en los estudios de microbiota, debido a la diversidad intrínseca y las diferencias en la abundancia de especies entre diferentes muestras o condiciones experimentales.

- **Interpretación de Resultados:** Los resultados de PERMANOVA (20) son fáciles de interpretar, ya que proporcionan un valor p que indica si hay diferencias significativas entre los grupos analizados.
- **Permutaciones:** El análisis PERMANOVA (20)utiliza permutaciones para calcular la significación estadística, lo cual mejora la validez de los resultados frente a métodos paramétricos que podrían no ser adecuados para datos que no siguen una distribución normal. Una permutación, en este contexto, implica reorganizar aleatoriamente los datos de las muestras entre los grupos, y luego recalcular la estadística de prueba para cada una de estas configuraciones aleatorias. Este proceso se repite muchas veces, generando una distribución de la estadística bajo la hipótesis nula de que no hay diferencias entre los grupos. Al comparar el valor de la estadística observada con esta distribución permutada, se puede determinar la probabilidad de obtener un resultado igual o más extremo simplemente por azar. Este enfoque no paramétrico es particularmente ventajoso para el análisis de datos microbiológicos, ya que estos datos frecuentemente no cumplen con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza requeridos por los métodos paramétricos tradicionales. Al depender de la permutación, ofrece una evaluación más flexible y precisa de la significancia estadística, permitiendo extraer conclusiones más confiables sobre las diferencias en la composición de comunidades microbianas entre distintos grupos o condiciones experimentales.
- **Aplicable a Diseños Complejos:** Puede ser utilizado en diseños experimentales complejos, incluyendo factores múltiples y anidamientos, lo que lo hace versátil para diferentes tipos de estudios en microbiología.
- **Análisis de Variabilidad:** Permite descomponer la variabilidad en la composición de la microbiota en componentes atribuibles a diferentes factores, lo que ayuda a identificar fuentes de variación.

Esquemáticamente podemos ver las ventajas e inconvenientes del PERMANOVA en la tabla 10.

Tabla 10: Ventajas e inconvenientes del PERMANOVA (Confección propia)

MÉTODO	VENTAJAS	INCONVENIENTES
FRECUENCIAS RELATIVAS (COMPOSICIONALES)	- Comparación de composiciones. - No requiere distribuciones normales. - Flexibilidad en la medida de distancia (ej. Bray-Curtis).	- El efecto de la composición puede llevar a sesgos. - Interpretación más compleja. - Los datos faltantes pueden afectar la robustez. - Puede ser menos informativo si las abundancias son muy bajas.
FRECUENCIAS ABSOLUTAS	- Reflejo real de la abundancia. - Menos problemas de composición. - Permite un análisis directo de la varianza multivariada.	- La distribución de los datos puede no ser normal, afectando la validez. - Una variabilidad grande puede influir en los resultados. - Un tamaño de muestra pequeño puede llevar a conclusiones engañosas. - La interpretación puede ser complicada si hay especies dominantes.

Visualización de resultados análisis de coordenadas principales (PCoA):

Los resultados se pueden complementar con gráficos de dispersión como los obtenidos con el PCoA (70). El PCoA es una técnica estadística multivariada utilizada para explorar y visualizar similitudes o disimilitudes en datos de alta dimensionalidad. Es especialmente útil en ecología y microbiota, donde se estudian relaciones entre muestras basadas en sus composiciones complejas.

- Utiliza una matriz de distancias entre muestras, permitiendo el uso de diversas medidas lo que lo hace flexible para diferentes tipos de datos.
- Reduce la complejidad de los datos, permitiendo una visualización en un espacio de menor dimensión, capturando la mayor variación posible.
- Representa los resultados en gráficos bidimensionales o tridimensionales, donde la cercanía entre puntos refleja similitud.
- Los ejes identifican patrones de agrupamiento y variabilidad, aunque no tienen una interpretación directa.
- Utilizado en ecología, genética y microbiología para visualizar diferencias en comunidades bajo distintas condiciones.
- Adecuado para datos no paramétricos.
- Ideal para datos obtenidos de secuenciación de microbiota.
- Identifica agrupamientos y variabilidad.

Paso 3.3 Análisis de la Alfa Diversidad:

Para una caracterización completa de la diversidad alfa de la microbiota intestinal en este estudio, se ha optado por el uso de tres índices ampliamente reconocidos en ecología que son la riqueza de especies, el Índice de Shannon(63) y el Índice de Simpson (64).

Esta selección múltiple se justifica por el hecho de que cada índice captura un aspecto distinto de la estructura de la comunidad, proporcionando una visión más exhaustiva que la obtenida mediante la aplicación de un único estimador, utilizar solo uno podría dar una imagen incompleta o sesgada. (82).

Estos índices se calcularon para cada muestra en cada visita, y los resultados se visualizaron preferentemente con gráficos de tipo *box-plot*(83).

Se evaluaron las diferencias significativas entre categorías mediante pruebas de permutación (20) que permiten evaluar diferencias en la diversidad sin depender de supuestos normales.

Las gráficas se realizaron utilizando el comando plot_richness de la librería phyloseq(65) de R.

Paso 3.4 Análisis de la Abundancia Diferencial:

En el análisis de abundancia diferencial de datos de microbioma, la naturaleza composicional inherente y la presencia de diversos sesgos pueden comprometer la validez de las inferencias, por ello se empleó la técnica de análisis de composiciones de microbiomas con corrección de sesgo (ANCOM-BC2)(66), una versión ampliada y perfeccionada de ANCOM-BC(84), cuyas características son las siguientes:

- **Corrección de sesgo:** Esta técnica ofrece una metodología avanzada que no solo estima, sino que también corrige diversos tipos de sesgos que pueden afectar la precisión y validez de los resultados en el análisis de datos de microbiomas. En particular, esta técnica aborda los sesgos específicos de la muestra, conocidos como fracción de muestreo, y los sesgos específicos del taxón, referidos como eficiencia de secuenciación.
- **Regularización de la varianza:** La metodología empleada en ANCOM-BC2(66) se inspira en el análisis de significancia de microarrays (SAM), desarrollado por Tusher, Tibshirani y Chu en 2001 (85), para mejorar la robustez estadística de las pruebas realizadas. En particular, se introduce una pequeña constante positiva en el denominador del estadistico de prueba de ANCOM-BC2(66) correspondiente a cada taxón. Esta adición es crucial para prevenir la aparición de significación espuria que pudiera resultar de errores estándar extremadamente pequeños, un problema que es especialmente relevante en el caso de taxones raros.
- **Análisis de sensibilidad para la adición de pseudo-recuentos:** Al igual que otros métodos de análisis de abundancia diferencial, ANCOM-BC2 (66)aplica una transformación logarítmica a los recuentos observados. La presencia de recuentos cero representa un desafío considerable, y a menudo se opta por añadir un pseudo-recuento. Sin embargo, la elección del pseudo-recuento puede influir en los resultados, conduciendo a una tasa inflada de falsos positivos (86,87). Para abordar este problema, se lleva a cabo un análisis de sensibilidad con el propósito de evaluar el impacto de diferentes pseudo-recuentos sobre los recuentos cero para cada taxón.
- **Comparaciones multigrupo y mediciones repetidas:** La metodología ANCOM-BC2 (66) extiende ANCOM-BC (67) para múltiples grupos y mediciones repetidas. En el contexto de comparaciones múltiples por pares, es fundamental considerar la tasa de falsos descubrimientos direccionales mixtos (mdFDR). La tasa global de falsos descubrimientos se controla mediante la metodología mdFDR adoptada de las investigaciones de Guo, Sarkar y Peddada (2010) (88), así como de Grandhi, Guo y Peddada (2016) (89).

Este método ha demostrado una superioridad notable frente a otras aproximaciones:

- Mejor capacidad para abordar de manera explícita la composicionalidad de los datos y para corregir sesgos tanto a nivel de muestra (p. ej., diferencias en la profundidad de secuenciación) como a nivel de taxón (p. ej., variaciones en la eficiencia de secuenciación),
- Mejor regularización de la varianza inspirada en SAM por lo que mejora la robustez estadística
- Inclusión de un análisis de sensibilidad para la adición de pseudo-recuentos (crucial para manejar los ceros en los datos log-transformados sin inflar falsos positivos.
- Capacidad para realizar comparaciones multigrupo y con mediciones permitiendo así inferencias más precisas sobre los cambios en las abundancias absolutas.

Estudios de simulación y comparaciones a gran escala han validado esta robustez, indicando que ANCOM-BC/ANCOM-BC2 produce resultados más consistentes y un mejor control de la tasa de falsos descubrimientos en comparación con otros métodos (90)(Nearing et al., 2022). La capacidad de estos métodos para manejar las características únicas de los datos de microbioma los posiciona como una elección metodológica preferente para el análisis de abundancia diferencial (21) (Lutz et al., 2022).

El análisis se realizó utilizando el paquete ANCOMBC o ANCOM en R y se ajustó por covariables relevantes. Se aplicaron parámetros de filtrado estándar, como un umbral de prevalencia del 5% y un umbral de tamaño de librería de 200, para mejorar la robustez.

Paso 3.5 Ajuste del Cálculo Mediante Técnicas de Emparejamiento:

Para controlar los sesgos en este estudio observacional, se utilizó la técnica de emparejamiento por índice de propensión (propensity score matching)(91).

El índice de propensiónes una técnica estadística que estima la probabilidad de que una unidad (como un individuo o una muestra) reciba un tratamiento dado, condicionada a un conjunto de covariables observadas. Esta probabilidad se estima utilizando modelos estadísticos, como la regresión logística, y su objetivo principal es equilibrar las covariables entre los grupos de tratamiento y control. Esto permite que los grupos se asemejen más a un experimento aleatorizado, reduciendo el sesgo de confusión y facilitando la evaluación del efecto causal de los tratamientos.

Este método se ha aplicado con éxito en numerosos estudios relacionados con la microbiota en distintos contextos como cáncer, VIH y aterosclerosis entre otros (92–97) , y fortalece la validez interna de los hallazgos en la investigación de la microbiota.

Se seleccionó debido a su facilidad de implementación, su robusto control de sesgos, y su capacidad para manejar un gran número de variables (91). Para llevar a cabo este análisis, emplearemos la librería *MatchIt* (98) en R, utilizando el método de selección del vecino más cercano *(Nearest Neighbor Matching).* Este método consiste en emparejar cada unidad del

grupo de tratamiento con la unidad del grupo de control que tenga el índice de propensiónmás cercano. Este proceso puede realizarse con o sin un "*caliper*".

Las ventajas del método incluyen su simplicidad y eficiencia, ya que utiliza toda la información disponible para encontrar el mejor emparejamiento. Sin embargo, presenta desventajas, como la sensibilidad a la elección de la distancia, lo que podría resultar en emparejamientos no óptimos si hay unidades con puntajes de propensión muy diferentes. Por esta razón, se probaron diferentes métricas de distancia como:

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

- **Distancia Euclidiana**:
    - **Uso**: Cuando las variables utilizadas para calcular el índice de propensiónestán en escalas similares.
    - **Ventajas**: Fácil de calcular e interpretar, especialmente útil cuando las variables no están altamente correlacionadas.
    - **Limitaciones**: Sensible a la escala de las variables, puede no ser ideal si hay variables con varianza muy diferente.
- **Distancia Manhattan**:
    - **Uso**: Cuando se busca reducir el impacto de grandes diferencias en una sola variable.
    - **Ventajas**: Más robusta frente a valores atípicos en comparación con la distancia euclidiana.
    - **Limitaciones**: Puede ser menos efectiva si las variables tienen escalas muy distintas.
    - **Distancia Mahalanobis**:
    - **Uso**: Adecuada cuando las variables tienen diferentes escalas o están correlacionadas.
    - **Ventajas**: Considera la varianza y la correlación entre variables, proporcionando una medida ajustada.
    - **Limitaciones**: Requiere una buena estimación de la matriz de covarianza, lo que puede ser problemático con tamaños de muestra pequeños.
- **Distancia de Hamming**:
    - **Uso**: Principalmente para datos categóricos binarios, donde las variables son de tipo presencia/ausencia.
    - **Ventajas**: Simple y directa para variables binarias.
    - **Limitaciones**: No es adecuada para datos continuos o donde las diferencias de magnitud son importantes.
- **Distancia Coseno**:
    - **Uso**: Cuando la magnitud de las variables no es relevante y se desea medir la similitud en términos de dirección o patrón.
    - **Ventajas**: Útil para comparar la similitud de patrones más que la magnitud de las diferencias.
    - **Limitaciones**: No considera las diferencias en magnitud, solo la orientación, lo cual puede no ser apropiado en todos los contextos de PSM.

Las covariables consideradas para el ajuste incluyeron edad, sexo, comportamiento sexual HSH, IMC basal, composición del régimen antirretroviral (basado en INSTI, basado en

NNRTI, conteniendo TAF), ingesta calórica diaria y actividad física. El objetivo era evaluar la consistencia de la alfa diversidad independientemente de estas variables. Se empleó la librería MatchIt (98) en R utilizando el emparejamiento por Vecinos Más Cercanos (Nearest Neighbor Matching).

La implementación de un caliper en el contexto del análisis del índice de propensión representa una estrategia metodológica fundamental que optimiza sustancialmente la calidad y precisión del emparejamiento entre los grupos de tratamiento y control. Este parámetro metodológico establece un umbral máximo admisible para la diferencia en los puntajes de propensión entre las unidades emparejadas, contribuyendo así a minimizar el sesgo potencial en las estimaciones y fortalecer la validez interna del estudio. En el ámbito de la investigación empírica, se adopta con frecuencia un valor de caliper de 0.1, lo que implica que únicamente se consideran válidas aquellas parejas donde la discrepancia en el índice de propensiónno excede dicha magnitud. La determinación de este umbral específico surge de un cuidadoso equilibrio entre la rigurosidad del emparejamiento y el mantenimiento de un tamaño muestral estadísticamente significativo, siendo susceptible de ajuste en función de las particularidades del estudio, los objetivos de investigación establecidos y el grado de pérdida muestral que se considere metodológicamente aceptable en el contexto específico del análisis.

Se estableció un límite o umbral (caliper) de 0.05 para restringir los emparejamientos (solo se emparejaron individuos cuyos indices de propensión que diferían en 0.05 o menos) y se probaron diferentes métricas de distancia siendo finalmente la distancia euclídea la seleccionada.

En conjunto, el protocolo desarrollado, que abarcó desde la estandarización de la recolección de muestras hasta la aplicación de análisis bioinformáticos y estadísticos avanzados, proporcionó el marco necesario para explorar las relaciones entre la microbiota intestinal, estudiada longitudinalmente, y los resultados clínicos en PCVIH. La aplicación de este protocolo permitió generar hallazgos significativos sobre las firmas microbianas asociadas con la progresión de la aterosclerosis y el aumento de peso, sentando una base metodológica sólida para futuros estudios en este campo.

7.2 Distinct gut microbiota signatures associated with progression of atherosclerosis in people living with HIV

Este estudio es el primero en explorar prospectivamente las asociaciones longitudinales entre la progresión del cIMT y la dinámica de la composición de la microbiota intestinal PCVIH. Nuestros hallazgos demuestran que la composición de la microbiota intestinal experimenta cambios sutiles a lo largo del tiempo en PCVIH con supresión virológica y en tratamiento antirretroviral (TAR). Si bien somos conscientes de la posible participación de múltiples factores no medidos, nuestro estudio identificó diferencias en los perfiles del microbioma intestinal en individuos con VIH en relación con la progresión de la aterosclerosis. En este sentido, identificamos una firma distintiva de la microbiota intestinal consistentemente ligada a la progresión del cIMT.

La dinámica temporal de la microbiota intestinal en PCVIH con infección crónica es un área poco explorada. Existen pocos estudios longitudinales y, exceptuando las intervenciones orientadas a modificar su composición (99), las investigaciones se han centrado en escenarios específicos, como la infección aguda (32), el inicio de un tratamiento antirretroviral (33) o los controladores virémicos tras interrupción del TAR en el marco de la evaluación de una estrategia de "kick and kill" (100).

Nuestro estudio revela que la composición de la microbiota intestinal, en PCVIH con TAR estable presenta cambios de baja magnitud, tanto a nivel intraindividual como interindividual con el tiempo. La diversidad alfa (α-diversidad), que se refiere al número y la abundancia de los taxones bacterianos, no mostró diferencias entre los grupos con o sin progresión del cIMT a lo largo de las visitas del estudio. Este hallazgo está en línea con lo observado en estudios transversales previos en PCVIH respecto a la presencia de placa carotídea o enfermedad coronaria. (101,102).

Durante los dos años de investigación, la microbiota intestinal presentó cambios sutiles en la diversidad alfa, sin diferencias significativas entre los grupos con o sin progresión de cIMT. De manera similar, aunque no se observaron alteraciones sustanciales generales en la composición de la microbiana intestinal durante el seguimiento, sí se produjeron modificaciones en las abundancias relativas a nivel de filo, familia y género, manteniendo las mismas tendencias en los dos grupos, definidos por la progresión del cIMT.

Hasta donde sabemos, ninguna investigación anterior había analizado de manera prospectiva las características de la composición longitudinal del microbioma intestinal relacionadas con la aterogénesis. Aunque la evidencia emergente apunta a una probable implicación de la microbiota intestinal en la aterosclerosis y las enfermedades cardiovasculares (103,104), la relación del microbioma con la progresión de la aterosclerosis en las PCVIH sigue siendo en gran parte desconocida (105). La literatura científica que

examina el papel de la microbiota en las enfermedades cardiovasculares en la población con VIH se ha limitado principalmente a asociaciones transversales (105–109)

La evaluación de la composición de la microbiota intestinal vinculada a la progresión de la aterosclerosis posibilita la identificación de firmas específicas. Estas firmas pueden predecir un riesgo elevado de futuros resultados adversos, como la formación de placa carotídea o la ocurrencia de eventos cardiovasculares.

Al considerar la diversidad interindividual o beta (β), observamos diferencias significativas entre las PCVIH que experimentan progresión de cIMT y aquellas que no. Nuestros resultados difieren de los estudios transversales(102,110) en los que no se encontraron diferencias en la diversidad beta en relación con la presencia de enfermedad coronaria o placas carotídeas.

Más allá de las diferencias en el diseño del estudio, las características de los pacientes y los resultados medidos, nuestro estudio identificó un subconjunto de PCVIH con menor riesgo cardiovascular, como lo demuestra la ausencia de progresión del cIMT. Esta caracterización podría haber contribuido a amplificar las divergencias en la composición taxonómica general entre los dos grupos.

Nuestro estudio muestra que la progresión de la aterosclerosis se asoció tentativamente con una firma diferencial consistente en un enriquecimiento de las bacterias *Agathobacter, Ruminococcus 2, Parasutterella* y *Bilophila*, y una reducción en la presencia de *Prevotella 7*.

Se seleccionó una cohorte de participantes virológicamente suprimidos sin antecedentes de enfermedad cardiovascular en tratamiento antirretroviral estable.

Las asociaciones con *Agathobacter, Ruminococcus 2 y Prevotella 7* se confirmaron en visitas sucesivas al estudio. Esto se mantuvo incluso después de ajustar por los factores de riesgo cardiovascular tradicionales y el peso, lo que refuerza la fiabilidad de nuestros resultados. El género *Agathobacter*, una bacteria anaerobia grampositiva de la familia *Lachnospiraceae* y el filo *Firmicutes*, ha arrojado hallazgos no concluyentes con respecto al riesgo cardiovascular en estudios transversales. *Firmicutes*, uno de los filos predominantes en nuestra microbiota intestinal, juega un papel crucial en el desarrollo de un sistema inmunitario que funcione de manera óptima (111).

Los estudios sobre *Agathobacter* han revelado correlaciones positivas con citocinas proinflamatorias como la interleucina 2 y la interleucina 8 (112), y con el síndrome respiratorio agudo asociado a coronavirus SARS-CoV-2 (113) , junto con asociaciones inversas con diabetes mellitus (114) y calcificación del arco aórtico (115).

Ruminococcus 2 también es un microbio intestinal anaeróbico grampositivo de la familia *Lachnospiraceae* y del filo *Firmicutes*. El género *Ruminococcus* en el microbioma anal e intestinal se ha vinculado con la infección por VIH (116) y con biomarcadores de inflamación

y translocación bacteriana, como el lipopolisacárido (117). Resulta interesante destacar que *Ruminococcus, Ruminococcus 2* y el metabolismo de los glicerofosfolípidos han sido vinculados tanto a la enfermedad cardiovascular como a la progresión de la enfermedad arterial coronaria en la población general (118–120) .

Además, en un estudio realizado en mujeres, se identificó a *Ruminococcus* no solo como uno de los géneros predominantes asociados con el VIH sino también como uno de los principales géneros bacterianos que contribuyen a la vía del metabolismo de los glicerofosfolípidos de la microbiota intestinal (121). Por el contrario, investigaciones adicionales respaldan las propiedades antiinflamatorias de *Ruminococcus*, ya que estimula la producción de ácidos grasos de cadena corta que mitigan la inflamación al modular la producción de citocinas por parte de las células inmunitarias (122). Se ha reportado que *Ruminococcus* tiene una correlación inversa con los marcadores de inflamación/activación inmune (123)y que está disminuido en la infección crónica por VIH (123). Los participantes que no mostraron progresión de cIMT mostraron un enriquecimiento del género *Prevotella*, que pertenece al filo *Bacteroidetes*. En un estudio alemán de PCVIH, *Prevotella* mostró un fuerte vínculo negativo con la enfermedad coronaria (101). *Prevotella* también se ha asociado con niveles más altos de células T CD4 (124), y una mayor abundancia de *Prevotella* en las PCVIH que recibieron INSTIs (125) o después de cambiar a raltegravir (126) . Por el contrario, se encontró un enriquecimiento de *Prevotella 2* y *Prevotella 7* en individuos con alto riesgo cardiovascular (127)

Investigaciones experimentales corroboran que los niveles elevados de *Prevotella* están relacionados con una mayor inflamación de la mucosa impulsada por las células T colaboradoras de tipo 17 (Th17), lo que resulta en la propagación de mediadores inflamatorios, bacterias y productos bacterianos a través de la circulación sistémica, lo que podría influir en la progresión de enfermedades sistémicas (128). Además, se ha descrito un papel potencial de *Prevotella* en la disfunción inmune en PCVIH a través de la desregulación de las vías del interferón tipo I en la mucosa intestinal y la respuesta de las células T (129).

Las PCVIH tienen un riesgo elevado de enfermedad cardiovascular incluso en la era actual, a pesar del uso generalizado de la terapia antirretroviral y el aumento del uso de estatinas (130). Dado que los beneficios generales de abordar los factores de riesgo cardiovascular tradicionales pueden estar estancándose, es necesario explorar nuevos factores y estrategias para reducir este riesgo adicional.

Si nuestros hallazgos fueran validados, la identificación de una firma de microbiota relacionada con la progresión de la aterosclerosis podría permitir la detección de personas con mayor riesgo incluso antes de que el evento se manifieste. Adicionalmente, este perfil microbiano podría consolidarse como un objetivo novedoso para desarrollar estrategias preventivas destinadas a modular el microbioma intestinal en el futuro. No obstante, hasta

la fecha, no hay datos que respalden la eficacia de ninguna intervención dirigida al microbioma intestinal para la prevención de enfermedades cardiovasculares. Por lo tanto, los beneficios potenciales de tales intervenciones siguen siendo especulativos.

El estudio tiene limitaciones, entre ellas la variabilidad intraindividual debida a la dieta y a las influencias ambientales no fue considerada para el presente análisis. Asimismo, no se recogieron datos sobre el control preciso de los factores de riesgo cardiovascular durante el estudio.

Nuestros resultados no serían generalizables a todas las personas con VIH debido a los criterios de inclusión. Utilizamos una definición operativa arbitraria de la progresión cIMT; sin embargo, las características demográficas y metabólicas de los participantes de cada grupo apoyan la fiabilidad de la clasificación. Además, una definición más estricta de la progresión del cIMT (≥25%) arrojó hallazgos similares a los principales.

Si bien nuestros resultados sobre el perfil de la microbiota y la progresión de la aterosclerosis son meramente asociativos, y los resultados observados en la microbiota pueden ser reactivos en lugar de causales, los hallazgos observados en taxones específicos como *Agathobacter, Ruminococcus 2, Parasutterella y Bilophila* (asociados al enriquecimiento) o *Prevotella 7* (asociado a la depleción) abren la puerta a la investigación de los mecanismos subyacentes, que podrían incluir la producción diferencial de metabolitos microbianos. Por ejemplo, se ha demostrado que el propionato de imidazol (ImP), un metabolito derivado de la microbiota, es un impulsor directo y significativo de la aterosclerosis a través de la activación de vías inflamatorias en células mieloides (131). Este tipo de evidencia, que establece una relación causal entre un metabolito microbiano específico y la progresión de la enfermedad, refuerza la necesidad de investigar las vías funcionales de los taxones que identificamos. Futuros estudios podrían explorar si las firmas microbianas que encontramos se correlacionan con la producción de metabolitos pro-aterogénicos como el ImP, lo que ofrecería una comprensión más profunda de la interacción entre el metabolismo de la microbiota y el huésped en la aterogénesis en PCVIH.

La principal fortaleza del estudio radica en la metodología empleada, que incluye un diseño longitudinal prospectivo con muestreo consecutivo de heces y mediciones de cIMT, así como la inclusión de un gran número de participantes. El ajuste multivariante de los factores de riesgo cardiovascular tradicionales en los análisis de la relación entre la composición de la microbiota y la progresión del cIMT, la inclusión de un número considerable de muestras de heces obtenidas secuencialmente y la identificación de las firmas de la microbiota asociadas sistemáticamente a la progresión de la aterosclerosis en diversos momentos contribuyen a la solidez de los resultados obtenidos.

En conclusión, dentro del ecosistema dinámico de la microbiota intestinal en PCVIH, la composición microbiana difiere según la progresión de la aterosclerosis subclínica. Nuestros

resultados ayudan a ampliar la comprensión de la interacción entre la aterosclerosis y la microbiota.

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

7.3 Gut microbiota and weight gain in people with HIV on integrase inhibitors: a five-year longitudinal study

Este estudio ofrece nuevas perspectivas sobre la compleja interacción entre la composición de la microbiota intestinal y el aumento de peso en PCVIH que reciben terapia antirretroviral.

Nuestro estudio identificó cambios taxonómicos sutiles relacionados con un aumento de peso significativo (≥10%). Asimismo, observamos una mayor prevalencia de taxones bacterianos asociados a la disfunción metabólica y al incremento de peso en las personas tratadas con inhibidores de la integrasa (INSTI). Estos cambios en la composición taxonómica, si bien tuvieron un tamaño de efecto modesto (LFC < 0.5), resultaron estadísticamente significativos y pueden contribuir a mejorar nuestro conocimiento de los mecanismos subyacentes a las variaciones de peso relacionadas con el TAR.

El aumento de peso en nuestra cohorte se caracterizó por una mayor abundancia de *Tyzzerella_4* y *Dialister*, mientras que *Phascolarctobacterium* se encontró enriquecido en individuos sin cambios de peso significativos, en comparación con aquellos con un aumento de peso ≥10%. De manera similar, un aumento de peso moderado (≥5%) se asoció con una mayor abundancia de *Lactobacillus* y una menor abundancia de *Desulfovibrio*. Estos hallazgos se alinean con la evidencia previa sobre los roles metabólicos de estos taxones. Específicamente, *Tyzzerella_4* (familia *Lachnospiraceae*, filo *Firmicutes*) y *Dialister* (familia *Veillonellaceae*, filo *Firmicutes*) se han implicado en la desregulación metabólica impulsada por la inflamación y en los resultados relacionados con la obesidad, lo que sugiere su papel en la mejora de la captación de energía y la acumulación de grasa (132,133). El *Lactobacillus* (familia *Lactobacillaceae*, filo *Firmicutes*) muestra una relación específica del huésped o bidireccional con la regulación del peso. En este estudio, *Lactobacillus* fue más abundante en individuos con aumentos de peso moderados, un hallazgo coherente con observaciones previas que habían comunicado su asociación con disfunción metabólica y aumento de peso en PCVIH (134). *Bifidobacterium*, otro género bacteriano anaeróbico y acidificante con una relación bidireccional con el peso, también ha sido vinculado con un elevado IMC en PCVIH (135). Por el contrario, *Phascolarctobacterium*, conocido por sus propiedades antiinflamatorias y su producción de ácidos grasos de cadena corta, podría mitigar el aumento de peso al promover la resiliencia metabólica, entendida como la capacidad de mantener una homeostasis metabólica estable lo que incluye niveles de glucosa, perfil lipídico, riesgo cardiovascular y regulación del peso corporal (136)

En paralelo con estos hallazgos taxonómicos, observamos una disminución en la diversidad alfa (α) a lo largo del tiempo entre los participantes que experimentaron un aumento sustancial de peso corporal. Sin embargo, los análisis de diversidad beta (β), utilizando las

métricas de distancia de Aitchison , Bray-Curtis y Jaccard, no revelaron diferencias significativas en la estructura general de la comunidad microbiana en los distintos momentos. Incluso después de estratificar por el estado de aumento de peso, no se observaron cambios composicionales significativos. Estos hallazgos sugieren que la composición taxonómica más amplia de la microbiota intestinal se mantuvo relativamente estable, lo que subraya la posible relevancia de cambios tempranos y sutiles en la diversidad microbiana más allá de alteraciones estructurales más pronunciadas.

Asimismo, se observaron perfiles de microbiota diferenciados entre los participantes que seguían regímenes basados en INSTI y aquellos basados en NNRTI. Los participantes tratados con INSTI mostraron abundancias significativamente mayores de *Tyzzerella_4 y Lactobacillus*, taxones asociados con la captación de energía y la adiposidad. Las diferencias observadas en la microbiota intestinal entre los regímenes de TAR basados en INSTI y en NNRTI podrían derivarse de interacciones específicas con el entorno intestinal y los procesos metabólicos del huésped.

Algunos estudios han descrito efectos beneficiosos de los INSTI en la permeabilidad intestinal, la reversión de la disbiosis intestinal asociada al VIH y en la restauración de la biodiversidad intestinal en comparación con los regímenes que contienen NNRTI y PI (137,138), pero otros sugieren que en personas con síndrome metabólico, los regímenes basados en INSTI pueden estar vinculados a una mayor disbiosis y una mayor abundancia de taxones proinflamatorios que los regímenes basados en PI (139). Estos efectos de los INSTI en la salud intestinal pueden facilitar la proliferación de taxones que aprovechan la energía, como *Tyzzerella_4* y algunas cepas de *Lactobacillus*.

El aumento de peso asociado a INSTI es más pronunciado en los primeros dos años de inicio del tratamiento en individuos que no han recibido TAR previamente. En este periodo, es probable que los cambios en una microbiota intestinal disbiótica tengan mayor impacto. En pacientes previamente tratados que cambian de régimen, estas alteraciones pueden ser menos pronunciadas, moderando su impacto en el peso (140). Con el tiempo, la abundancia relativa y la influencia de los taxones que aprovechan la energía pueden disminuir, lo que podría explicar la falta de diferencias significativas en el auento de peso entre regímenes en el presente estudio.

Más allá de la dinámica de la microbiota, se sabe que los INSTI inducen alteraciones metabólicas en el huésped, incluyendo resistencia insulínica y mayor riesgo de diabetes, independientemente del IMC (141). Estas modificaciones metabólicas pueden generar un ciclo de retroalimentación con la microbiota intestinal, promoviendo la proliferación de taxones que contribuyen a la disfunción metabólica. Por ejemplo, los cambios en los perfiles de glucosa y lípidos pueden favorecer el crecimiento de *Lactobacillus* y *Tyzzerella*, que son

eficientes en la extracción de energía de las fuentes dietéticas y se han asociado con una mayor adiposidad(135). Además, el aumento en la biosíntesis de ácidos biliares observado en personas tratadas con INSTI, en comparación con las tratadas con NNRTI (142) , puede favorecer el crecimiento de taxones tolerantes a los ácidos biliares como *Tyzzerella_4*. (132). También se ha sugerido que el dolutegravir puede aumentar la sensación de hambre y agravar los efectos de una dieta alta en calorías sobre la composición de la microbiota. Estas interacciones sugieren que, entre los mecanismos multifactoriales que potencialmente impulsan el aumento de peso asociado a INSTI, podrían estar involucradas tanto las vías metabólicas microbianas como las del huésped.

El estudio tiene limitaciones. Su diseño de centro único y criterios de inclusión específicos pueden limitar la generalización de los hallazgos a poblaciones más amplias de PCVIH. Además, la definición operativa de aumento de peso significativo, aunque basada en recomendaciones cardiometabólicas, requiere una validación adicional en esta población. El umbral también puede simplificar en exceso los cambios de peso continuos, pasando por alto tendencias más pequeñas, pero clínicamente significativas. Además, la representación limitada de usuarios de tenofovir alafenamida en la cohorte impidió un análisis significativo del impacto de la tenofovir alafenamida en el peso y la composición de la microbiota. Finalmente, la predominancia de dolutegravir en el grupo INSTI y rilpivirina en el grupo NNRTI limita nuestra capacidad para distinguir los efectos de clase de aquellos atribuibles a drogas individuales.

A pesar del creciente interés en la microbiota y la salud metabólica, la información sobre estas relaciones en PCVIH sigue siendo limitada. Este estudio se alínea con un trabajo previo de Ishizaka et al.2024 (143), identificando taxones específicos asociados con el aumento de peso en PCVIH tratados con INSTI. En ese análisis longitudinal de casos y controles, los participantes exhibieron disbiosis intestinal persistente a pesar de un TAR supresor a largo plazo, un patrón que se correlacionó con el aumento de peso y puede contribuir al desarrollo de comorbilidades metabólicas (141). De manera similar, un estudio previo encontró que el microbioma intestinal de individuos tratados con INSTI estaba enriquecido en *Bifidobacterium*, un género también asociado con un IMC más alto (135). Además de la contribución al conocimiento de un aspecto relativamente inexplorado de la etiología del aumento de peso en PCVIH, las fortalezas del estudio incluyen su diseño prospectivo con un protocolo estandarizado de recolección de datos y un seguimiento de cinco años, todos los cuales mejoran la robustez y reproducibilidad.

El gran número de muestras de heces y la alta retención de participantes aseguran aún más la fiabilidad de los resultados, proporcionando valiosas perspectivas sobre las firmas de la microbiota vinculadas de forma consistente con un aumento de peso significativo.

En conclusión, este estudio identifica perfiles de microbiota intestinal asociados con un aumento de peso significativo en PCVIH y destaca el enriquecimiento de taxones vinculados al aumento de peso, como *Tyzzerella_4 y Lactobacillus*, en individuos que reciben pautas de TAR basadas en INSTI. Estos hallazgos subrayan la necesidad de profundizar en la investigación sobre los mecanismos mediados por la microbiota que subyacen a los cambios de peso asociados al TAR. Investigar las vías funcionales de taxones bacterianos específicos mediante enfoques metagenómicos y metabolómicos complementarios podría proporcionar información relevante para desarrollar estrategias orientadas a modular la microbiota y mitigar los riesgos metabólicos relacionados con el aumento de peso corporal en PCVIH.

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

8.- CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado y aplicado con éxito un protocolo robusto de análisis bioinformático y estadístico para el estudio de la composición de la microbiota intestinal en personas con VIH estables. Este protocolo incluyó la estandarización de la recolección y procesamiento de muestras fecales., técnicas de secuenciación de alto rendimiento (gen 16S rRNA), y la implementación de métodos bioinformáticos y estadísticos avanzados adaptados a la naturaleza composicional y longitudinal de los datos. La aplicación de este protocolo fue fundamental para abordar las preguntas de investigación planteadas.
2. La composición de la microbiota intestinal longitudinal difiere según la progresión de la aterosclerosis subclínica en personas con VIH. Aunque estos hallazgos son meramente asociativos y los perfiles de microbiota podrían ser reactivos en lugar de causales, se identificó una firma diferencial de la microbiota asociada a la progresión de la aterosclerosis, caracterizada por un enriquecimiento de bacterias como *Agathobacter*, *Ruminococcus 2*, *Parasutterella* y *Bilophila*, y una depleción de *Prevotella 7*. Esta investigación amplía la comprensión de la interacción entre la aterosclerosis y la microbiota en esta población.
3. Se identificaron taxones bacterianos específicos en la microbiota intestinal asociados con un aumento significativo de peso corporal (≥10%) en personas con VIH. Los análisis de abundancia diferencial (ANCOM-BC2) mostraron asociaciones positivas con los géneros *Dialister* y *Tyzzerella_4* en el grupo con aumento de peso, mientras que el género *Phascolarctobacterium* se encontró enriquecido en participantes que no experimentaron dicho aumento de peso. Estos resultados se alinean con evidencia previa que sugiere roles metabólicos para estos taxones. En un subanálisis utilizando un umbral de aumento de peso moderado (≥5%), se observó una mayor abundancia de *Lactobacillus* y una menor abundancia de *Desulfovibrio* y *Roseburia* asociadas al aumento de peso
4. La composición del régimen de tratamiento antirretroviral, particularmente el uso de inhibidores de la integrasa se asoció con diferencias en la abundancia de algunos taxones relevantes para el aumento de peso. Las pautas basadas en inhibidores de la integrasa mostraron una abundancia relativa significativamente mayor de *Tyzzerella_4* y *Lactobacillus* en comparación con las pautas basadas en inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos. El análisis ajustado (ANCOM-BC2) sugirió una asociación positiva entre *Tyzzerella_4* y las pautas basadas en inhibidores de la integrasa. También se identificaron otros taxones enriquecidos en cada grupo. Esta observación sugiere que entre los mecanismos del aumento de peso corporal asociado a los inhibidores de la integrasa, podrían estar involucradas interacciones entre las vías metabólicas del huésped y la microbiota.

5. Se observaron algunas diferencias en la abundancia de taxones específicos entre las pautas de tratamiento que contenían tenofovir alafenamida con inhibidores de la integrasa en comparación con las pautas sin tenofovir alafenamida, como una mayor abundancia de *Ruminococcaceae_UCG-013, Ruminococcaceae_4* y *Oscillospira* en el grupo tratado con tenofovir alafenamida e inhibidores de la integrasa. Sin embargo, la escasa representación de las personas en tratamiento con tenofovir alafenamida en la cohorte limitó la capacidad para analizar el impacto específico de este fármaco en el peso y la microbiota.
6. La identificación de perfiles de microbiota asociados a la progresión de la aterosclerosis y al aumento de peso corporal en las personas con VIH podría ser útil para la detección temprana de individuos de mayor riesgo y representar un objetivo potencial para desarrollar estrategias preventivas destinadas a modular el microbioma intestinal en el futuro.

9.- LIMITACIONES Y FORTALEZAS

9.1 Limitaciones:

- Diseño de centro único y criterios de inclusión específicos: La investigación se llevó a cabo en un solo centro y con criterios de inclusión definidos, lo que puede limitar la capacidad de generalizar los hallazgos a poblaciones más diversas y amplias de PCVIH.
- Definición operativa de progresión de aterosclerosis y aumento de peso: La progresión del grosor íntima-media carotídeo se definió operativamente como un aumento ≥10% y/o la detección de una nueva placa carotídea. Aunque esta definición es una medida común de aterosclerosis subclínica, su naturaleza operativa y arbitraria es una limitación. Sin embargo, la fiabilidad de la clasificación se apoya en las características demográficas y metabólicas de los participantes de cada grupo, y una definición más estricta (≥25%) arrojó hallazgos similares. De igual manera, la definición de un aumento significativo de peso (un incremento ≥10% del peso corporal) se basó en recomendaciones cardiometabólicas, pero podría simplificar en exceso los cambios continuos de peso, pasando por alto tendencias más pequeñas, pero clínicamente significativas. Para abordar esto, se realizó un subanálisis menos estricto con un umbral de ≥5% de aumento de peso.
- Representación limitada de usuarios de tenofovir alafenamida: La escasa presencia de participantes que utilizaban este fármaco en la cohorte no permitió un análisis específico de su impacto en el peso y la composición de la microbiota.
- Predominancia de fármacos específicos dentro de sus clases: El predominio de dolutegravir en el grupo de inhibidores de la integrasa y de rilpivirina en el grupo de inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos limitó la capacidad de

distinguir claramente los efectos atribuibles a la clase de antirretrovirales de los efectos de fármacos individuales.

- Ausencia de control sobre la variabilidad intraindividual por la dieta y el ambiente: La variabilidad dentro de un mismo individuo debido a factores como la dieta y las influencias ambientales no fue considerada en el análisis, lo cual representa una limitación.
- Falta de datos precisos sobre el control de factores de riesgo cardiovascular: Durante el estudio, no se recopilaron datos específicos sobre el control preciso de los factores de riesgo cardiovascular tradicionales.
- Hallazgos asociativos, no causales: Los resultados obtenidos sobre el perfil de la microbiota y la progresión de la aterosclerosis, así como el aumento de peso, son meramente asociativos. Esto implica que los cambios observados en la microbiota podrían ser el resultado de la inmunoactivación sistémica asociada al VIH o de los tratamientos, y no necesariamente la causa subyacente de la progresión de la aterosclerosis o el aumento de peso.

9.2 Fortalezas:

- Diseño longitudinal prospectivo: Este diseño permitió el muestreo secuencial de heces y mediciones del grosor íntima-media carotídeo y del peso corporal a lo largo del tiempo. Este enfoque es crucial para observar cómo la microbiota evoluciona en respuesta a distintas variables y para establecer relaciones de causalidad al correlacionar las variaciones con eventos clínicos.
- Número de participantes y muestras: La cohorte incluyó un número considerable de participantes y un alto volumen de muestras fecales obtenidas secuencialmente (553 muestras en total). Esto contribuye significativamente a la solidez y fiabilidad de los resultados.
- Ajuste multivariante robusto: Se realizaron ajustes por factores de riesgo cardiovascular tradicionales en los análisis de la relación entre la composición de la microbiota y la progresión del grosor íntima-media carotídeo, así como por otras covariables relevantes.
- Identificación consistente de firmas de microbiota: Se lograron identificar firmas de microbiota asociadas sistemáticamente con la progresión de la aterosclerosis en diversos momentos, lo que refuerza la fiabilidad de los resultados.
- Seguimiento a largo plazo: Un seguimiento de cinco años proporciona una perspectiva valiosa y mejora la robustez del estudio, especialmente en el análisis de la relación entre la microbiota y el aumento de peso.
- Protocolo de análisis bioinformático y estadístico robusto: El estudio se basa en un protocolo de análisis bioinformático y estadístico meticulosamente desarrollado

y aplicado, diseñado específicamente para manejar la complejidad y la naturaleza longitudinal de los datos del microbioma.

- El protocolo reconoce explícitamente que los datos de microbioma son intrínsecamente composicionales y los trata como tales.
- Se utilizan métodos de normalización composicional, para superar la restricción de suma unitaria y permitir el uso de pruebas estadísticas clásicas.
- Abordaje de la alta dimensionalidad (sobredimensión
- Se utiliza el análisis de coordenadas principales (PCoA) para usar cualquier matriz de disimilitud
- Consideración de la variabilidad (intra e interindividual): El protocolo utiliza modelos lineales generalizados mixtos (GLMMs
- Análisis robusto de abundancia diferencial (ANCOM-BC2): Se emplea ANCOM-BC2 Esta técnica es capaz de corregir diversos tipos de sesgos (fracción de muestreo, eficiencia de secuenciación) y regularizar la varianza para mejorar la robustez estadística. También maneja ceros estructurales y permite comparaciones multigrupo y con mediciones repetidas.
- Análisis axhaustivo de diversidad (alfa y beta): Para la alfa diversidad, se calculan múltiples índices (riqueza de especies, Shannon, Simpson) para una caracterización completa. Para la beta diversidad, se utiliza PERMANOVA con diversas métricas de distancia (Bray-Curtis, Jaccard, Aitchison, UniFrac).
- Control de sesgos en estudios observacionales: Se utiliza la técnica de emparejamiento por índice de propensión(propensity score matching) para controlar sesgos en estudios observacionales.con diferentes métricas de distancia para el emparejamiento y un caliper de 0.05.
- Ajuste multivariante robusto: Se realizan ajustes extensos por factores de riesgo cardiovascular tradicionales y otras covariables relevantes (edad, sexo, comportamiento HSH, IMC, pauta de TAR, ingesta calórica, actividad física).

10.-BIBLIOGRAFÍA

1. Hou K, Wu ZX, Chen XY, Wang JQ, Zhang D, Xiao C, et al. Microbiota in health and diseases. Signal Transduction and Targeted Therapy 2022 7:1 [Internet]. 2022 Apr 23 [cited 2025 May 23];7(1):1–28. Available from: https://www.nature.com/articles/s41392-022-00974-4

2. Hooper L V., Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. Science (1979) [Internet]. 2012 Jun 8 [cited 2025 May 21];336(6086):1268–73. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22674334/

3. Lee YK, Mazmanian SK. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? Science (1979) [Internet]. 2010 Dec 24 [cited 2025 Jun 24];330(6012):1768–73. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21205662/

4. Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. The role of the gut microbiota in nutrition and health. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology 2012 9:10 [Internet]. 2012 Sep 4 [cited 2025 May 20];9(10):577–89. Available from: https://www.nature.com/articles/nrgastro.2012.156

5. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature [Internet]. 2006 Dec 21 [cited 2025 May 20];444(7122):1027–31. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17183312/

6. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. Diabetes [Internet]. 2007 Jul [cited 2025 May 20];56(7):1761–72. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17456850/

7. Qiu P, Ishimoto T, Fu L, Zhang J, Zhang Z, Liu Y. The Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. Front Cell Infect Microbiol [Internet]. 2022 Feb 22 [cited 2025 May 20];12:733992. Available from: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8902753/

8. Dinan TG, Cryan JF. The Microbiome-Gut-Brain Axis in Health and Disease. Gastroenterol Clin North Am [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2025 May 20];46(1):77–89. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28164854/

9. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. PLoS Biol [Internet]. 2016 Aug 19 [cited 2025 May

20];14(8):e1002533. Available from: https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.1002533

10. Gill SR, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, et al. Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. Science [Internet]. 2006 Jun 2 [cited 2025 May 20];312(5778):1355. Available from: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3027896/

11. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Microbiology: Diversity of the human intestinal microbial flora. Science (1979) [Internet]. 2005 Jun 10 [cited 2025 May 20];308(5728):1635–8. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15831718/

12. Huttenhower C, Gevers D, Knight R, Abubucker S, Badger JH, Chinwalla AT, et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Nature [Internet]. 2012 Jun 14 [cited 2025 May 20];486(7402):207–14. Available from: https://www.researchgate.net/publication/225308983_The_Human_Microbiome_Project_HMP_Consortium_Structure_function_and_diversity_of_the_healthy_human_microbiome_Nature_486_207-214

13. Di Vincenzo F, Del Gaudio A, Petito V, Lopetuso LR, Scaldaferri F. Gut microbiota, intestinal permeability, and systemic inflammation: a narrative review. Intern Emerg Med [Internet]. 2024 Mar 1 [cited 2025 May 21];19(2):275–93. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37505311/

14. Gou HZ, Zhang YL, Ren LF, Li ZJ, Zhang L. How do intestinal probiotics restore the intestinal barrier? Front Microbiol. 2022 Jul 14;13:929346.

15. Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: At the interface of health and disease. Nat Rev Genet [Internet]. 2012 Apr [cited 2025 May 23];13(4):260–70. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22411464/

16. Principal Component Analysis. 2002 [cited 2025 May 20]; Available from: http://link.springer.com/10.1007/b98835

17. Network C, Abdi H, Guillemot V, Eslami A, Beaton D. Correspondence Analysis. Encyclopedia of Social Network Analysis and Mining [Internet]. 2018 [cited 2025 May 20];429–39. Available from: https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-1-4939-7131-2_140

18. Maaten L van der, Hinton G. Visualizing Data using t-SNE. Journal of Machine Learning Research [Internet]. 2008 [cited 2025 May 20];9(86):2579–605. Available from: http://jmlr.org/papers/v9/vandermaaten08a.html

19. Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, Wang J, Darzi Y, Faust K, et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. Science (1979) [Internet]. 2016 Apr 29 [cited 2025 May 21];352(6285):560–4. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27126039/

20. Anderson MJ. Permutation tests for univariate or multivariate analysis of variance and regression. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences [Internet]. 2001 [cited 2025 May 20];58(3):626–39. Available from: /doi/pdf/10.1139/f01-004?download=true

21. Lutz KC, Jiang S, Neugent ML, De Nisco NJ, Zhan X, Li Q. A Survey of Statistical Methods for Microbiome Data Analysis. Front Appl Math Stat [Internet]. 2022 Jun 14 [cited 2025 May 21];8:884810. Available from: www.frontiersin.org

22. Xia Y. Correlation and association analyses in microbiome study integrating multiomics in health and disease. Prog Mol Biol Transl Sci [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2025 May 20];171:309–491. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32475527/

23. Lemos LN, Fulthorpe RR, Roesch LFW. Low sequencing efforts bias analyses of shared taxa in microbial communities. Folia Microbiol (Praha) [Internet]. 2012 Sep [cited 2025 May 20];57(5):409–13. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22562492/

24. McArdle BH, Anderson MJ. FITTING MULTIVARIATE MODELS TO COMMUNITY DATA: A COMMENT ON DISTANCE-BASED REDUNDANCY ANALYSIS. Ecology [Internet]. 2001 Jan 1 [cited 2025 May 20];82(1):290–7. Available from: /doi/pdf/10.1890/0012-9658%282001%29082%5B0290%3AFMMTCD%5D2.0.CO%3B2

25. Pincus R. Aitchison, J.: The Statistical Analysis of Compositional Data. Chapman and Hall, London - New York 1986, XII, 416 pp., £ 25,00. Biometrical Journal [Internet]. 1988 Jan 1 [cited 2025 May 20];30(7):794–794. Available from: /doi/pdf/10.1002/bimj.4710300705

26. Gloor GB, Macklaim JM, Pawlowsky-Glahn V, Egozcue JJ. Microbiome datasets are compositional: And this is not optional. Front Microbiol [Internet]. 2017 Nov 15 [cited 2025 May 20];8(NOV):294209. Available from: www.frontiersin.org

27. Egozcue JJ, Pawlowsky-Glahn V, Mateu-Figueras G, Barceló-Vidal C. Isometric Logratio Transformations for Compositional Data Analysis. Math Geol [Internet]. 2003 Apr [cited 2025 May 20];35(3):279–300. Available from: https://link.springer.com/article/10.1023/A:1023818214614

28. Aitchison J. The Statistical Analysis of Compositional Data. Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological). 1982;44(2):139–77.

29. Martín-Fernández JA, Barceló-Vidal C, Pawlowsky-Glahn V. Dealing with Zeros and Missing Values in Compositional Data Sets Using Nonparametric Imputation. Math Geol [Internet]. 2003 Apr [cited 2025 May 20];35(3):253–78. Available from: https://link.springer.com/article/10.1023/A:1023866030544

30. Pearl J. Causal inference in statistics: An overview * † ‡. Stat Surv. 2009;3:96–146.

31. Serrano-Villar S, De Lagarde M, Vázquez-Castellanos J, Vallejo A, Bernadino JI, Madrid N, et al. Effects of immunonutrition in advanced human immunodeficiency virus disease: A randomized placebo-controlled clinical trial (Promaltia study). Clinical Infectious Diseases [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2025 May 20];68(1):120–30. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29788075/

32. Rocafort M, Noguera-Julian M, Rivera J, Pastor L, Guillén Y, Langhorst J, et al. Evolution of the gut microbiome following acute HIV-1 infection. Microbiome [Internet]. 2019 May 11 [cited 2025 May 20];7(1). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31078141/

33. Nowak P, Troseid M, Avershina E, Barqasho B, Neogi U, Holm K, et al. Gut microbiota diversity predicts immune status in HIV-1 infection. AIDS [Internet]. 2015 [cited 2025 May 20];29(18):2409–18. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26355675/

34. Borgognone A, Noguera-Julian M, Oriol B, Noël-Romas L, Ruiz-Riol M, Guillén Y, et al. Gut microbiome signatures linked to HIV-1 reservoir size and viremia control. Microbiome [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2025 May 20];10(1). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35410461/

35. Serrano-Villar S, Rojo D, Martinez-Martinez M, Deusch S, Vazquez-Castellanos JF, Sainz T, et al. HIV infection results in metabolic alterations in the gut microbiota different from those induced by other diseases. Sci Rep [Internet]. 2016 May 18 [cited 2025 May 20];6:26192. Available from: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4870624/

36. Turnbaugh PJ, Gordon JI. An Invitation to the marriage of metagenomics and metabolomics. Cell [Internet]. 2008 Sep 5 [cited 2025 May 20];134(5):708–13. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18775300/

37. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. Nature [Internet]. 2012 Sep 13 [cited 2025

May 20];489(7415):220–30. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22972295/

38. Kostic AD, Howitt MR, Garrett WS. Exploring host-microbiota interactions in animal models and humans. Genes Dev [Internet]. 2013 Apr 1 [cited 2025 May 20];27(7):701–18. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23592793/

39. Edwards JK, Cole SR, Breger TL, Filiatreau LM, Zalla L, Mulholland GE, et al. Five-Year Mortality for Adults Entering Human Immunodeficiency Virus Care Under Universal Early Treatment Compared With the General US Population. Clinical Infectious Diseases [Internet]. 2022 Sep 1 [cited 2025 May 28];75(5):867–74. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34983066/

40. Marcus JL, Leyden WA, Alexeeff SE, Anderson AN, Hechter RC, Hu H, et al. Comparison of Overall and Comorbidity-Free Life Expectancy between Insured Adults with and Without HIV Infection, 2000-2016. JAMA Netw Open [Internet]. 2020 Jun 15 [cited 2025 May 28];3(6):E207954. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32539152/

41. Weber MSR, Ramirez JJD, Hentzien M, Cavassini M, Bernasconi E, Hofmann E, et al. Time Trends in Causes of Death in People With HIV: Insights From the Swiss HIV Cohort Study. Clinical Infectious Diseases [Internet]. 2024 Jul 15 [cited 2025 May 28];79(1):177–88. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38214897/

42. Shah ASV, Stelzle D, Ken Lee K, Beck EJ, Alam S, Clifford S, et al. Global burden of atherosclerotic cardiovascular disease in people living with HIV systematic review and meta-analysis. Circulation [Internet]. 2018 [cited 2025 May 28];138(11):1100–12. Available from: https://www.ahajournals.org/doi/pdf/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.033369?download=true

43. Ryom L, Lundgren JD, El-Sadr W, Reiss P, Kirk O, Law M, et al. Cardiovascular disease and use of contemporary protease inhibitors: the D:A:D international prospective multicohort study. Lancet HIV [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2025 May 28];5(6):e291–300. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29731407/

44. Jaschinski N, Greenberg L, Neesgaard B, Miró JM, Grabmeier-Pfistershammer K, Wandeler G, et al. Recent abacavir use and incident cardiovascular disease in contemporary-treated people with HIV. AIDS [Internet]. 2023 Mar 1 [cited 2025 May 28];37(3):467–75. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36001525/

45. Kobiyama K, Ley K. Atherosclerosis a chronic inflammatory disease with an autoimmune component. Circ Res [Internet]. 2018 [cited 2025 May 28];123(10):1118–20. Available from: https://www.ahajournals.org/doi/pdf/10.1161/CIRCRESAHA.118.313816?download=true

46. Nordell AD, McKenna M, Borges AH, Duprez D, Neuhaus J, Neaton JD. Severity of cardiovascular disease outcomes among patients with hiv is related to markers of inflammation and coagulation. J Am Heart Assoc [Internet]. 2014 [cited 2025 May 28];3(3). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24870935/

47. Hsue PY, Tawakol A. Inflammation and Fibrosis in HIV: Getting to the Heart of the Matter. Circ Cardiovasc Imaging [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2025 May 28];9(3):e004427. Available from: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5761657/

48. Jonsson AL, Bäckhed F. Role of gut microbiota in atherosclerosis. Nat Rev Cardiol [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2025 May 28];14(2):79–87. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27905479/

49. Kazemian N, Mahmoudi M, Halperin F, Wu JC, Pakpour S. Gut microbiota and cardiovascular disease: Opportunities and challenges. Microbiome [Internet]. 2020 Mar 14 [cited 2025 May 28];8(1). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32169105/

50. Putcharoen O, Wattanachanya L, Sophonphan J, Siwamogsatham S, Sapsirisavat V, Gatechompol S, et al. New-onset diabetes in HIV-treated adults: Predictors, long-term renal and cardiovascular outcomes. AIDS [Internet]. 2017 Jul 17 [cited 2025 May 28];31(11):1535–43. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28398958/

51. Gutiérrez F. "Editorial comment on: Increased incidence of diabetes in people living with HIV treated with first-line integrase strand transfer inhibitors: A French multicentre retrospective study". HIV Med [Internet]. 2024 Jan 1 [cited 2025 May 28];26(1). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39340145/

52. Goff DC, Lloyd-Jones DM, Bennett G, Coady S, D'Agostino RB, Gibbons R, et al. 2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: A report of the American college of cardiology/American heart association task force on practice guidelines. Circulation [Internet]. 2014 Jun 24 [cited 2025 Jun 24];129(25 SUPPL. 1):49–73. Available from: /doi/pdf/10.1161/01.cir.0000437741.48606.98?download=true

53. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. Nat Methods [Internet]. 2016 Jun 29 [cited 2025 May 20];13(7):581–3. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27214047/

54. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Res [Internet]. 2013 Jan 1 [cited 2025 May 20];41(D1). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23193283/

55. Ryan DH, Yockey SR. Weight Loss and Improvement in Comorbidity: Differences at 5%, 10%, 15%, and Over. Curr Obes Rep [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2025 Jul 9];6(2):187–94. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s13679-017-0262-y

56. Ryan P, Blanco JL, Masia M, Garcia-Fraile L, Crusells MJ, Domingo P, et al. Maintenance therapy with dolutegravir and lamivudine versus bictegravir, emtricitabine, and tenofovir alafenamide in people with HIV (PASO-DOBLE): 48-week results from a randomised, multicentre, open-label, non-inferiority trial. Lancet HIV [Internet]. 2025 Jul 1 [cited 2025 Jul 10];12(7):e473–84. Available from: https://www.thelancet.com/action/showFullText?pii=S2352301825001055

57. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. Nat Methods [Internet]. 2016 Jun 29 [cited 2025 May 20];13(7):581–3. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27214047/

58. R: The R Project for Statistical Computing [Internet]. [cited 2025 May 29]. Available from: https://www.r-project.org/

59. Nelder JA, Wedderburn RWM. Generalized Linear Models. J R Stat Soc Ser A [Internet]. 1972 [cited 2025 May 23];135(3):370. Available from: https://www.jstor.org/stable/10.2307/2344614?origin=crossref

60. Stroup WW. Generalized Linear Mixed Models : Modern Concepts, Methods and Applications. Generalized Linear Mixed Models [Internet]. 2016 Apr 19 [cited 2025 May 20]; Available from: https://www.taylorfrancis.com/books/mono/10.1201/b13151/generalized-linear-mixed-models-walter-stroup

61. McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. PLoS One [Internet]. 2013 Apr

22 [cited 2025 May 20];8(4):e61217. Available from: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0061217

62. Package 'vegan' Title Community Ecology Package. 2025 [cited 2025 May 20]; Available from: https://github.com/vegandevs/vegan

63. Shannon CE. A Mathematical Theory of Communication. Bell System Technical Journal [Internet]. 1948 Jul 1 [cited 2025 May 20];27(3):379–423. Available from: /doi/pdf/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x

64. Simpson EH. Measurement of diversity [16]. Nature [Internet]. 1949 [cited 2025 May 20];163(4148):688. Available from: https://www.nature.com/articles/163688a0

65. McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. PLoS One [Internet]. 2013 Apr 22 [cited 2025 May 20];8(4):e61217. Available from: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0061217

66. Lin H, Peddada S Das. Multigroup analysis of compositions of microbiomes with covariate adjustments and repeated measures. Nat Methods [Internet]. 2024 Jan 1 [cited 2025 May 20];21(1):83–91. Available from: https://www.nature.com/articles/s41592-023-02092-7

67. Lin H, Peddada S Das. Analysis of compositions of microbiomes with bias correction. Nat Commun [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2025 May 20];11(1). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32665548/

68. Masiá M, García JA, García-Abellán J, Padilla S, Fernández-González M, Agulló V, et al. Distinct Gut Microbiota Signatures Associated With Progression of Atherosclerosis in People Living With Human Immunodeficiency Virus. J Infect Dis [Internet]. 2025 Jul 11 [cited 2025 Nov 14];231(6):1371–81. Available from: https://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiae243

69. Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, Masutti F, Passalacqua M, Castiglione A, et al. The fatty liver index: A simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. BMC Gastroenterol [Internet]. 2006 Nov 2 [cited 2025 Aug 6];6(1):1–7. Available from: https://bmcgastroenterol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-230X-6-33

70. Gower JC. Some Distance Properties of Latent Root and Vector Methods Used in Multivariate Analysis. Biometrika. 1966 Dec;53(3/4):325.

71. García-Abellán J, García JA, Galdámez R, Gosalbes MJ, Fernández-González M, Padilla S, et al. Gut microbiota and weight gain in people with HIV on integrase

inhibitors: a five-year longitudinal study. Journal of Antimicrobial Chemotherapy [Internet]. 2025 Jun 5 [cited 2025 Jun 17]; Available from: https://dx.doi.org/10.1093/jac/dkaf182

72. Xia Y, Sun J. Generalized Linear Mixed Models for Longitudinal Microbiome Data. Bioinformatic and Statistical Analysis of Microbiome Data. 2023;615–74.

73. Sweeny AR, Lemon H, Ibrahim A, Watt KA, Wilson K, Childs DZ, et al. A mixed-model approach for estimating drivers of microbiota community composition and differential taxonomic abundance. mSystems [Internet]. 2023 Jul 25 [cited 2025 Jun 2];8(4):e00040-23. Available from: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10469806/

74. Zhang X, Yi N. NBZIMM: negative binomial and zero-inflated mixed models, with application to microbiome/metagenomics data analysis. BMC Bioinformatics [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2025 Jun 2];21(1). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33126862/

75. Zhangid X, Guo B, Yi N. Zero-Inflated gaussian mixed models for analyzing longitudinal microbiome data. [cited 2025 Jun 2]; Available from: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242073

76. Tipton L, Cuenco KT, Huang L, Greenblatt RM, Kleerup E, Sciurba F, et al. Measuring associations between the microbiota and repeated measures of continuous clinical variables using a lasso-penalized generalized linear mixed model. BioData Min [Internet]. 2018 Jun 15 [cited 2025 Jun 2];11(1):12. Available from: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6003033/

77. Bray JR, Curtis JT. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. Ecol Monogr [Internet]. 1957 Oct 1 [cited 2025 May 23];27(4):325–49. Available from: /doi/pdf/10.2307/1942268

78. Jaccard P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et du Jura. 1901 Jan 1 [cited 2025 Jun 2]; Available from: https://www.scienceopen.com/document?vid=01a9bb0e-a14c-461f-85c9-f407259515dc

79. Aitchison J. The Statistical Analysis of Compositional Data. Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological) [Internet]. 1982 Jan 1 [cited 2025 Jun 2];44(2):139–60. Available from: /doi/pdf/10.1111/j.2517-6161.1982.tb01195.x

80. Lozupone C, Knight R. UniFrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities. Appl Environ Microbiol [Internet]. 2005 Dec [cited 2025 Jun

2];71(12):8228–35. Available from: /doi/pdf/10.1128/aem.71.12.8228-8235.2005?download=true

81. Hotelling H. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. J Educ Psychol. 1933 Sep;24(6):417–41.

82. Chao A, Gotelli NJ, Hsieh TC, Sander EL, Ma KH, Colwell RK, et al. Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: a framework for sampling and estimation in species diversity studies. Ecol Monogr [Internet]. 2014 Feb 1 [cited 2025 Jun 2];84(1):45–67. Available from: /doi/pdf/10.1890/13-0133.1

83. BBC Bitesize - GCSE Maths - Representing data - Edexcel - Revision 7. BBC Bitesize [Internet]. [cited 2025 May 29]; Available from: https://www.bbc.com/bitesize/guides/zc7sb82/revision/7

84. Lin H, Peddada S Das. Analysis of compositions of microbiomes with bias correction. Nat Commun [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2025 May 20];11(1):1–11. Available from: https://www.nature.com/articles/s41467-020-17041-7

85. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2001 Apr 24 [cited 2025 May 20];98(9):5116–21. Available from: https://www.pnas.org/doi/pdf/10.1073/pnas.091062498

86. Costea PI, Zeller G, Sunagawa S, Bork P. A fair comparison. Nature Methods 2014 11:4 [Internet]. 2014 Mar 28 [cited 2025 May 20];11(4):359–359. Available from: https://www.nature.com/articles/nmeth.2897

87. Paulson JN, Colin Stine O, Bravo HC, Pop M. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys. Nat Methods [Internet]. 2013 Dec [cited 2025 May 21];10(12):1200–2. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24076764/

88. Guo W, Sarkar SK, Peddada SD. Controlling false discoveries in multidimensional directional decisions, with applications to gene expression data on ordered categories. Biometrics [Internet]. 2010 [cited 2025 May 20];66(2):485–92. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19645703/

89. Grandhi A, Guo W, Peddada SD. A multiple testing procedure for multi-dimensional pairwise comparisons with application to gene expression studies. BMC Bioinformatics [Internet]. 2016 Feb 25 [cited 2025 May 20];17(1):1–12. Available from: https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12859-016-0937-5

90. Nearing JT, Douglas GM, Hayes MG, MacDonald J, Desai DK, Allward N, et al. Microbiome differential abundance methods produce different results across 38

datasets. Nat Commun [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2025 Jun 2];13(1). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35039521/

91. Rosenbaum PR, Rubin DB. The central role of the propensity score in observational studies for causal effects. Biometrika [Internet]. 1983 Apr 1 [cited 2025 May 20];70(1):41–55. Available from: https://dx.doi.org/10.1093/biomet/70.1.41

92. Sheng Z, Xu J, Wang M, Xu X, Zhu J, Zeng S, et al. The role of urinary microbiota in primary and recurrent bladder cancer: insights from a propensity score matching study. BMC Cancer [Internet]. 2025 Dec 1 [cited 2025 Jun 2];25(1):1–13. Available from: https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-025-13817-6

93. Wang Y, Zhang Y, Cao Y, Zhang W, Liu M, Wang G. Characteristics of gut microbiota in anastomotic leakage patients in cold zones post-colorectal cancer surgery: A high-throughput sequencing and propensity-score matching study. Frigid Zone Medicine [Internet]. 2024 Jul 11 [cited 2025 Jun 2];4(2):120–8. Available from: https://www.researchgate.net/publication/382189233_Characteristics_of_gut_microbiota_in_anastomotic_leakage_patients_in_cold_zones_post-colorectal_cancer_surgery_A_high-throughput_sequencing_and_propensity-score_matching_study

94. Kim JR, Han K, Han Y, Kang N, Shin TS, Park HJ, et al. Microbiome Markers of Pancreatic Cancer Based on Bacteria-Derived Extracellular Vesicles Acquired from Blood Samples: A Retrospective Propensity Score Matching Analysis. Biology 2021, Vol 10, Page 219 [Internet]. 2021 Mar 13 [cited 2025 Jun 2];10(3):219. Available from: https://www.mdpi.com/2079-7737/10/3/219/htm

95. Villanueva-Millán MJ, Pérez-Matute P, Recio-Fernández E, Lezana Rosales JM, Oteo JA. Characterization of gut microbiota composition in HIV-infected patients with metabolic syndrome. J Physiol Biochem [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2025 Jun 2];75(3):299–309. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30924020/

96. Fulcher JA, Li F, Cook RR, Zabih S, Louie A, Okochi H, et al. Rectal Microbiome Alterations Associated With Oral Human Immunodeficiency Virus Pre-Exposure Prophylaxis. Open Forum Infect Dis [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2025 Jun 2];6(11):ofz463. Available from: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7105055/

97. Bai Y, Jin C, Zhang H, Jia Y, Xiao S, Yang Y. Correlation Analysis of Gut Microbiota Derivatives with Coronary Artery Disease Severity and Prognosis. Rev Cardiovasc Med [Internet]. 2025 Apr 1 [cited 2025 Jun 2];26(4). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40351664/

98. Ho DE, Imai K, King G, Stuart EA. MatchIt: Nonparametric Preprocessing for Parametric Causal Inference. J Stat Softw [Internet]. 2011 Jun 14 [cited 2025 May 20];42(8):1–28. Available from: https://www.jstatsoft.org/index.php/jss/article/view/v042i08

99. Serrano-Villar S, De Lagarde M, Vázquez-Castellanos J, Vallejo A, Bernadino JI, Madrid N, et al. Effects of immunonutrition in advanced human immunodeficiency virus disease: A randomized placebo-controlled clinical trial (Promaltia study). Clinical Infectious Diseases [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2025 May 20];68(1):120–30. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29788075/

100. Borgognone A, Noguera-Julian M, Oriol B, Noël-Romas L, Ruiz-Riol M, Guillén Y, et al. Gut microbiome signatures linked to HIV-1 reservoir size and viremia control. Microbiome [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2025 May 20];10(1). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35410461/

101. Kehrmann J, Menzel J, Saeedghalati M, Obeid R, Schulze C, Holzendorf V, et al. Gut Microbiota in Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals Linked to Coronary Heart Disease. Journal of Infectious Diseases [Internet]. 2019 Jan 9 [cited 2025 May 20];219(3):497–508. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30202890/

102. El-Far M, Durand M, Turcotte I, Larouche-Anctil E, Sylla M, Zaidan S, et al. Upregulated IL-32 Expression And Reduced Gut Short Chain Fatty Acid Caproic Acid in People Living With HIV With Subclinical Atherosclerosis. Front Immunol [Internet]. 2021 Apr 15 [cited 2025 May 20];12. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33936102/

103. Jonsson AL, Bäckhed F. Role of gut microbiota in atherosclerosis. Nat Rev Cardiol [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2025 May 20];14(2):79–87. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27905479/

104. Kazemian N, Mahmoudi M, Halperin F, Wu JC, Pakpour S. Gut microbiota and cardiovascular disease: Opportunities and challenges. Microbiome [Internet]. 2020 Mar 14 [cited 2025 May 20];8(1). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32169105/

105. Peters BA, Burk RD, Kaplan RC, Qi Q. The Gut Microbiome, Microbial Metabolites, and Cardiovascular Disease in People Living with HIV. Curr HIV/AIDS Rep [Internet]. 2023 Apr 1 [cited 2025 May 21];20(2):86–99. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36708497/

106. Luo K, Wang Z, Peters BA, Hanna DB, Wang T, Sollecito CC, et al. Tryptophan metabolism, gut microbiota, and carotid artery plaque in women with and without HIV infection. AIDS [Internet]. 2024 Feb 1 [cited 2025 May 20];38(2):223–33. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37199567/

107. Holzhausen EA, Nikodemova M, Deblois CL, Barnet JH, Peppard PE, Suen G, et al. Assessing the impact of storage time on the stability of stool microbiota richness, diversity, and composition. Gut Pathog [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2025 May 20];13(1). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34930464/

108. Chen L, Wang D, Garmaeva S, Kurilshikov A, Vich Vila A, Gacesa R, et al. The long-term genetic stability and individual specificity of the human gut microbiome. Cell [Internet]. 2021 Apr 29 [cited 2025 May 20];184(9):2302-2315.e12. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33838112/

109. Olsson LM, Boulund F, Nilsson S, Khan MT, Gummesson A, Fagerberg L, et al. Dynamics of the normal gut microbiota: A longitudinal one-year population study in Sweden. Cell Host Microbe [Internet]. 2022 May 11 [cited 2025 May 20];30(5):726-739.e3. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35349787/

110. Wang Z, Peters BA, Usyk M, Xing J, Hanna DB, Wang T, et al. Gut Microbiota, Plasma Metabolomic Profiles, and Carotid Artery Atherosclerosis in HIV Infection. Arterioscler Thromb Vasc Biol [Internet]. 2022 Aug 1 [cited 2025 May 20];42(8):1081–93. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35678187/

111. Kosiewicz MM, Zirnheld AL, Alard P. Gut Microbiota, Immunity, and Disease: A Complex Relationship. Front Microbiol [Internet]. 2011 [cited 2025 May 20];2(SEP):180. Available from: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3166766/

112. Mingjun Z, Fei M, Zhousong X, Wei X, Jian X, Yuanxue Y, et al. 16S rDNA sequencing analyzes differences in intestinal flora of human immunodeficiency virus (HIV) patients and association with immune activation. Bioengineered [Internet]. 2022 [cited 2025 May 20];13(2):4085. Available from: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8974104/

113. Krasaewes K, Chaiwarith R, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Profiles of gut microbiota associated with clinical outcomes in patients with different stages of SARS-CoV-2 infection. Life Sci [Internet]. 2023 Nov 1 [cited 2025 May 20];332. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37783267/

114. Hu YH, Meyer K, Lulla A, Lewis CE, Carnethon MR, Schreiner PJ, et al. Gut microbiome and stages of diabetes in middle-aged adults: CARDIA microbiome

study. Nutr Metab (Lond) [Internet]. 2023 Dec 1 [cited 2025 May 20];20(1):1–11. Available from: https://nutritionandmetabolism.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12986-022-00721-0

115. Liu YH, Peng P, Hung WC, Wu PH, Kao CY, Wu PY, et al. Comparative Gut Microbiome Differences between High and Low Aortic Arch Calcification Score in Patients with Chronic Diseases. Int J Mol Sci [Internet]. 2023 Mar 1 [cited 2025 May 20];24(6). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36982746/

116. Zhou Y, Ou Z, Tang X, Zhou Y, Xu H, Wang X, et al. Alterations in the gut microbiota of patients with acquired immune deficiency syndrome. J Cell Mol Med [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2025 May 21];22(4):2263–71. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29411528/

117. Xie Y, Sun J, Wei L, Jiang H, Hu C, Yang J, et al. Altered gut microbiota correlate with different immune responses to HAART in HIV-infected individuals. BMC Microbiol [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2025 May 21];21(1):11. Available from: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7789785/

118. Chen H, Wang Z, Qin M, Zhang B, Lin L, Ma Q, et al. Comprehensive Metabolomics Identified the Prominent Role of Glycerophospholipid Metabolism in Coronary Artery Disease Progression. Front Mol Biosci [Internet]. 2021 Apr 14 [cited 2025 May 21];8. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33937325/

119. Jie Z, Xia H, Zhong SL, Feng Q, Li S, Liang S, et al. The gut microbiome in atherosclerotic cardiovascular disease. Nat Commun [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2025 May 20];8(1). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29018189/

120. Ma Y, Zhu L, Ma Z, Gao Z, Wei Y, Shen Y, et al. Distinguishing feature of gut microbiota in Tibetan highland coronary artery disease patients and its link with diet. Sci Rep [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2025 May 21];11(1). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34531508/

121. Wang Z, Usyk M, Sollecito CC, Qiu Y, Williams-Nguyen J, Hua S, et al. Altered Gut Microbiota and Host Metabolite Profiles in Women with Human Immunodeficiency Virus. Clinical Infectious Diseases [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2025 May 20];71(9):2345–53. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31748797/

122. Igudesman D, Crandell JL, Corbin KD, Hooper J, Thomas JM, Bulik CM, et al. Associations of Dietary Intake with the Intestinal Microbiota and Short-Chain Fatty Acids Among Young Adults with Type 1 Diabetes and Overweight or Obesity. Journal

of Nutrition [Internet]. 2023 Apr 1 [cited 2025 May 20];153(4):1178–88. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36841667/

123. Dubourg G, Lagier JC, Hüe S, Surenaud M, Bachar D, Robert C, et al. Gut microbiota associated with HIV infection is significantly enriched in bacteria tolerant to oxygen. BMJ Open Gastroenterol [Internet]. 2016 Dec 31 [cited 2025 May 20];3(1). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27547442/

124. Hishiya N, Uno K, Nakano A, Konishi M, Higashi S, Eguchi S, et al. Association between the gut microbiome and organic acid profiles in a Japanese population with HIV infection. Journal of Infection and Chemotherapy [Internet]. 2024 Jan 1 [cited 2025 May 20];30(1):58–66. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37708940/

125. Baltazar-Díaz TA, Amador-Lara F, Andrade-Villanueva JF, González-Hernández LA, Cabrera-Silva RI, Sánchez-Reyes K, et al. Gut Bacterial Communities in HIV-Infected Individuals with Metabolic Syndrome: Effects of the Therapy with Integrase Strand Transfer Inhibitor-Based and Protease Inhibitor-Based Regimens. Microorganisms [Internet]. 2023 Apr 1 [cited 2025 May 20];11(4). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37110374/

126. Hanttu AM, Pekkala S, Satokari R, Hartikainen AK, Arkkila P, Pietiläinen KH, et al. Gut microbiota alterations after switching from a protease inhibitor or efavirenz to raltegravir in a randomized, controlled study. AIDS [Internet]. 2023 Feb 1 [cited 2025 May 20];37(2):323–32. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36541643/

127. Kelly TN, Bazzano LA, Ajami NJ, He H, Zhao J, Petrosino JF, et al. Gut Microbiome Associates with Lifetime Cardiovascular Disease Risk Profile among Bogalusa Heart Study Participants. Circ Res [Internet]. 2016 Sep 30 [cited 2025 May 20];119(8):956–64. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27507222/

128. Larsen JM. The immune response to Prevotella bacteria in chronic inflammatory disease. Immunology [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2025 May 20];151(4):363–74. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28542929/

129. Pinacchio C, Scagnolari C, Iebba V, Santinelli L, Innocenti GP, Frasca F, et al. High abundance of genus Prevotella is associated with dysregulation of IFN-I and T cell response in HIV-1-infected patients. AIDS [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2025 May 20];34(10):1467–73. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32675560/

130. Rosenson RS, Hubbard D, Monda KL, Reading SR, Chen L, Dluzniewski PJ, et al. Excess Risk for Atherosclerotic Cardiovascular Outcomes Among US Adults With HIV

in the Current Era. J Am Heart Assoc [Internet]. 2020 Jan 7 [cited 2025 May 20];9(1). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31880980/

131. Mastrangelo A, Robles-Vera I, Mañanes D, Galán M, Femenía-Muiña M, Redondo-Urzainqui A, et al. Imidazole propionate is a driver and therapeutic target in atherosclerosis. Nature [Internet]. 2025; Available from: https://doi.org/10.1038/s41586-025-09263-w

132. Crovesy L, Masterson D, Rosado EL. Profile of the gut microbiota of adults with obesity: a systematic review. Eur J Clin Nutr [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2025 May 20];74(9):1251–62. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32231226/

133. Mena-Vázquez N, Ruiz-Limón P, Moreno-Indias I, Manrique-Arija S, Lisbona-Montañez JM, Rioja J, et al. Adiposity is associated with expansion of the genus Dialister in rheumatoid arthritis patients. Biomedicine and Pharmacotherapy [Internet]. 2023 Apr 1 [cited 2025 May 20];160. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36773522/

134. Dillon SM, Frank DN, Wilson CC. The gut microbiome and HIV-1 pathogenesis: A two-way street. AIDS [Internet]. 2016 Nov 28 [cited 2025 May 20];30(18):2737–51. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27755100/

135. Pinart M, Dötsch A, Schlicht K, Laudes M, Bouwman J, Forslund SK, et al. Gut microbiome composition in obese and non-obese persons: A systematic review and meta-analysis. Nutrients [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2025 May 21];14(1). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35010887/

136. Wu F, Guo X, Zhang J, Zhang M, Ou Z, Peng Y. Phascolarctobacterium faecium abundant colonization in human gastrointestinal tract. Exp Ther Med [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2025 May 20];14(4):3122–6. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28912861/

137. Narayanan A, Kieri O, Vesterbacka J, Manoharan L, Chen P, Ghorbani M, et al. Exploring the interplay between antiretroviral therapy and the gut-oral microbiome axis in people living with HIV. Scientific Reports 2024 14:1 [Internet]. 2024 Aug 1 [cited 2025 May 20];14(1):1–10. Available from: https://www.nature.com/articles/s41598-024-68479-4

138. Cook RR, Fulcher JA, Tobin NH, Li F, Lee D, Woodward C, et al. Combined effects of HIV and obesity on the gastrointestinal microbiome of young men who have sex with men. HIV Med [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2025 May 20];21(6):365–77. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31883184/

139. Savinelli S, Newman E, Mallon PWG. Metabolic Complications Associated with Use of Integrase Strand Transfer Inhibitors (InSTI) for the Treatment of HIV-1 Infection: Focus on Weight Changes, Lipids, Glucose and Bone Metabolism. Curr HIV/AIDS Rep [Internet]. 2024 Dec 1 [cited 2025 May 20];21(6). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39207722/

140. Cervo A, Sebastiani G, Milic J, Krahn T, Mazzola S, Petta S, et al. "Dangerous liaisons: NAFLD and liver fibrosis increase cardiovascular risk in HIV". HIV Med [Internet]. 2022 Sep 1 [cited 2025 May 20];23(8):911–21. Available from: /doi/pdf/10.1111/hiv.13274

141. Koethe JR, Jenkins CA, Lau B, Shepherd BE, Justice AC, Tate JP, et al. Rising Obesity Prevalence and Weight Gain among Adults Starting Antiretroviral Therapy in the United States and Canada. AIDS Res Hum Retroviruses [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2025 May 20];32(1):50–8. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26352511/

142. Hyle EP, Martey EB, Bekker LG, Xu A, Parker RA, Walensky RP, et al. Diet, physical activity, and obesity among ART-experienced people with HIV in South Africa. AIDS Care - Psychological and Socio-Medical Aspects of AIDS/HIV [Internet]. 2023 [cited 2025 May 20];35(1):71–7. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34913762/

143. Ishizaka A, Koga M, Mizutani T, Suzuki Y, Matano T, Yotsuyanagi H. Sustained gut dysbiosis and intestinal inflammation show correlation with weight gain in person with chronic HIV infection on antiretroviral therapy. BMC Microbiol [Internet]. 2024 Dec 1 [cited 2025 Jun 27];24(1). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39044127/

11.- PUBLICACIONES

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

Articulo 1 : Distinct Gut Microbiota Signatures Associated With Progression of Atherosclerosis in People Living With Human Immunodeficiency Virus.

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

The Journal of Infectious Diseases
MAJOR ARTICLE

Distinct Gut Microbiota Signatures Associated With Progression of Atherosclerosis in People Living With Human Immunodeficiency Virus

Mar Masiá,[1,2,a] José A. García,[1,2,a] Javier García-Abellán,[1,2] Sergio Padilla,[1,2] Marta Fernández-González,[2,3] Vanesa Agulló,[3] Maria José Gosalbes,[4] Sonia Ruíz-Pérez,[4] Paula Mascarell,[3] Angela Botella,[3] and Félix Gutiérrez[1,2]

[1]Infectious Diseases Unit, Hospital General Universitario de Elche and Universidad Miguel Hernández de Elche, Alicante, Spain; [2]CIBER de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; [3]Infectious Diseases Unit, Hospital General Universitario de Elche, Alicante, Spain; and [4]Genomics and Health Area, Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana, Valencia, and CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain

Background. The relationship of microbiota composition dynamics and the progression of subclinical atherosclerosis in people with human immunodeficiency virus (PWH) remains unknown.

Methods. A 96-week, prospective, longitudinal study was performed in virologically suppressed PWH. Carotid intima-media thickness (cIMT) measurements and stool samples were obtained at baseline and at 48- and 96-week visits. cIMT progression was defined as an increase of >10% and/or detection of new carotid plaque. To profile the gut microbiome, amplification and sequencing of 16S ribosomal RNA (V3–V4 variable regions) were carried out, following the Illumina protocol. Sequencing was performed using the MiSeq platform.

Results. At the baseline, 48-week, and 96-week visits, 191, 190, and 167 patients, respectively, had fecal samples available for microbiome analysis. Eighty-seven participants (43%) showed atherosclerosis progression, and 54 (26.7%) presented with new carotid plaque. No significant differences were observed in adjusted α-diversity indices between groups, defined by cIMT progression. β-Diversity, determined through principal coordinate analysis, showed that the groups exhibited distinct microbial profiles ($P = .03$; permutational multivariate analysis of variance). Longitudinal analysis with Analysis of Compositions of Microbiomes with Bias Correction 2, adjusted for traditional cardiovascular risk factors, status as men who have sex with men, and nadir CD4 count, revealed that cIMT progression was consistently associated with *Agathobacter* and *Ruminococcus* 2, while nonprogression was consistently associated with *Prevotella* 7.

Conclusions. Progression of atherosclerosis in PWH might be associated with distinctive signatures in the gut microbiota.

Keywords. HIV; carotid intima-media thickness; atherosclerosis progression; cardiovascular disease; microbiota.

Cardiovascular disease is among the leading causes of disease and death in people living with human immunodeficiency virus (HIV; PWH) [1]. The absolute burden of HIV-associated cardiovascular disease has tripled during the past 2 decades, and the estimated risk is >2-fold higher than in the general population [2]. Features involved in the accelerated atherogenesis of PWH remain largely unknown. The excess risk persists in virologically suppressed individuals on antiretroviral therapy (ART) and after accounting for traditional cardiovascular risk factors [3].

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease [4]. Accumulating evidence suggests that the gut microbiota may play a role in atherogenesis by regulating immunity and metabolism, and serving as an antigenic source for atherosclerosis development [5]. Coronary artery disease and atherosclerosis have been linked with distinct changes in the composition of the intestinal microbiome [6]. However, most studies are cross-sectional, and existing data have been inconsistent, with both positive and negative associations reported in clinical studies [7]. HIV-1 infection and the primary risk category for HIV acquisition, namely, men who have sex with men (MSM) irrespective of HIV status, are commonly associated with alterations in the intestinal microbiota, which may act as a source of inflammation and chronic immune activation [8, 9].

However, as in the general population, the available data on the relationship of the intestinal microbiota with cardiovascular disease in the HIV population are limited and controversial [7]. A small number of cross-sectional studies have analyzed the gut microbiota composition in PWH with cardiovascular events or

Received 11 January 2024; editorial decision 4 April 2024; accepted 06 May 2024; published online 14 May 2024

Presented in part: 2024 Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Denver, Colorado, 3–6 March 2024.

[a]M. M. and J. A. G. contributed equally to this work.

Correspondence: Mar Masiá, MD, Infectious Diseases Unit, Hospital General Universitario de Elche, Camino de la Almazara 11, 03203 Elche, Alicante, Spain (marmasiac@gmail.com); Félix Gutiérrez, MD, Infectious Diseases Unit, Hospital General Universitario de Elche and Universidad Miguel Hernandez de Elche, Alicante, Spain (gutierrez_fel@gva.es).

The Journal of Infectious Diseases®

© The Author(s) 2024. Published by Oxford University Press on behalf of Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For commercial re-use, please contact reprints@oup.com for reprints and translation rights for reprints. All other permissions can be obtained through our RightsLink service via the Permissions link on the article page on our site—for further information please contact journals.permissions@oup.com.

https://doi.org/10.1093/infdis/jiae243

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/advance-article/doi/10.1093/infdis/jiae243/7672965 by UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ user on 06 September 2024

with subclinical atherosclerosis [10–13]. The cross-sectional design precludes the analysis of the temporal relationship between the microbiota and subsequent cardiovascular risk, including the microbiota profile preceding the occurrence of events. Furthermore, the gut microbiota represents a dynamic community of microorganisms that undergoes intraindividual and interindividual changes in composition over time [14]. Intraindividual variation has been demonstrated to contribute up to 23% of the total variation in gut microbiota composition [15]. Likewise, factors such as the duration of fecal sample storage before freezing also contribute to the variability [16]. Therefore, repeated measurements are necessary to reliably characterize the relationship between microbiota composition and atherosclerosis.

We prospectively examined the relationship between the longitudinal dynamics of microbiota composition and the progression of subclinical atherosclerosis, measured through carotid intima-media thickness (cIMT), over a 2-year period in a cohort of virologically suppressed PWH on stable ART.

METHODS

Study Design, Patients and Study Procedures

This was a 96-week, longitudinal cohort study carried out at Hospital General Universitario de Elche, Spain. Participants included were adults (>18 years old) with HIV infection receiving antiretroviral regimens based on nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitors or integrase strand transfer inhibitors (INSTIs), with undetectable viral load during at least the last 6 months (HIV-1 RNA levels <50 copies/mL). Those receiving antiretroviral regimens based on protease inhibitors were deliberately excluded to minimize potential biases affecting atherosclerosis progression, as this antiretroviral class has been associated with cardiovascular disease in PWH [17]. Additional exclusion criteria were known cardiovascular disease (see Supplementary material for the definition of cardiovascular disease) and pregnancy. The study was approved by the Ethical Committee of Hospital General Universitario de Elche, and all participants signed an informed consent. A questionnaire was administered on the baseline visit, including physical activity and detailed dietary habits. The questionnaire also included data regarding the name and date of the last antibiotic intake, consumption of probiotics, and specific details about any digestive issues.

At baseline, 48-week, and 96-weeks visits, physical examination and anthropometric measures were recorded and blood samples obtained. The use of antibiotics within 90 days before stool sample acquisition precluded the collection of samples. Patients were enrolled between 26 October 2017 and 18 February 2019 and were followed up until 12 January 2022.

Subclinical Atherosclerosis Measurement

B-mode ultrasonography of carotids was carried out using a Toshiba system (Toshiba Aplio 400), equipped with a 7–12 MHz linear array transducer at baseline and at 48- and 96-weeks visits by a single trained ultrasonographer. Ultrasonic scans were recorded from the right and left common carotid, internal carotid artery, and bifurcation. Measurements in millimeters from these 6 locations, using semiautomated detection software, were averaged and reported as a single cIMT. Detailed information about the procedure has been described elsewhere [18]. We defined cIMT progression as a cIMT increase ≥10% and/or the detection of new carotid plaques (>1.5 mm).

Stool Samples Collection and DNA Extraction

Fecal samples were self-collected by patients at home, using a home-based self-collection kit and following predefined instructions, at baseline and at the 48- and 96-week visits, and they were stored at −80 C until use. Briefly, participants were provided with 1 spatula and 2 (50-mL) Falcon tubes to collect fecal samples. They were advised to store the containers in the refrigerator at 4°C until delivery. Ideally, stool collection was recommended in the morning, within 1–3 hours before sample delivery, although samples collected the previous night were also acceptable. A detailed description of the stool sample collection procedure, along with a detailed patient follow-up flowchart, is available in the Supplementary material.

Fecal samples were centrifuged at 2000 rpm at 4°C for 2 minutes to remove fecal debris. The cellular suspensions were treated with lysozyme at a final concentration of 0.1 mg/mL at 37°C for 30 minutes with gently shaking. Total DNA was extracted from fecal samples by automatic extraction system MagNA PURE LC System (Roche) and was quantified with the Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). An amplification and sequencing of a fragment (V3–V4 variable region) of the 16S ribosomal RNA gene was carried out, following the Illumina protocol. The sequencing was performed with the MiSeq platform at FISABIO-Salud Pública using the V3 kit (2 × 300 cycles) and generating, in a run of 65 hours, 300–base pair readings starting at both ends of the amplicon, allowing overlapping of the sequences and obtaining the complete sequence of our amplicon (450 base pairs). The MiSeq data output is approximately 40–50 million reads (15 Gb per run).

Sequence Analysis

A total of 16S ribosomal RNA gene reads with a low-quality score and short read length as well as potential chimeras were removed using the DADA2 pipeline in the R package [19]. In addition, reads were aligned against the human genome (GRCh38.p13) using Bowtie2 and matches were discarded. The DADA2 pipeline was also used to create the amplicon sequence variants (ASVs). The taxonomic information of the ASVs was obtained by means of similarity comparison using BLAST algorithm against the SILVA database (version 138) [20].

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/advance-article/doi/10.1093/infdis/jiae243/7672965 by UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ user on 06 September 2024

Statistical Analysis

The normalization of the raw sequences was carried out using the compositional method when necessary. The α-diversity was evaluated considering observed ASVs and Shannon and inverse Simpson indices. To calculate α-diversity indices, the "estimate_richness" function from the phyloseq (Phyloseq) package in R (version 1.16.2) was used. A generalized linear model analysis was conducted to adjust for the Framingham risk score, nadir CD4 cell count, MSM sexual behavior, and body mass index (BMI). The β-diversity was evaluated through principal coordinate analysis, which summarizes and attempts to represent the (dis)similarity between objects in a low-dimensional Euclidean space with a (dis)similarity matrix as input, using the Bray-Curtis distance with the "ordinate" and "plot_ordination" commands from the phyloseq [21] package in R.

Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) was performed in the dissimilarity matrix using the adonis function of vegan library [22] in R with the distance matrix of Bray. To evaluate the differential abundance of gut microbiota between cIMT progression groups, a longitudinal Analysis of Compositions of Microbiomes with Bias Correction 2 (ANCOM-BC2) [23] was conducted. This analysis controlled for individual variability and adjusted for covariates of interest. The ANCOM-BC2 version extends and refines the previously published ANCOM-BC methodology [24]. The analysis was carried out using the ANCOM4 R package. In addition, linear discriminant analysis effect size analysis (LefSe) was used to identify the genera consistently associated with cIMT progression on each visit. LefSe was performed with the LefSe21 library on our phyloseq object by simply transforming the feature table into relative abundance by dividing the number of total reads for each sample ("compositional"), using a linear discriminant analysis cutoff of 2 and a Kruskal Wallis *P* value cutoff of .05.

RESULTS

Patient Characteristics

Of 202 participants recruited at baseline, 190 and 173 completed the 48- and 96-week follow-up visits, respectively. Reasons for dropout during follow-up included death from lung cancer (n = 1), pregnancy (n = 2), relocation (n = 2), and loss to follow-up or inability to come to the clinic (n = 24).

A total of 191 and 172 participants had 2 and 3 cIMT measurements, respectively, to evaluate atherosclerosis progression. Among them, 87 participants experienced a cIMT increase ≥10%, with 54 participants developing new carotid plaques. Among participants with ≥2 cIMT measurements, 191, 190, and 167 collected fecal samples for microbiome analysis at the baseline, 48-week and 96-week study visits, respectively, with 548 sequential samples obtained over the 96-week period (Supplementary Table 1).

As depicted in Table 1, compared with those without progression, participants experiencing cIMT progression were significantly older and exhibited a higher frequency of dyslipidemia, higher Framingham risk score, and a trend to higher frequency of hypertension, with no differences in the prevalence of diabetes or smoking habit. Table 1 shows the metabolic and HIV-related laboratory data of the study participants. Dietary habits and physical activity did not differ between cIMT progression groups (Supplementary Tables 2, 3, and 4). Similarly, there were no differences in ART composition or in weight gain during the study period. Sixteen participants (8%) changed their ART during the study period to an INSTI or a nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitor.

Gut Microbiome Diversity Measures and cIMT Progression

At the baseline visit, there were no differences in α-diversity indices in the gut microbiota by cIMT progression group in either unadjusted or adjusted analysis (Supplementary Figure 1*A* and 1*B*). A trend to differences between groups in β-diversity, measured with the divergence index, was observed ($P = .15$) (Supplementary Figure 1*C*), with no significant differences using PERMANOVA (Supplementary Table 5). LefSe revealed that participants exhibiting cIMT progression showed significant associations with enriched *Agathobacter*, while those with nonprogression showed associations with enriched *Prevotella* 9 (Supplementary Figure 1*D*).

The analysis of the temporal trends in the overall microbiota composition using Bray-Curtis dissimilarity showed less intra-individual than interindividual variation ($P = .96$). Although the repeated-measures analysis of variance test showed significant intraindividual differences across the study visits ($P = .002$), the effect size was small (generalized measure of effect size $\eta^2 = .012$).

No significant differences were observed in α-diversity indices between participants with or without cIMT progression in an analysis including all study samples (Figure 1*A*). Adjustment for the Framingham risk score, nadir CD4 cell count, MSM sexual behavior, and BMI through a generalized linear model showed similar results (Supplementary Table 6). Supplementary Figure 2 illustrates the α-diversity among cIMT progression groups matched with propensity score by the above adjustment covariates. The α-diversity underwent temporal changes across the study visits, although no significant differences were observed between baseline and 96-week α-diversity indices (Figure 1*B*-1*D*). Likewise, no differences in temporal changes were observed among groups showing or not showing cIMT progression (Supplementary Figure 3).

The β-diversity, using principal coordinate analysis plots based on Bray-Curtis distance with the PERMANOVA statistical method, revealed that the samples clustered into 2 groups in alignment with cIMT progression ($P = .03$)

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/advance-article/doi/10.1093/infdis/jiae243/7672965 by UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ user on 06 September 2024

Table 1. Baseline Clinical Characteristics of the Study Participants in Relation to the Progression of Carotid Intima-Media Thickness

Characteristic	cIMT Progression		*P* Value[a]
	Yes	No	
Patients, no.	87 (45.5)	104 (54.5)	…
Male sex	71 (81.6)	82 (79.6)	.85
Age, y	53 (46–58)	44 (35.8–51)	.001
HIV-related variables			
Mode of HIV transmission			.007
MSM	37 (42.5)	59 (56.7)	…
Heterosexual	19 (21.8)	23 (22.1)	…
IDU	23 (26.4)	9 (8.7)	…
Unknown	8 (9.2)	13 (12.5)	…
CD4 T-cell count nadir, median (IQR), cells/μL	245 (139–318)	254 (147–411)	.29
CD4 T-cell count, median (IQR), cells/μL	654 (450–876)	719 (544–866)	.22
CD4 T-cell proportion, median (IQR), %	34 (28–40)	38 (32- 43)	.03
CD4/CD8 ratio, median (IQR)	0.9 (0.7–1.3)	0.9 (0.7–1.3)	.24
Duration of exposure to last ART, median (IQR), mo	33 (19–52)	33 (18–44)	.37
NRTI treatment at baseline	72 (82.8)	79 (76)	.14
NNRTI treatment at baseline	55 (63.2)	69 (66.3)	.76
INSTI treatment at baseline	48 (55.2)	59 (56.7)	.88
Cardiovascular risk factors			
Current smoking	45 (51.7)	51 (49)	.77
Hypertension	13 (14.9)	6 (5.8)	.051
Dyslipidemia	17 (19.5)	5 (5)	.003
Diabetes	3 (3.4)	2 (1.9)	.66
Framingham risk score, median (IQR)	11 (5.5–20.3)	4.8 (3.1–8.1)	.001
10-y ASCVD risk, median (IQR)	5.9 (2.4–11)	1.8 (1–3.7)	.001
Cardiovascular and metabolic variables, median (IQR)			
Blood pressure, mm Hg			
Systolic	127 (114–138)	118 (109–126)	.001
Diastolic	73 (66–80)	67 (62–74)	.001
BMI[b]	25.6 (22.7–28.2)	24 (22–27.4)	.03
Weight increase, kg	3 (1–5.2)	2 (0.5–4.8)	.28
Waist-hip ratio	1 (0.9–1)	0.9 (0.9–1)	.001
Fatty liver index	46.8 (17–70.9)	28 (11.7–70.9)	.002
Tryglycerides and glucose index	4.6 (4.4–4.8)	4.5 (4.3–4.6)	.004
Total cholesterol, mg/dL	177 (151–199.5)	168.5 (147–186.2)	.14
LDL cholesterol, mg/dL	110 (90.5–132)	99 (87–116)	.03
HDL cholesterol, mg/dL	43 (36–51)	48 (40–57)	.01
Triglycerides, mg/dL	107 (73–17 035)	88 (6639–123)	.003
Glucose, mg/dL	89 (84–97)	90 (82–95)	.45

Abbreviations: ART, antiretroviral therapy; ASCVD, atherosclerotic cardiovascular disease; BMI, body mass index; cIMT, carotid intima-media thickness; HDL, high-density lipoprotein; HIV, human immunodeficiency virus; IDU, injection drug use; INSTI, integrase strand transfer inhibitor; IQR, interquartile range; LDL, low-density lipoprotein; MSM, men who have sex with men; NNRTI, nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitor; NRTI, nucleoside reverse-transcriptase inhibitor.

[a]Fisher exact test was used for group comparison among categorical variables, and Mann-Whitney *U* test for group comparison among continuous variables.

[b]BMI calculated as weight in kilograms divided by height in meters squared.

(Figure 2). The effect size (ω^2) with the PERMANOVA test analysis yielded a value of 0.001, suggestive of a modest effect size.

A total of 16 phyla were identified in the sequence analysis. Figure 3*A* shows the relative abundance at the phylum level of the 2 groups based on cIMT progression. The most representative phyla in both groups were Firmicutes (60.8% and 59.1% in participants exhibiting or not cIMT progression, respectively; $P < .001$), Bacteroidetes (29.6% and 31.5%, respectively; $P < .001$), Proteobacteria (4.2% and 4.1%; $P = .39$) and Actinobacteria (3.5% and 3.4%; $P = .120$) (Supplementary Table 7). Throughout the follow-up period, significant decreases and increases in the abundance of some phyla were found, with no differences observed between the groups according to cIMT progression (Supplementary Table 8*A*–8*C* and Figure 3*B*).

A total of 312 bacterial genera were identified in the study population. The most abundant were *Prevotella* 9 ($P < .001$ for the comparison between participants with or without cIMT progression), *Bacteroides* ($P = .90$), *Faecalibacterium* ($P = .10$), and *Prevotella* 2 ($P = .22$) (Figure 3*C* and

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/advance-article/doi/10.1093/infdis/jiae243/7672965 by UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ user on 06 September 2024

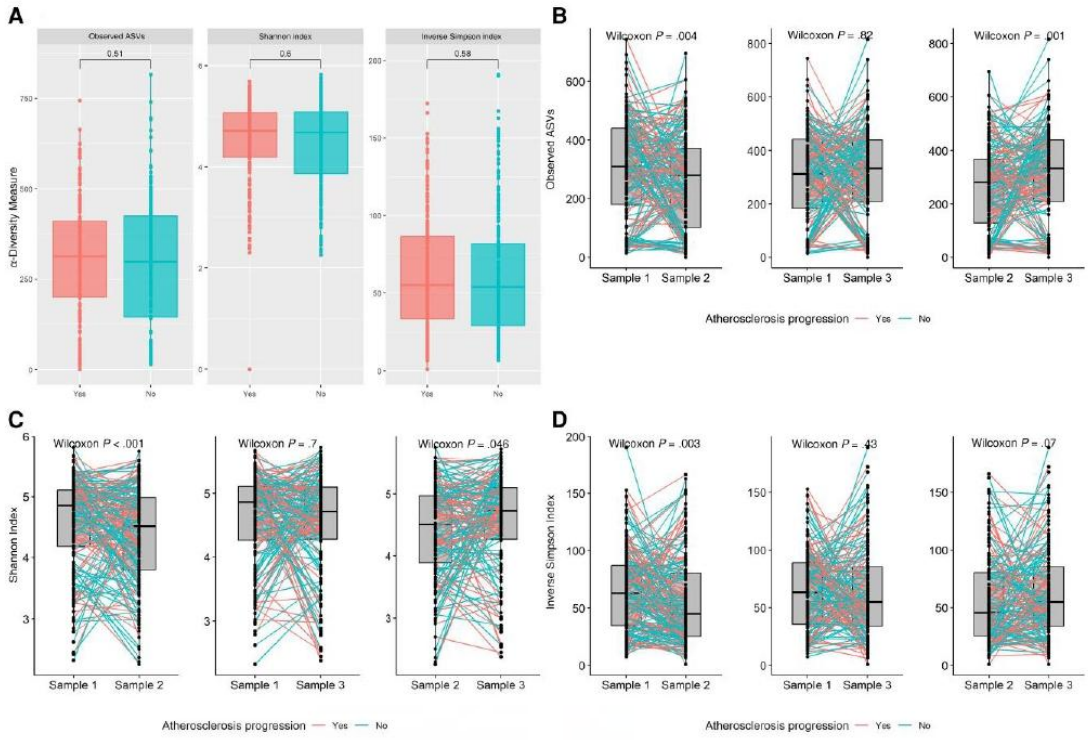


Figure 1. Gut microbiota α-diversity at the genus level by carotid intima-media thickness progression (cIMT) group. *A*, Box plots show α-diversity according to cIMT progression group using different metrics: observed amplicon sequence variants (ASVs), Shannon, and inverse Simpson indices. The analysis includes all study samples. Numbers on top of boxes represent *P* values. *B*, Comparison of α-diversity among study visits using observed ASVs. *C*, Comparison of α-diversity among study visits using the Shannon index. *D*, Comparison of α-diversity among study visits using the inverse Simpson index. All *P* values were calculated using the Wilcoxon rank sum test. The total number of fecal samples was 548, with 191 collected at the baseline visit (sample 1), 190 at the 48-week visit (sample 2), and 167 at the 96-week visit (sample 3). (See also Supplementary Figure 2 and Supplementary Figure 3.)

Supplementary Table 9). A significant decrease in abundance across the study visits was observed with *Faecalibacterium* ($P < .001$) and an increase with *Prevotella* 2 ($P < .001$), with no differences in trends between cIMT progression groups. Changes in abundance for the remaining genera across the study visits are shown in Figure 3*D* and Supplementary Table 10*A*–10*C*.

ANCOM-BC2 Results by Subclinical Atherosclerosis Progression Group

The longitudinal analysis using ANCOM-BC2 revealed distinct associations between cIMT progression groups and specific bacterial taxa abundance. The ANCOM-BC2 model adjusted for age, sex, MSM sexual behavior, BMI, hypertension, dyslipidemia, smoking habit, and nadir CD4 cell count, showed that *Agathobacter*, *Ruminococcus* 2, *Bilophila*, and *Bifidobacterium* were associated with cIMT progression. Other genera, such as *Parasutterella* and *Barnesiella* (Figure 4), were also found to be associated with cIMT progression. *Prevotella* 7 was associated with non-cIMT progression. Supplementary Figure 4 shows box plots of the taxa identified by ANCOM-BC2. By LEfSe analysis, *Agathobacter*, Lachnospiraceae UCG-003, and *Ruminococcus* 2 were consistently observed in various consecutive visits as distinctive taxa associated with cIMT progression, while *Prevotella* 7 and *Allisonella* were linked to non-cIMT progression (data not shown).

DISCUSSION

This study prospectively explores for the first time the longitudinal associations between cIMT progression and gut microbiota composition dynamics in PWH. Our findings reveal that the gut microbiota composition undergoes subtle changes over time in virologically suppressed PWH on ART. While acknowledging the potential involvement of multiple unmeasured factors, our study identified differences in gut microbiome profiles among individuals with HIV in relation to the progression of atherosclerosis. Accordingly, we identified a distinctive signature of gut microbiota consistently linked to cIMT progression.

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/advance-article/doi/10.1093/infdis/jiae243/7672965 by UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ user on 06 September 2024

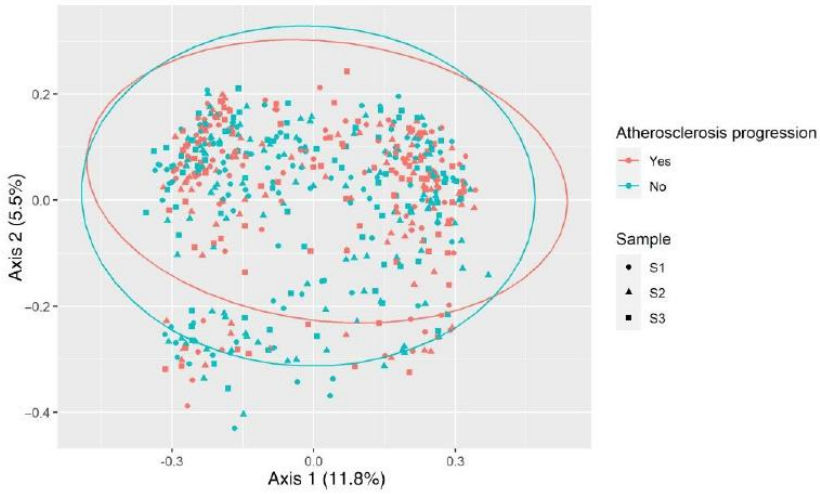


Figure 2. Principal coordinate analysis (PCoA) plots based on Bray–Curtis distance showing the gut microbiota composition. In the analysis using Bray-Curtis distance with the permutational multivariate analysis of variance statistical method and including all sequences, the overall structure of gut bacterial community differed between participants experiencing and those not experiencing carotid intima-media thickness progression, even if the PCoA analysis did not show a clear division between the 2 groups ($P = .03$). The total number of fecal samples was 548, with 191 collected at the baseline visit (S1), 190 at the 48-week visit (S2), and 167 at the 96-week visit (S3).

Little is known about the temporal dynamics of the gut microbiota in PWH with chronic infection. The limited longitudinal studies on gut microbiome in the HIV population, beyond interventions aimed at modifying its composition [25], are circumscribed to specific scenarios, such as acute infection [26], ART initiation [27], or viremic controllers [28]. Our study shows that the composition of the intestinal microbiota of PWH on stable ART undergoes low-magnitude intraindividual and interindividual changes over time. The α-diversity, related to the number and abundance of bacterial taxa, did not differ between groups showing or not showing cIMT progression across the study visits, in line with findings from cross-sectional studies in PWH in relation to the presence of carotid plaque or coronary heart disease [10, 12]. Over the 2-year study period, the gut microbiota experienced subtle changes in α-diversity, with no substantial differences between the groups with or without cIMT progression. Likewise, although no overall substantial alterations in the gut microbial composition were observed during the follow-up period, changes in the relative abundances did occur at phylum, family, and genus levels, usually with the same trends in the 2 groups, as defined by cIMT progression.

To our knowledge, no previous investigations had prospectively analyzed the longitudinal gut microbiome compositional features linked to atherogenesis. While emerging evidence suggests a likely involvement of the gut microbiota in atherosclerosis and cardiovascular disease [5, 6], the relationship of the microbiome with the progression of atherosclerosis in PWH remains largely unknown [29]. The scientific literature addressing the role of microbiota composition in cardiovascular disease in the HIV population is limited to cross-sectional associations [13–16, 29]. Evaluating the gut microbiota composition associated with atherosclerosis progression enables the identification of specific signatures that predict a heightened risk of ulterior adverse outcomes, such as carotid plaque formation or cardiovascular events.

Considering interindividual or β-diversity, we observed significant differences between PWH experiencing cIMT progression and those without progression. Our results diverge from cross-sectional studies [11, 12], where no dissimilarities in β-diversity were found in relation to the presence of coronary heart disease or carotid plaques. Apart from differences in the study design, patient characteristics, and outcomes measured, our study identified a subset of PWH with lower cardiovascular risk, as evidenced by the absence of cIMT progression. This characterization may have contributed to amplifying the divergences in the overall taxonomic composition between the 2 groups.

Our study shows that atherosclerosis progression was consistently associated with a differential signature consisting of enrichment of stool *Agathobacter*, *Ruminococcus* 2, *Parasutterella,* and *Bilophila*, and depletion of *Prevotella* 7. We selected a cohort of virologically suppressed participants with no history of cardiovascular disease on stable ART. The associations with *Agathobacter*, *Ruminococcus* 2, and *Prevotella* 7 were confirmed in successive study visits, and after adjustment for traditional cardiovascular

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/advance-article/doi/10.1093/infdis/jiae243/7672965 by UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ user on 06 September 2024

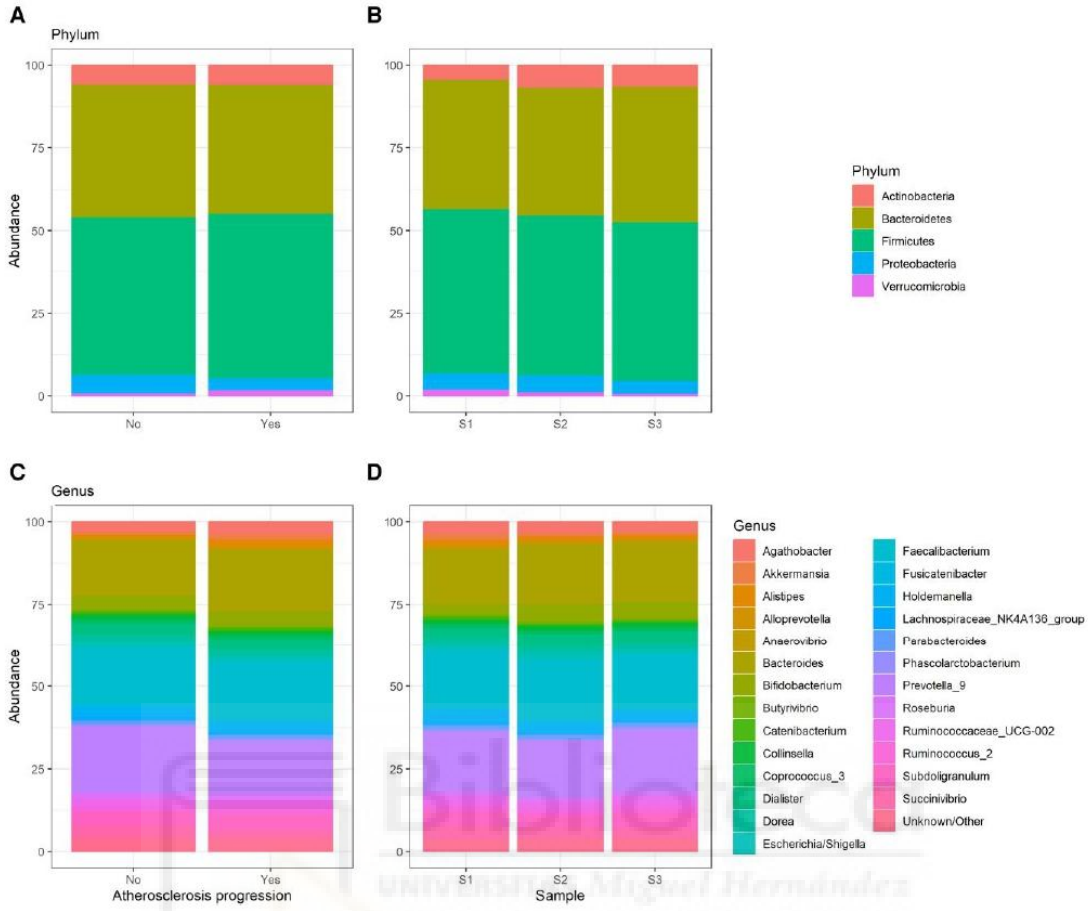


Figure 3. Relative abundances at phylum and genus levels by carotid intima-media thickness (cIMT) progression group and by study visit, respectively. Percentage distribution of abundance of the most abundant taxa. *A, B,* Relative abundances at the phylum level by cIMT progression group (*A*) and by study visit (*B*). *C, D,* Relative abundances at genus level by cIMT progression group (*C*) and by study visit (*D*). The total number of fecal samples was 548, with 191 collected at the baseline visit (S1), 190 at the 48-week visit (S2), and 167 at the 96-week visit (S3).

risk factors and weight, which supports the reliability of results. The genus *Agathobacter*, an anaerobic gram-positive bacterium of the Lachnospiraceae family and Firmicutes phylum, has yielded inconclusive findings with respect to cardiovascular risk in cross-sectional studies. Firmicutes is one of the most abundant phyla composing the intestinal microbiota, and it is critical for the development of an optimally functioning immune system [30]. Studies on *Agathobacter* have revealed positive correlations with proinflammatory cytokines such as interleukin 2 and interleukin 8 [31], and with post–severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 [32], along with inverse associations with diabetes mellitus [33] and aortic arch calcification [34].

Ruminococcus 2 is also an anaerobic, gram-positive gut microbe of the Lachnospiraceae family and Firmicutes phylum. The *Ruminococcus* genus in the anal and gut microbiome has been associated with HIV infection [35] and with biomarkers of inflammation and bacterial translocation, such as lipopolysaccharide [36]. Interestingly, *Ruminococcus, Ruminococcus* 2, and the glycerophospholipid metabolism have been linked to cardiovascular disease and coronary artery disease progression in the general population [37–39]. Moreover, in a study conducted in women, *Ruminococcus* was identified not only as one of the predominant genera associated with HIV but also as one of the top bacterial genera contributing to the gut microbiota glycerophospholipid metabolism pathway [40]. Conversely, additional research supports the anti-inflammatory properties of *Ruminococcus*, as it stimulates the production of short-chain fatty acids that mitigate inflammation by modulating the production of cytokines by

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/advance-article/doi/10.1093/infdis/jiae243/7672965 by UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ user on 06 September 2024

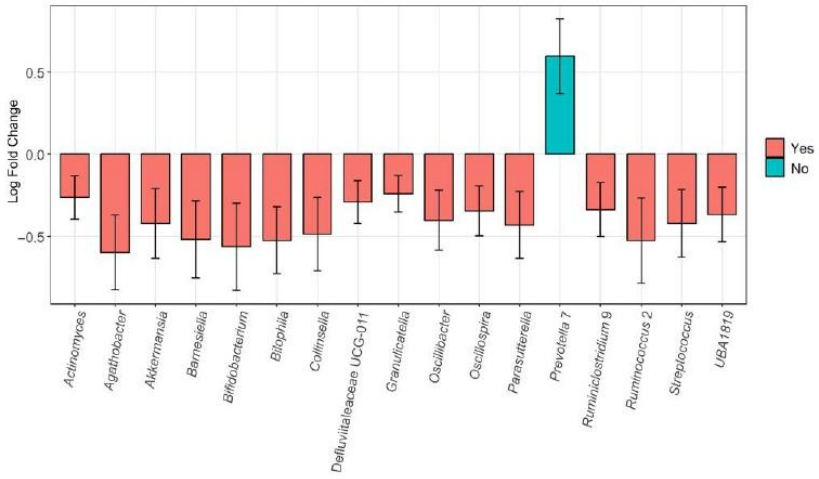


Figure 4. Analysis of composition of microbiomes with bias correction (ANCOM-BC) in relation to carotid intima-media thickness progression, with an adjusted ANCOM-BC2 model for longitudinal data using random effects. Adjustment variables include age, sex, men who have sex with men sexual preference, nadir CD4 cell count, body mass index, hypertension, smoking habit, and hyperlipidemia. Data are represented by effect size (log fold change) and 95% confidence interval bars. The analysis includes 548 fecal samples.

immune cells [41]. *Ruminococcus* has been reported to exhibit an inverse correlation with inflammation/immune activation markers [42] and to be depleted in chronic HIV infection [42].

Participants who did not exhibit cIMT progression showed enrichment of the *Prevotella* genus, which belongs to the Bacteroidetes phylum. In a German study of PWH, *Prevotella* showed a strong negative link with coronary heart disease [10]. *Prevotella* has also been associated with higher CD4 T-cell levels [43], and increased *Prevotella* abundance was reported in PWH receiving INSTIs [44] or after switching to raltegravir [45]. On the contrary, an enrichment of *Prevotella* 2 and *Prevotella* 7 were found in individuals with high cardiovascular risk [46]. Experimental investigations corroborate that elevated levels of *Prevotella* are linked to heightened mucosal inflammation driven by T-helper type 17 cells, resulting in the spread of inflammatory mediators, bacteria, and bacterial products throughout the systemic circulation, potentially influencing the progression of systemic diseases [47]. In addition, a potential role of *Prevotella* in immune dysfunction has been described in PWH through the dysregulation of gut mucosal interferon type I pathways and T-cell response [48].

Persons living with HIV face an elevated risk of cardiovascular disease even in the current era, despite the widespread use of ART and the escalated use of statins [49]. Since the overall benefits of targeting traditional cardiovascular risk factors may be plateauing, there is a need to explore novel factors and strategies to mitigate the excess risk. If our findings were validated, the identification of a microbiota signature linked with atherosclerosis progression might potentially enable the detection of individuals at heightened risk before the onset of the event. Furthermore, this microbiota profile could emerge as a novel target for preventive therapeutic interventions in the future. However, to date, there is no data supporting the efficacy of any intervention targeting the gut microbiome in preventing cardiovascular disease. Therefore, the potential benefits of such interventions remain speculative. Further investigation is needed to explore strategies for preventing the development of cardiovascular disease, which may include interventions aimed at modulating the gut microbiome.

Intraindividual variability due to the diet and environmental influences were not considered for the current analysis, which represents a limitation. Likewise, data regarding the precise control of cardiovascular risk factors throughout the study were not specifically gathered. Our results would not be generalizable to all individuals with HIV due to the inclusion criteria. We used an operational and arbitrary definition of cIMT progression; however, the demographic and metabolic characteristics of participants of each group support the reliability of the classification. Furthermore, a more stringent definition of cIMT progression (≥25%) yielded similar main findings. Our results regarding the microbiota profile and atherosclerosis progression are merely associative, and the observed microbiota findings may be reactive rather than causative.

The main strength of the study is the methodology used, including the prospective longitudinal design with consecutive stool sampling and cIMT measurements, and the inclusion of a large number of participants. The multivariate adjustment for traditional cardiovascular risk factors in the analyses of

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/advance-article/doi/10.1093/infdis/jiae243/7672965 by UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ user on 06 September 2024

the relationship of the microbiota composition and cIMT progression, the inclusion of a substantial number of sequentially obtained stool samples, and the identification of microbiota signatures consistently associated with atherosclerosis progression at various time points all contribute to the robustness of the obtained results.

In conclusion, within the dynamic ecosystem of the gut microbiota in PWH, the microbial composition differs according to the progression of subclinical atherosclerosis. Our results help expand the understanding of the interplay between atherosclerosis and the microbiota.

Supplementary Data

Supplementary materials are available at *The Journal of Infectious Diseases* online (http://jid.oxfordjournals.org/). Supplementary materials consist of data provided by the author that are published to benefit the reader. The posted materials are not copyedited. The contents of all supplementary data are the sole responsibility of the authors. Questions or messages regarding errors should be addressed to the author.

Notes

Financial support. This work was supported by the Spanish National Plan for Scientific and Technical Research and Innovation, European Regional Development Fund and Instituto de Salud Carlos III (grants PI16/01740, PI18/01861, CM19/00160, CM20/00066, CM21/00186, CM22/00026, and PI22/01949); Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación and European Union—NextGenerationEU-European Union (grant CB21/13/00011); Universidad Miguel Hernandez y Fundacion para el Fomento de la Investigacion Sanitaria y Biomedica de la Comunidad Valenciana (UMH-FISABIO), Generalitat Valenciana (grant A-32 2020); Conselleria de Innovación, Universidades, Ciencia y Sociedad Digital, Generalitat Valenciana (grant AICO/2021/205).

Potential conflicts of interest. All authors: No reported conflicts. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

1. Weber MSR, Duran Ramirez JJ, Hentzien M, et al. Time trends in causes of death in people with HIV: insights from the Swiss HIV cohort study. Clin Infect Dis doi:10.1093/cid/ciae014. Published 12 January 2024.
2. Shah ASV, Stelzle D, Lee KK, et al. Global burden of atherosclerotic cardiovascular disease in people living with HIV: systematic review and meta-analysis. Circulation **2018**; 138:1100–12.
3. Freiberg MS, Chang CC, Kuller LH, et al. HIV infection and the risk of acute myocardial infarction. JAMA Intern Med **2013**; 173:614–22.
4. Kobiyama K, Ley K. Atherosclerosis. Circ Res **2018**; 123: 1118–20.
5. Jonsson AL, Bäckhed F. Role of gut microbiota in atherosclerosis. Nat Rev Cardiol **2017**; 14:79–87.
6. Kazemian N, Mahmoudi M, Halperin F, Wu JC, Pakpour S. Gut microbiota and cardiovascular disease: opportunities and challenges. Microbiome **2020**; 8:36.
7. Grammatopoulos K, Antoniou VD, Mavrothalassitis E, et al. Association of gut microbiota composition and their metabolites with subclinical atheromatosis: a systematic review. Am Heart J Plus **2022**; 23:100219.
8. Alzahrani J, Hussain T, Simar D, et al. Inflammatory and immunometabolic consequences of gut dysfunction in HIV: parallels with IBD and implications for reservoir persistence and non-AIDS comorbidities. EBioMedicine **2019**; 46:522–31.
9. Noguera-Julian M, Rocafort M, Guillén Y, et al. Gut microbiota linked to sexual preference and HIV infection. EBioMedicine **2016**; 5:135–46.
10. Kehrmann J, Menzel J, Saeedghalati M, et al. Gut microbiota in human immunodeficiency virus–infected individuals linked to coronary heart disease. J Infect Dis **2019**; 219: 497–508.
11. El-Far M, Durand M, Turcotte I, et al. Upregulated IL-32 expression and reduced gut short chain fatty acid caproic acid in people living with HIV with subclinical atherosclerosis. Front Immunol **2021**; 12:664371.
12. Wang Z, Peters BA, Usyk M, et al. Gut Microbiota, plasma metabolomic profiles, and carotid artery atherosclerosis in HIV infection. Arterioscler Thromb Vasc Biol **2022**; 42: 1081–93.
13. Luo K, Wang Z, Peters BA, et al. Tryptophan metabolism, gut microbiota, and carotid artery plaque in women with and without HIV infection. AIDS **2024**; 38:223–33.
14. Chen L, Wang D, Garmaeva S, et al. The long-term genetic stability and individual specificity of the human gut microbiome. Cell **2021**; 184:2302–15.
15. Olsson LM, Boulund F, Nilsson S, et al. Dynamics of the normal gut microbiota: a longitudinal one-year population study in Sweden. Cell Host Microbe **2022**; 30:726–39.
16. Holzhausen EA, Nikodemova M, Deblois CL, et al. Assessing the impact of storage time on the stability of stool microbiota richness, diversity, and composition. Gut Pathog **2021**; 13:75.
17. Ryom L, Lundgren JD, El-Sadr W, et al. Cardiovascular disease and use of contemporary protease inhibitors: the D:A:D international prospective multicohort study. Lancet HIV **2018**; 5:e291–300.

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/advance-article/doi/10.1093/infdis/jiae243/7672965 by UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ user on 06 September 2024

18. Gutiérrez F, Bernal E, Padilla S, Hernández I, Masiá M. Relationship between ankle-brachial index and carotid intima-media thickness in HIV-infected patients. AIDS **2008**; 22:1369–71.
19. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Res **2013**; 41:D590–6.
20. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. Nat Methods **2016**; 13:581–3.
21. McMurdie PJ, Holmes S. Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. PLoS One **2013**; 8:e61217.
22. Oksanen J, Simpson G, Blanchet F, et al. vegan: Community ecology package. Version 2.6–4. 2022. https://CRAN.R-project.org/package=vegan. Accessed.2024-01-03.
23. Lin H, Eggesbo M, Peddada SD. Linear and nonlinear correlation estimators unveil undescribed taxa interactions in microbiome data. Nat Commun **2022**; 13:1–16.
24. Lin H, Peddada SD. Analysis of compositions of microbiomes with bias correction. Nat Commun **2020**; 11:1–11.
25. Serrano-Villar S, de Lagarde M, Vázquez-Castellanos J, et al. Effects of immunonutrition in advanced human immunodeficiency virus disease: a randomized placebo-controlled clinical trial (Promaltia study). Clin Infect Dis **2019**; 68:120–30.
26. Rocafort M, Noguera-Julian M, Rivera J, et al. Evolution of the gut microbiome following acute HIV-1 infection. Microbiome **2019**; 7:73.
27. Nowak P, Troseid M, Avershina E, et al. Gut microbiota diversity predicts immune status in HIV-1 infection. AIDS **2015**; 298:2409–18.
28. Borgognone A, Noguera-Julian M, Oriol B, et al. Gut microbiome signatures linked to HIV-1 reservoir size and viremia control. Microbiome **2022**; 10:59.
29. Peters BA, Burk RD, Kaplan RC, Qi Q. The gut microbiome, microbial metabolites, and cardiovascular disease in people living with HIV. Curr HIV/AIDS Rep **2023**; 20: 86–99.
30. Kosiewicz MM, Zirnheld AL, Alard P. Gut microbiota, immunity, and disease: a complex relationship. Front Microbiol **2011**; 2:180.
31. Mingjun Z, Fei M, Zhousong X, et al. 16S rDNA sequencing analyzes differences in intestinal flora of human immunodeficiency virus (HIV) patients and association with immune activation. Bioengineered **2022**; 13:4085–99.
32. Krasaewes K, Chaiwarith R, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Profiles of gut microbiota associated with clinical outcomes in patients with different stages of SARS-CoV-2 infection. Life Sci **2023**; 332:122136.
33. Hu YH, Meyer K, Lulla A, et al. Gut microbiome and stages of diabetes in middle-aged adults: cARDIA microbiome study. Nutr Metab (Lond) **2023**; 20:3.
34. Liu YH, Peng P, Hung WC, et al. Comparative gut microbiome differences between high and low aortic arch calcification score in patients with chronic diseases. Int J Mol Sci **2023**; 24:5673.
35. Zhou Y, Ou Z, Tang X, et al. Alterations in the gut microbiota of patients with acquired immune deficiency syndrome. J Cell Mol Med **2018**; 22:2263–71.
36. Xie Y, Sun J, Wei L, et al. Altered gut microbiota correlate with different immune responses to HAART in HIV-infected individuals. BMC Microbiol **2021**; 21:11.
37. Chen H, Wang Z, Qin M, et al. Comprehensive metabolomics identified the prominent role of glycerophospholipid metabolism in coronary artery disease progression. Front Mol Biosci **2021**; 8:632950.
38. Jie Z, Xia H, Zhong SL, et al. The gut microbiome in atherosclerotic cardiovascular disease. Nat Commun **2017**; 8:845.
39. Ma Y, Zhu L, Ma Z, et al. Distinguishing feature of gut microbiota in Tibetan highland coronary artery disease patients and its link with diet. Sci Rep **2021**; 11:18486.
40. Wang Z, Usyk M, Sollecito CC, et al. Altered gut microbiota and host metabolite profiles in women with human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis **2020**; 71:2345–53.
41. Igudesman D, Crandell JL, Corbin KD, et al. Associations of dietary intake with the intestinal Microbiota and short-chain fatty acids among young adults with type 1 diabetes and overweight or obesity. J Nutr **2023**; 153:1178–88.
42. Dubourg G, Lagier JC, Hüe S, et al. Gut microbiota associated with HIV infection is significantly enriched in bacteria tolerant to oxygen. BMJ Open Gastroenterol **2016**; 3:e000080.
43. Hishiya N, Uno K, Nakano A, et al. Association between the gut microbiome and organic acid profiles in a Japanese population with HIV infection. J Infect Chemother **2024**; 30: 58–66.
44. Baltazar-Díaz TA, Amador-Lara F, Andrade-Villanueva JF, et al. Gut bacterial communities in HIV-infected individuals with metabolic syndrome: effects of the therapy with integrase strand transfer inhibitor-based and protease inhibitor-based regimens. Microorganisms **2023**; 11:951.
45. Hanttu AM, Pekkala S, Satokari R, et al. Gut microbiota alterations after switching from a protease inhibitor or efavirenz to raltegravir in a randomized, controlled study. AIDS **2023**; 37:323–32.
46. Kelly TN, Bazzano LA, Ajami NJ, et al. Gut microbiome associates with lifetime cardiovascular disease risk profile among Bogalusa Heart Study participants. Circ Res **2016**; 119:956–64.
47. Larsen JM. The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease. Immunology **2017**; 151: 363–74.

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/advance-article/doi/10.1093/infdis/jiae243/7672965 by UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ user on 06 September 2024

48. Pinacchio C, Scagnolari C, Iebba V, et al. High abundance of genus *Prevotella* is associated with dysregulation of IFN-I and T cell response in HIV-1-infected patients. AIDS **2020**; 34:1467–73.

49. Rosenson RS, Hubbard D, Monda KL, et al. Excess risk for atherosclerotic cardiovascular outcomes among US adults with HIV in the current era. J Am Heart Assoc **2020**; 9: e013744.

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/advance-article/doi/10.1093/infdis/jiae243/7672965 by UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ user on 06 September 2024

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

Supplementary Figure 1. A, α diversity of baseline stool samples by carotid intima-media thickness progression group using different metrics: observed amplicon sequence variants (ASVs), Shannon, and inverse Simpson indices. P values were calculated using Wilcoxon rank sum test. The analysis includes 191 fecal samples. B, α-diversity of baseline stool samples among carotid intima-media thickness progression groups matched with propensity score by the Framingham risk score, nadir CD4 cell count, men who have sex with men sexual behavior and BMI. The analysis includes 78 fecal samples. C, β diversity in baseline stool samples among carotid intima-media thickness progression groups measured with the divergence index as the average dissimilarity of each sample with respect to the mean group. P values were calculated using Wilcoxon rank sum test. The analysis includes 191 fecal samples. D, linear discriminant (LDA) effect size analysis (LefSe) to identify the genera significantly ($p<0.05$) associated with cIMT progression at the baseline visit. The analysis includes 191 fecal samples.

Supplementary Figure 2. α-diversity among carotid intima-media thickness progression groups matched with propensity score. Matching covariates were the Framingham risk score, nadir CD4 cell count, men who have sex with men sexual behavior and BMI. A, Boxplots indicate α-diversity according to carotid intima-media thickness progression group using different metrics: observed amplicon sequence variants (ASVs), Shannon, and inverse Simpson indices. The analysis includes 39 matched participants in each carotid intima-media thickness progression group, with samples collected across the three visits (224 samples in total). B, α-diversity at the baseline visit among the matched carotid intima-media thickness progression groups. C, α-diversity at the 48-week visit among the matched carotid intima-media thickness progression groups. D, α-diversity at the 96-week visit among the matched carotid intima-media thickness progression groups. P values were calculated using Wilcoxon rank sum test. The number of samples for baseline visit was 78, for 48-week visit 77, and for 96-week visit 69.

Supplementary Figure 3. A Comparison of α-diversity among study visits using observed amplicon sequence variants in participants experiencing carotid intima-media thickness progression. B, Comparison of α-diversity among study visits using observed amplicon sequence variants in participants not experiencing carotid intima-media thickness progression. C, Comparison of α-diversity among study visits using the Shannon index in participants experiencing carotid intima-media thickness progression. D, Comparison of α-diversity among study visits using the Shannon index in participants not experiencing carotid intima-media thickness progression. All P values were calculated using Wilcoxon rank sum test for repeated measures. The analysis includes 548 fecal samples.

Supplementary Figure 4. Box-plots showing the main taxa identified with the Compositions of Microbiomes with Bias Correction 2 (ANCOM-BC2), by subclinical atherosclerosis progression group. A, Agathobacter. B, Ruminococcus_2. C, Bilophila. D, Prevotella_7. P values were calculated using ANCOM-BC2 with longitudinal data and random effects, and adjusting for age, sex, men who have sex with men sexual preference, nadir CD4 cell count, body mass index, hypertension, smoking habit and hyperlipidemia. The analysis includes 548 fecal samples.

Supplementary Table 1. Flow-chart of participants follow-up and sample collection at each visit.

Participants with at least 2 cIMT measurements	Delivery of faecal samples			
	Baseline visit	48-week visit	96-week visit	Total
Participants with 3 available faecal samples	166	166	166	191 participants with at least 2 faecal samples and 2 cIMT measurements
Participants with 2 available faecal samples	1	0	1	
Participants with 2 available faecal samples	24	24	0	
No. of faecal samples	191	190	167	548 faecal samples

Data include participants with at least 2 faecal samples and 2 carotid intima-media thickness measurements.
cIMT, carotid intima-media thickness

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

Supplementary Table 2. Food frequency questionnaire of the study participants by carotid intima-media thickness progression group

	Carotid intima-media thickness progression		
	Yes	No	P value
Patients, no.	87 (45.5)	104 (54.5)	-
DAIRY PRODUCTS			
Whole milk, (1 glass, 200 cc)	0.0 (0.0 to 5.0)	0.0 (0.0 to 5.0)	0.640
Skim milk (1 glass, 200 cc)	0.0 (0.0 to 5.0)	1.0 (0.0 to 5.0)	0.408
Condensed milk (1 tablespoon)	0.0 (0.0 to 0.0)	0.0 (0.0 to 1.0)	0.015
Yogurt (One, 125 grams)	2.0 (1.0 to 3.0)	2.5 (1.0 to 3.0)	0.713
Cottage cheese, curd, fresh cheese (100g)	1.0 (0.0 to 2.0)	1.0 (0.0 to 3.0)	0.037
Cream cheese or cheese portions (One portion)	0.0 (0.0 to 1.0)	0.0 (0.0 to 1.0)	0.436
Aged or semi-aged cheese: Manchego (1 piece)	2.0 (1.0 to 3.0)	2.5 (1.0 to 3.0)	0.509
Custard, flan, pudding (one)	0.0 (0.0 to 2.0)	1.0 (0.0 to 2.0)	0.832
Ice cream (1 cone, cup, or scoop)	1.0 (0.0 to 1.5)	1.0 (0.0 to 1.0)	0.838
EGGS, MEATS, FISH			
Chicken eggs (one)	3.0 (2.0 to 3.0)	3.0 (2.0 to 3.0)	0.436
Chicken with skin (one serving or piece)	1.0 (0.0 to 2.0)	1.0 (0.0 to 2.0)	0.473
Skinless chicken (one serving or piece)	2.0 (1.0 to 3.0)	2.0 (1.0 to 3.0)	0.566
Beef, pork, lamb as main dish (one serving)	2.0 (1.0 to 3.0)	2.0 (1.0 to 3.0)	0.174
Game meat: rabbit, quail, duck (one serving)	0.0 (0.0 to 1.0)	0.0 (0.0 to 1.0)	0.491
Beef, pork, or chicken liver (one serving)	0.0 (0.0 to 1.0)	0.0 (0.0 to 1.0)	0.370
Offal: tripe, brains, sweetbreads (100 g)	0.0 (0.0 to 0.0)	0.0 (0.0 to 0.0)	0.118
Cured meats: ham, salami, mortadella (50g)	2.0 (1.0 to 3.0)	2.0 (2.0 to 3.0)	0.644
Sausages and similar products (one medium)	1.0 (0.0 to 2.0)	1.0 (0.0 to 2.0)	0.776
Pâtés, foie gras (half serving, 50 g)	0.0 (0.0 to 1.0)	0.0 (0.0 to 1.0)	0.307
Hamburger (one, 100 g)	1.0 (0.0 to 2.0)	1.0 (0.0 to 2.0)	0.007
Bacon (two slices, 50 g)	0.0 (0.0 to 2.0)	0.0 (0.0 to 1.0)	0.155
Assorted fried fish (one serving or portion)	1.0 (0.0 to 2.0)	1.0 (0.0 to 2.0)	0.413
Boiled fish:hake,sole,sardines, tuna (one serving)	2.0 (0.3 to 2.0)	1.0 (0.0 to 2.0)	0.721
Salted fish: cod, anchovies (half serving, 50 g)	0.0 (0.0 to 1.0)	0.0 (0.0 to 1.0)	0.058
Canned fish: tuna, sardines, herrings (one can)	2.0 (1.0 to 3.0)	1.0 (1.0 to 3.0)	0.361
Clams, mussels, oysters (one serving, 100 g)	0.5 (0.0 to 1.0)	1.0 (0.0 to 1.0)	0.990
Squid, octopus (one serving, 100 g)	1.0 (0.0 to 1.0)	0.0 (0.0 to 1.0)	0.241
Shellfish: shrimp, lobster, and similar (100 g)	0.0 (0.0 to 1.0)	0.5 (0.0 to 1.0)	0.959
VEGETABLES AND LEGUMES			
Cooked spinach (one serving)	1.0 (0.0 to 2.0)	0.5 (0.0 to 1.0)	0.210
Cooked cabbage, cauliflower, broccoli (one serv.)	1.0 (0.0 to 2.0)	1.0 (0.0 to 2.0)	0.237
Lettuce, endives, escarole (one serving)	3.0 (2.0 to 4.0)	3.0 (2.0 to 4.0)	0.070
Tomatoes (one medium)	3.0 (2.0 to 4.0)	3.0 (3.0 to 4.0)	0.479
Onion (one medium)	3.0 (2.0 to 3.5)	3.0 (2.0 to 4.0)	0.546
Carrot, pumpkin (one or small serving)	2.0 (1.0 to 3.0)	2.0 (1.0 to 3.0)	0.92
Cooked green beans (one serving)	1.5 (1.0 to 2.0)	2.0 (0.0 to 2.0)	0.553
Eggplants, zucchinis, cucumbers (one)	1.0 (1.0 to 2.0)	2.0 (1.0 to 3.0)	0.430
Bell peppers (one)	2.0 (1.0 to 2.0)	2.0 (1.0 to 3.0)	0.080
Asparagus (one serving or portion)	1.0 (0.0 to 2.0)	1.0 (0.0 to 2.0)	0.408
Mushrooms (one serving)	1.0 (1.0 to 2.0)	1.0 (1.0 to 2.0)	0.800
Cooked legumes: lentils, chickpeas, kidney beans	2.0 (2.0 to 3.0)	2.0 (2.0 to 3.0)	0.816
Cooked peas (one serving)	1.0 (0.0 to 2.0)	1.0 (0.0 to 2.0)	0.918
FRUITS			
Oranges, grapefruit, mandarins (One)	2.0 (1.0 to 3.0)	2.0 (1.0 to 3.0)	0.080
Fresh orange juice (one small glass, 125 cc)	1.0 (0.0 to 3.0)	2.0 (1.0 to 3.0)	0.114
Banana (one)	3.0 (2.0 to 4.0)	3.0 (1.0 to 4.0)	0.321
Apple, pear (one medium)	2.0 (1.0 to 3.0)	2.0 (0.0 to 3.0)	0.511
Strawberries (one serving or dessert cup)	1.0 (0.0 to 2.0)	1.0 (0.0 to 2.0)	0.821
Cherries (one serving or dessert cup)	1.0 (0.0 to 1.0)	1.0 (0.0 to 2.0)	0.494
Peach, apricots (one medium)	1.0 (0.0 to 2.0)	0.0 (0.0 to 2.0)	0.481
Fresh figs (one)	0.0 (0.0 to 1.0)	0.0 (0.0 to 2.0)	0.576
Watermelon, cantaloupe (one slice)	2.0 (1.0 to 3.0)	2.0 (0.0 to 3.0)	0.974

Grapes (one medium bunch or dessert plate)	1.0 (0.0 to 2.0)	1.0 (0.0 to 2.0)	0.229
Olives (small serving or plate)	2.0 (1.0 to 3.0)	1.0 (1.0 to 3.0)	0.317
Fruit in syrup: peach, pears, pineapple (2 halves)	0.0 (0.0 to 1.0)	0.0 (0.0 to 1.0)	0.332
Dried fruits: pine nuts, almonds (one serving)	2.0 (1.0 to 3.0)	3.0 (1.0 to 4.0)	0.238
BREAD, CEREALS, AND SIMILAR			
White bread (One small piece or 3 slices)	5.0 (3.0 to 5.8)	4.5 (1.3 to 5.0)	0.077
Whole wheat bread (One small piece or 3 slices)	1.0 (0.0 to 4.0)	1.0 (0.0 to 4.0)	0.878
Breadsticks, crackers, and similar items (one unit)	0.0 (0.0 to 1.0)	0.0 (0.0 to 1.0)	0.687
French fries (one serving, 100 g)	1.0 (0.0 to 2.0)	1.0 (0.0 to 2.0)	0.692
Boiled, baked potatoes (one medium potato)	2.0 (2.0 to 3.0)	2.0 (1.0 to 2.0)	0.008
Bag of potato chips (one small bag, 25-30 g)	1.0 (0.0 to 2.0)	1.0 (0.0 to 2.0)	0.926
Cooked rice (one medium plate)	2.0 (2.0 to 3.0)	3.0 (2.0 to 3.0)	0.642
Pasta: spaghetti, macaroni (one plate)	2.0 (2.0 to 3.0)	2.0 (2.0 to 3.0)	0.424
OILS AND FATS			
Olive oil (1 tablespoon)	5.0 (5.0 to 6.0)	5.0 (4.0 to 6.0)	0.244
Other vegetable oils: sunflower (1 tablespoon)	0.0 (0.0 to 2.0)	0.0 (0.0 to 2.0)	0.823
Margarine added to bread or food (1 tablespoon)	0.0 (0.0 to 1.0)	0.0 (0.0 to 1.0)	0.457
Butter added to bread or food (1 tablespoon)	0.0 (0.0 to 2.0)	0.0 (0.0 to 1.0)	0.182
Lard (pork) added to bread or food (1 tablespoon)	0.0 (0.0 to 0.0)	0.0 (0.0 to 0.0)	0.310
SWEETS AND PASTRIES			
Maria biscuits (1 biscuit)	1.0 (0.0 to 3.0)	1.0 (0.0 to 3.0)	0.882
Chocolate biscuits (1 double biscuit)	0.0 (0.0 to 1.0)	0.0 (0.0 to 1.0)	0.673
Croissant, doughnuts (one)	1.0 (0.0 to 2.0)	1.0 (0.0 to 1.0)	0.358
Muffin, sponge cake (one)	1.0 (0.0 to 3.0)	1.0 (0.0 to 2.0)	0.532
Cakes, pie (unit or medium slice)	0.0 (0.0 to 1.0)	1.0 (0.0 to 1.0)	0.230
Churros (fried dough), 1 serving	0.0 (0.0 to 0.5)	0.0 (0.0 to 0.0)	0.538
Chocolate, chocolates (one bar or two chocolates)	1.0 (0.0 to 3.0)	1.0 (0.0 to 2.0)	0.865
Cocoa powder and similar (1 tablespoon)	0.0 (0.0 to 2.0)	0.0 (0.0 to 2.0)	0.271
DRINKS			
White, red, or rosé wine (1 glass, 125 cc)	1.0 (0.0 to 2.0)	1.0 (0.0 to 2.0)	0.523
Beer (one draft or small bottle, 200 cc)	1.0 (0.0 to 3.0)	2.0 (0.0 to 3.0)	0.909
Brandy, gin, rum, whiskey, vodka, 40° (1 shot)	0.0 (0.0 to 0.0)	0.0 (0.0 to 1.0)	0.149
Carbonated soft drinks: cola, orange, lemon (one)	1.0 (0.0 to 3.0)	1.5 (0.0 to 3.0)	0.137
Packaged fruit juice (1 small can or glass, 200 cc)	0.0 (0.0 to 2.0)	1.0 (0.0 to 3.0)	0.159
Coffee (1 cup)	5.0 (1.8 to 6.0)	5.0 (3.0 to 6.0)	0.117
Decaffeinated coffee (1 cup)	0.0 (0.0 to 2.0)	0.0 (0.0 to 1.0)	0.675
Tea (1 cup)	0.0 (0.0 to 3.0)	0.0 (0.0 to 2.0)	0.105
PRECOOKED, PRE-PREPARED, AND MISCELLANEOUS			
Croquettes (one)	0.0 (0.0 to 1.0)	0.0 (0.0 to 1.0)	0.224
Fried fish sticks or delights (one unit)	0.0 (0.0 to 0.0)	0.0 (0.0 to 1.0)	0.909
Packaged soups and cream soups (one serving)	0.0 (0.0 to 1.0)	0.0 (0.0 to 1.0)	0.159
Mayonnaise (one tablespoon)	1.0 (0.0 to 2.0)	1.0 (0.0 to 2.0)	0.697
Tomato sauce (half a cup)	1.0 (0.0 to 3.0)	1.0 (0.0 to 2.0)	0.554
Spices: Tabasco, pepper, chili (half a teaspoon)	0.5 (0.0 to 2.0)	0.0 (0.0 to 1.0)	0.075
Salt (one pinch or two-finger pinch)	5.0 (3.0 to 6.0)	5.0 (3.0 to 6.0)	0.678
Garlic (one clove)	3.0 (2.0 to 4.0)	3.0 (1.0 to 4.0)	0.567
Jams, honey (one tablespoon)	1.0 (0.0 to 3.0)	1.0 (0.0 to 2.0)	0.565
Sugar (e.g., in coffee, desserts, etc) (one teaspoon)	5.0 (1.0 to 6.0)	5.0 (0.0 to 6.0)	0.530
Plant-based milk: soy, rice, oat, almond	0.0 (0.0 to 0.8)	0.0 (0.0 to 1.0)	0.805

Data are expressed as median (interquartile range). Mann-Whitney U test was used for group comparison. For each food item, the number of units consumed per day is shown.

Supplementary Table 3. Shortened dietary questionnaire of the study participants in relation to the progression of carotid intima-media thickness.

	Carotid intima-media thickness progression		
	Yes	No	P value
Patients, no.	87 (45.5)	104 (54.5)	-
Dairy products	1.91 (1.14 to 4.07)	1.95 (1.13 - 3.37)	0.888
Eggs, Meat, and Seafood	2.04 (1.62 to 2.99)	2.19 (1.52 - 2.92)	0.478
Vegetables and legumes	2.41 (1.63 to 3.83)	3.11 (2.05 - 4.45)	0.099
Fruits	2.42 (1.70 to 4.04)	2.59 (1.50 - 4.36)	0.796
Pasta	2.35 (1.63 to 3.55)	2.03 (1.58 - 3.17)	0.167
Oils	2.50 (1.00 to 2.78)	1.81 (1.00 - 2.64)	0.152
Cookies and Chocolates	0.84 (0.27 to 1.85)	0.98 (0.34 - 1.57)	0.849
Alcohol and Coffee	2.78 (1.57 to 3.81)	2.70 (1.63 - 3.88)	0.937
Fried and Processed Foods	3.35 (2.13 to 5.37)	2.99 (2.12 - 4.53)	0.507

Data are expressed as median (interquartile range). Mann-Whitney U test was used for group comparison. For each food item, the number of units consumed per day is shown.

Supplementary Table 4. Physical activity by carotid intima-media thickness progression group

	No cIMT progression	cIMT progression	All participants	P
Total N (%)	N=103 (54.21)	N=87 (45.79)	N=190	
No. of days of intense physical activity last week	0.0 (0.0- 2.9)	0.0 (0.0 to 1.0	0.0 (0.0-2.0)	0.127
Minutes a day of intense physical activity	60 (0.0-63.8)	32.5 (0.0-82.5)	50 (0.0-71.3)	0.580
No. of days of moderate physical activity last week	2 (0-5)	0.5 (0-5)	2 (0-5)	0.646
Minutes a day of intense physical activity	60 (30-90)	60 (0-90)	60 (30-90)	0.346
No. of days walking 10 min. straight last week	7.0 (5.0-7.0)	6.3 (4.4-7.0)	7.0 (4.5- 7.0)	0.561
No. minutes you walk daily	60 (20-90)	60 (30-120)	60 (30-90)	0.135
Minutes spent sitting on a workday in the last week	190 (120-390)	80 (60-250)	180 (60-360)	0.129
MET / week	1386 (231-4118)	1638 (471-3735)	1386 (334-4072)	0.659

Data are expressed as median (interquartile range). Mann-Whitney U test was used for group comparison. cIMT, carotid intima-media thickness; MET, metabolic equivalent of task. MET represents the energy expended during various activities relative to sitting quietly, which is defined as one MET. Physical activities can be rated using METs to indicate their intensity. Moderate physical activity: ≥600 METS; intense physical activity ≥1500 MET.

Supplementary Table 5. Beta diversity of baseline stool samples by carotid intima-media thickness progression group with the PERMANOVA statistical method

	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F.Model	R2	Pr(>F)
cIMT progression	1	0.3641008	0.3641008	0.9334062	0.004914387	0.57
Residuals	189	73.7246580	0.3900776	*NA*	0.995085613	*NA*
Total	190	74.0887588	*NA*	*NA*	1.000	

cIMT, carotid intima-media thickness

Supplementary Table 6. Final generalized linear model (GLM) results for the variables significantly associated with carotid intima-media thickness progression including different metrics to evaluate the α diversity

Explanatory variable	OR (multivariable)	P
Observed amplicon sequence variants		
α diversity (observed)	1.00 (1.00-1.00)	0.891
Framingham risk score	1.10 (1.07-1.13)	<0.001
HIV risk factor other than MSM	1.82 (1.23-2.69)	0.003
CD4 cell count nadir	1.00 (1.00-1.00)	0.334
BMI	1.04 (0.98-1.09)	0.203
Shannon index		
α diversity (Shannon)	0.92 (0.73-1.16)	0.482
Framingham risk score	1.10 (1.07-1.13)	<0.001
HIV risk factor other than MSM	1.82 (1.24-2.70)	0.002
CD4 cell count nadir	1.00 (1.00-1.00)	0.337
BMI	1.04 (0.98-1.09)	0.212
Inverted Simpson index		
α diversity (inverted Simpson)	1.00 (1.00-1.01)	0.582
Framingham risk score	0.91 (0.88-0.93)	<0.001
HIV risk factor other than MSM	0.55 (0.37-0.81)	0.002
CD4 cell count nadir	1.00 (1.00-1.00)	0.346
BMI	0.97 (0.91-1.02)	0.218

Generalized linear model to evaluate the adjusted association between different indices of α diversity and the carotid intima-media thickness progression. The model was adjusted for the Framingham risk score, nadir CD4 cell count, men who have sex with men sexual behavior and body mass index. MSM, men who have sex with men; BMI, body mass index; OR, odds ratio

Biblioteca

Supplementary Table 7. Relative abundances at phyla level by carotid intima-media thickness progression group

Phylum	All	cIMT progression	No cIMT progression	P
Firmicutes	59.9	60.8	59.9	p<0.001
Bacteroidetes	30.6	29.6	30.6	p<0.001
Proteobacteria	4.2	42.2	4.2	0.389
Actinobacteria	3.4	3.5	3.4	0.120
Tenericutes	0.5	0.5	0.5	0.095
Cyanobacteria	0.3	0.3	0.3	0.056
Verrucomicrobia	0.2	0.2	0.2	0.160
Euryarchaeota	0.2	0.2	0.2	0.296
Lentisphaerae	0.2	0.2	0.2	0.788
Fusobacteria	0.1	0.1	0.1	0.738
Patescibacteria	0.1	0.1	0.1	0.946
Epsilonbacteraeota	0.1	0.1	0.1	0.187
Spirochaetes	0.1	0.1	0.1	0.129
Elusimicrobia	0.1	0.0	0.1	0.468
Synergistetes	0.1	0.0	0.1	0.521
Kiritimatiellaeota	0.0	0.0	0.0	0.026

Data are expressed in %. P values were calculated the chi square. cIMT, carotid intima-media thickness.

Suppl. Table 8. Relative abundances at phyla level by study visit

8A. All participants

Phylum	Sample 1, %	Sample 2, %	Sample, 3%	p-value, Friedman
k__Bacteria;p__Firmicutes	49.5	50.8	50.6	0.32
k__Bacteria;p__Bacteroidota	37.0	39.2	38.6	0.072
k__Bacteria;p__Actinobacteriota	6.0	3.7	3.9	p<0.001
k__Bacteria;p__Proteobacteria	5.5	4.5	4.4	0.038
k__Bacteria;p__Verrucomicrobiota	0.7	0.7	0.8	p<0.001
k__Bacteria;p__Desulfobacterota	0.6	0.5	0.7	p<0.001
k__Archaea;p__Euryarchaeota	0.3	0.2	0.2	0.562
k__Bacteria;p__Spirochaetota	0.1	0.1	0.2	p<0.001
k__Bacteria;p__Cyanobacteria	0.1	0.1	0.2	p<0.001
k__Bacteria;p__Fusobacteriota	0.1	0.0	0.2	p<0.001

Sample 1, baseline sample; Sample 2, 48-week sample; Sample 3, 96-week sample

Biblioteca UNIVERSITAS Miguel Hernández

8B. Participants exhibiting carotid intima-media thickness progression

Phylum	Sample 1, %	Sample 2, %	Sample 3, %	p-value, Friedman
k__Bacteria;p__Firmicutes	50.3	51.4	51.0	0.688
k__Bacteria;p__Bacteroidota	35.7	38.6	38.1	0.063
k__Bacteria;p__Actinobacteriota	6.6	3.5	3.8	p<0.001
k__Bacteria;p__Proteobacteria	5.3	4.5	4.6	0.094
k__Bacteria;p__Verrucomicrobiota	1.0	0.8	0.8	0.059
k__Bacteria;p__Desulfobacterota	0.7	0.5	0.7	p<0.001
k__Archaea;p__Euryarchaeota	0.2	0.2	0.1	0.921
k__Bacteria;p__Cyanobacteria	0.1	0.1	0.2	0.014
k__Bacteria;p__Fusobacteriota	0.1	0.0	0.2	0.261

Sample 1, baseline sample; Sample 2, 48-week sample; Sample 3, 96-week sample

8C. Participants not exhibiting carotid intima-media thickness progression

Phylum	Sample 1, %	Sample 2, %	Sample 3, %	p-value, Friedman
k__Bacteria;p__Firmicutes	48.5	50.5	50.4	0.322
k__Bacteria;p__Bacteroidota	38.5	39.8	39.0	0.464
k__Bacteria;p__Proteobacteria	5.8	4.6	4.3	0.295
k__Bacteria;p__Actinobacteriota	5.4	3.9	3.9	0.005
k__Bacteria;p__Desulfobacterota	0.6	0.4	0.7	0.002
k__Archaea;p__Euryarchaeota	0.4	0.2	0.2	0.521
k__Bacteria;p__Verrucomicrobiota	0.4	0.5	0.9	p<0.001
k__Bacteria;p__Spirochaetota	0.2	0.0	0.1	p<0.001
k__Bacteria;p__Cyanobacteria	0.1	0.0	0.2	p<0.001
k__Bacteria;p__Fusobacteriota	0.1	0.0	0.1	p<0.001

Sample 1, baseline sample; Sample 2, 48-week sample; Sample 3, 96-week sample

Suppl. Table 9. Relative abundances at genus level by carotid intima-media thickness progression group

Genus	All	cIMT progression	No cIMT progression	P
Prevotella_9	10,1	9,2	10,9	p<0.001
Bacteroides	6,4	6,4	6,4	0.898
Faecalibacterium	4,0	3,9	4,1	0.097
Parabacteroides	2,4	2,5	2,4	0.001
Prevotella_2	2,3	2,3	2,2	0.222
Ruminococcaceae_UCG-002	2,1	2,2	2,0	0.033
Christensenellaceae_R-7_group	1,9	2,0	1,8	0.013
Alistipes	1,8	2,0	1,7	p<0.001
Blautia	1,7	1,7	1,6	0.050
Ruminococcaceae_UCG-014	1,6	1,7	1,6	0.502
Lachnoclostridium	1,5	1,5	1,5	0.082
Lachnospiraceae_NK4A136_group	1,5	1,5	1,4	0.367
Subdoligranulum	1,4	1,4	1,4	0.688
Lachnospira	1,4	1,4	1,4	0.930

Streptococcus	1,3	1,4	1,3	0.223
Ruminococcaceae_UCG-005	1,3	1,4	1,3	0.001
Roseburia	1,3	1,3	1,2	0.999
Agathobacter	1,2	1,3	1,2	0.061
Alloprevotella	1,2	1,1	1,2	p<0.001
Dorea	1,1	1,1	1,1	0.674
Bifidobacterium	1,1	1,1	1,1	0.879
Phascolarctobacterium	1,1	1,1	1,1	0.259
Ruminococcaceae_UCG-010	1,0	1,1	1,0	0.044
Holdemanella	1,0	0,9	1,0	0.101
Sutterella	1,0	0,9	1,0	0.028
Ruminococcus_1	0,9	0,9	0,9	1.000
Ruminococcaceae_NK4A214_group	0,9	0,9	0,9	0.448
Dialister	0,8	0,9	0,9	0.629
Ruminiclostridium_5	0,8	0,8	0,8	0.004
Megasphaera	0,8	0,8	0,8	0.230
Ruminiclostridium_9	0,8	0,8	0,8	0.024
Rikenellaceae_RC9_gut_group	0,7	0,7	0,7	0.612
Paraprevotella	0,7	0,7	0,7	0.224
Catenibacterium	0,7	0,7	0,7	0.265
Family_XIII_AD3011_group	0,7	0,7	0,7	0.347
Oscillibacter	0,7	0,7	0,7	0.339
Butyricicoccus	0,6	0,7	0,6	0.860
Acidaminococcus	0,6	0,6	0,6	0.003
Butyricimonas	0,6	0,6	0,6	0.011
Succinivibrio	0,6	0,6	0,6	0.078
Desulfovibrio	0,6	0,6	0,6	0.666
Ruminococcus_2	0,6	0,6	0,6	0.466
Mitsuokella	0,6	0,6	0,6	0.428
Ruminococcaceae_UCG-013	0,6	0,6	0,6	0.620
Ruminococcaceae_UCG-003	0,6	0,6	0,6	0.499
Prevotella_7	0,5	0,5	0,6	p<0.001
Collinsella	0,5	0,5	0,5	0.232
Coprococcus_3	0,5	0,5	0,5	0.915
Ruminiclostridium_6	0,5	0,5	0,5	0.621
Intestinimonas	0,5	0,5	0,5	0.343
Odoribacter	0,5	0,5	0,5	0.747
Coprococcus_2	0,5	0,5	0,5	0.366
Lachnospiraceae_UCG-010	0,4	0,4	0,4	0.898
Fusicatenibacter	0,4	0,4	0,4	0.283
Lachnospiraceae_ND3007_group	0,4	0,4	0,4	0.619
Prevotellaceae_NK3B31_group	0,4	0,4	0,4	0.772
Lachnospiraceae_UCG-004	0,4	0,4	0,4	0.556
Oribacterium	0,4	0,4	0,4	0.783
Flavonifractor	0,3	0,4	0,4	0.069
Erysipelotrichaceae_UCG-003	0,3	0,4	0,3	0.318
Barnesiella	0,3	0,4	0,3	0.157
Escherichia/Shigella	0,3	0,4	0,3	0.625

Biblioteca Universitas Miguel Hernández

Clostridium_sensu_stricto_1	0,3	0,3	0,3	0.039
Bilophila	0,3	0,3	0,3	0.070
Allisonella	0,3	0,3	0,3	0.011
Parasutterella	0,3	0,3	0,3	p<0.001
Ruminococcaceae_UCG-009	0,3	0,3	0,3	0.895
Negativibacillus	0,3	0,3	0,3	0.559
Anaerostipes	0,3	0,3	0,3	0.391
Senegalimassilia	0,3	0,3	0,3	0.164
Lactobacillus	0,3	0,3	0,3	0.688
Coprococcus_1	0,3	0,3	0,3	0.435
Romboutsia	0,3	0,3	0,3	0.703
UBA1819	0,2	0,2	0,2	0.105
Solobacterium	0,2	0,2	0,2	0.947
Veillonella	0,2	0,2	0,2	0.003
Slackia	0,2	0,2	0,2	0.802
Family_XIII_UCG-001	0,2	0,2	0,2	0.821
Lachnospiraceae_UCG-001	0,2	0,2	0,2	0.808
Candidatus_Soleaferrea	0,2	0,2	0,2	0.658
Ruminococcaceae_UCG-004	0,2	0,2	0,2	0.194
Butyrivibrio	0,2	0,2	0,2	0.695
Erysipelatoclostridium	0,2	0,2	0,2	0.881
Howardella	0,2	0,2	0,2	0.334
GCA-900066575	0,2	0,2	0,2	0.438
Methanobrevibacter	0,2	0,2	0,2	0.627
Caproiciproducens	0,2	0,2	0,2	0.354
Olsenella	0,2	0,2	0,2	0.179
Defluviitaleaceae_UCG-011	0,2	0,2	0,2	0.111
Catenisphaera	0,2	0,2	0,2	0.088
Coprobacter	0,2	0,2	0,2	0.931
Holdemania	0,2	0,2	0,2	0.946
Anaerovibrio	0,2	0,2	0,2	0.846
GCA-900066225	0,2	0,2	0,2	0.853
Pygmaiobacter	0,2	0,2	0,2	0.530
Klebsiella	0,2	0,2	0,2	0.006
Enterorhabdus	0,2	0,2	0,2	0.817
Oscillospira	0,2	0,1	0,1	0.014
Lachnospiraceae_FCS020_group	0,1	0,1	0,1	0.567
Marvinbryantia	0,1	0,1	0,1	0.232
Haemophilus	0,1	0,1	0,1	0.266
Akkermansia	0,1	0,1	0,1	0.025
DTU089	0,1	0,1	0,1	0.282
Peptococcus	0,1	0,1	0,1	0.071
CAG-56	0,1	0,1	0,1	0.538
Libanicoccus	0,1	0,1	0,1	0.210
Fusobacterium	0,1	0,1	0,1	0.233
Actinomyces	0,1	0,1	0,1	0.108
Lachnospiraceae_NK3A20_group	0,1	0,1	0,1	0.490
Erysipelotrichaceae_UCG-004	0,1	0,1	0,1	0.269

Biblioteca Universitaria Miguel Hernández

Turicibacter	0,1	0,1	0,1	0.059
Oxalobacter	0,1	0,1	0,1	0.363
Faecalitalea	0,1	0,1	0,1	0.069
Megamonas	0,1	0,1	0,1	0.417
Anaerotruncus	0,1	0,1	0,1	0.413
Erysipelotrichaceae_UCG-006	0,1	0,1	0,1	0.906
Fournierella	0,1	0,1	0,1	0.640
Granulicatella	0,1	0,1	0,1	0.025
Intestinibacter	0,1	0,1	0,1	0.545
Gemella	0,1	0,1	0,1	0.204
Lachnospiraceae_UCG-008	0,1	0,1	0,1	0.739
Prevotella	0,1	0,1	0,1	0.814
Prevotellaceae_UCG-003	0,1	0,1	0,1	0.659
Catabacter	0,1	0,1	0,1	0.908
FD2005	0,1	0,1	0,1	0.002
Sellimonas	0,1	0,1	0,1	0.934
Tyzzerella	0,1	0,1	0,1	0.608
Victivallis	0,1	0,1	0,1	0.990
Tyzzerella_3	0,1	0,1	0,1	1.000
Campylobacter	0,1	0,1	0,1	0.544
Asteroleplasma	0,1	0,1	0,1	0.862
Merdibacter	0,1	0,1	0,1	0.786
Eisenbergiella	0,1	0,1	0,1	0.697
Elusimicrobium	0,1	0,1	0,1	0.468
Enterobacter	0,1	0,1	0,1	0.637
Gordonibacter	0,1	0,1	0,1	0.295
Coriobacteriaceae_UCG-003	0,1	0,1	0,1	1.000
Eggerthella	0,1	0,1	0,1	0.293

Data are expressed in %. P values were calculated the chi square. cIMT, carotid intima-media thickness.

Biblioteca
Universitas Miguel Hernández

Suppl. Table 10. Relative abundances at genus level by study visit

10A. All participants

Genus	Sample 1, %	Sample 2, %	Sample 3, %	p-value, Friedman
Prevotella_9	17,0	18,5	16,2	0.464
Bacteroides	15,4	15,5	12,8	0.368
Faecalibacterium	13,8	12,9	9,0	p<0.001
Succinivibrio	4,2	2,9	2,5	0.035
Subdoligranulum	3,3	1,8	1,5	p<0.001
Parabacteroides	2,1	1,7	2,0	p<0.001
Dialister	2,1	2,0	1,8	0.869
Bifidobacterium	2,0	1,4	1,4	0.174
Ruminococcaceae_UCG-002	2,0	2,4	2,4	0.007
Ruminococcaceae_UCG-014	1,8	2,0	1,3	0.832
Holdemanella	1,6	1,3	1,6	0.084
Alloprevotella	1,5	1,8	2,2	0.002
Alistipes	1,4	1,1	1,5	p<0.001
Agathobacter	1,3	1,9	2,0	p<0.001
Phascolarctobacterium	1,2	1,0	1,4	p<0.001
Dorea	1,1	0,9	1,0	0.014
Escherichia/Shigella	1.1	0,9	0,6	0.028
Ruminococcus_1	0,9	1,2	1,4	p<0.001
Collinsella	0,9	0,6	0,4	0.031
Ruminococcus_2	0,9	1,7	1,1	0.01
Lachnospiraceae_NK4A136_group	0,8	0,8	1,1	p<0.001
Streptococcus	0,8	0,4	0,5	p<0.001
Prevotella_2	0,8	1,2	2,1	p<0.001
Roseburia	0,8	0,8	1,5	p<0.001
Megasphaera	0,7	0,6	0,7	0.015
Blautia	0,7	0,7	0,7	0.325
Lachnospira	0,7	0,9	1,4	p<0.001
Acidaminococcus	0,6	0,4	0,6	0.042
Paraprevotella	0,6	0,4	0,6	0.001
Christensenellaceae_R-7_group	0,5	0,7	0,9	p<0.001
Lachnoclostridium	0,5	0,6	0,9	p<0.001
Butyrivibrio	0,5	0,4	0,5	0.056
Erysipelotrichaceae_UCG-003	0,4	0,4	0,3	0.453
Ruminiclostridium_6	0,4	0,4	0,4	p<0.001
Coprococcus_3	0,4	0,5	0,5	p<0.001
Akkermansia	0,4	0,4	0,4	0.005
Catenibacterium	0,4	0,8	0,7	p<0.001
Desulfovibrio	0,4	0,3	0,4	p<0.001
Rikenellaceae_RC9_gut_group	0,3	0,4	0,6	p<0.001
Coprococcus_2	0,3	0,3	0,5	p<0.001
Ruminococcaceae_UCG-005	0,3	0,5	0,5	p<0.001
Mitsuokella	0,3	0,3	0,6	p<0.001

Prevotellaceae_NK3B31_group	0,3	0,2	0,3	p<0.001
Ruminococcaceae_UCG-013	0,3	0,2	0,3	p<0.001
Methanobrevibacter	0,3	0,2	0,2	0.065
Sutterella	0,3	0,3	0,7	p<0.001
Catenisphaera	0,3	0,1	0,1	0.322
Ruminococcaceae_NK4A214_group	0,3	0,6	0,5	p<0.001
Ruminiclostridium_5	0,2	0,2	0,3	p<0.001
Butyricicoccus	0,2	0,2	0,2	0.005
Romboutsia	0,2	0,1	0,2	0.019
Ruminococcaceae_UCG-010	0,2	0,2	0,3	p<0.001
Lactobacillus	0,2	0,2	0,1	0.667
Barnesiella	0,2	0,3	0,4	p<0.001
Oscillibacter	0,2	0,2	0,3	p<0.001
Anaerovibrio	0,2	0,3	0,5	0.003
Oribacterium	0,2	0,2	0,2	0.004
Fusicatenibacter	0,2	0,3	0,4	p<0.001
Family_XIII_AD3011_group	0,2	0,1	0,1	p<0.001
Prevotella_7	0,2	0,3	0,5	p<0.001
Klebsiella	0,1	0,2	0,1	0.341
Parasutterella	0,1	0,2	0,2	p<0.001
Ruminococcaceae_UCG-003	0,1	0,1	0,2	p<0.001
Treponema_2	0,1	0,1	0,1	0.088
Ruminococcaceae_UCG-004	0,1	0,1	0,1	0.003
Anaerostipes	0,1	0,1	0,1	p<0.001
Olsenella	0,1	0,1	0,0	0.242
Odoribacter	0,1	0,1	0,2	p<0.001
Senegalimassilia	0,1	0,0	0,0	0.007
Bilophila	0,1	0,1	0,2	p<0.001
Flavonifractor	0,1	0,1	0,1	0.018
Haemophilus	0,1	0,0	0,1	0.069
Megamonas	0,1	0,3	0,3	0.528
Clostridium_sensu_stricto_1	0,1	0,1	0,3	0.002
Lachnospiraceae_ND3007_group	0,1	0,2	0,4	p<0.001
Howardella	0,1	0,0	0,1	0.006
Butyricimonas	0,1	0,1	0,1	p<0.001
Intestinimonas	0,1	0,1	0,1	p<0.001
Lachnospiraceae_UCG-001	0,1	0,0	0,1	p<0.001
Erysipelatoclostridium	0,1	0,1	0,1	p<0.001
Ruminiclostridium_9	0,1	0,1	0,2	p<0.001
UBA1819	0,1	0,1	0,1	p<0.001
Lachnospiraceae_NK3A20_group	0,1	0,1	0,1	0.023
Negativibacillus	0,1	0,1	0,1	p<0.001
Solobacterium	0,1	0,1	0,1	0.133
Veillonella	0,1	0,1	0,1	0.024
Faecalicoccus	0,1	0,1	0,0	0.625
Lachnospiraceae_UCG-004	0,1	0,1	0,2	p<0.001

Slackia	0,1	0,0	0,0	0.022
Pygmaiobacter	0,1	0,0	0,0	0.14
Faecalitalea	0,1	0,0	0,1	0.073
Allisonella	0,0	0,0	0,1	p<0.001
Lachnospiraceae_UCG-010	0,0	0,1	0,1	p<0.001
Fusobacterium	0,0	0,0	0,1	p<0.001
Prevotellaceae_UCG-001	0,0	0,0	0,1	0.015
CAG-352	0,0	0,1	0,1	0.638

Sample 1, baseline sample; Sample 2, 48-week sample; Sample 3, 96-week sample

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

10B. Participants exhibiting carotid intima-media thickness progression

Genus	Sample 1, %	Sample 2, %	Sample, 3%	p-value. Friedman
Bacteroides	17,8	14,4	14,4	0.994
Prevotella_9	15,8	14,2	14,2	0.72
Faecalibacterium	12,7	9,7	9,7	0.43
Subdoligranulum	3,2	1,4	1,4	0.097
Bifidobacterium	2,2	1,8	1,8	0.785
Parabacteroides	2,2	2,2	2,2	0.13
Succinivibrio	2,1	2,0	2.024,0	0.448
Alistipes	2,1	2,1	2.094,0	0.056
Holdemanella	2,0	1,3	1,3	0.124
Dialister	1,9	1,9	1.948,0	0.688
Ruminococcaceae_UCG-002	1,9	2,5	2,5	0.143
Agathobacter	1,8	2,3	2.292,0	0.281
Ruminococcaceae_UCG-014	1,6	1,5	1.482,0	0.405
Alloprevotella	1,2	1,5	1,5	0.446
Lachnospira	1,0	1,6	1,6	0.033
Megasphaera	1,0	0,7	0,7	0.553
Lachnospiraceae_NK4A136_group	1,0	1,1	1,1	0.135
Dorea	1,0	0,9	0,9	0.754
Ruminococcus_2	0,9	1,3	1,3	0.069
Escherichia/Shigella	0,9	0,3	0,3	0.078
Streptococcus	0,9	0,4	0,4	0.01
Phascolarctobacterium	0,9	1,2	1,2	0.356
Collinsella	0,8	0,4	0,4	0.405
Ruminococcus_1	0,8	1,2	1,2	0.166
Roseburia	0,7	1,3	1,3	p<0.001
Christensenellaceae_R-7_group	0,7	1,0	1,0	0.164
Blautia	0,7	0,7	0,7	0.736
Paraprevotella	0,7	0,6	0,6	0.408
Akkermansia	0,7	0,7	0,7	0.042
Lachnoclostridium	0,6	1,0	1,0	p<0.001
Romboutsia	0,5	0,1	0,1	0.477
Acidaminococcus	0,5	0,4	0,4	0.309
Butyrivibrio	0,5	0,7	0,7	0.097
Prevotellaceae_NK3B31_group	0,5	0,3	0,3	0.002
Prevotella_2	0,5	2,0	2,0	0.002
Coprococcus_3	0,4	0,5	0,5	0.007
Catenibacterium	0,4	0,7	0,7	0.02
Ruminococcaceae_UCG-013	0,4	0,3	0,3	0.266
Anaerovibrio	0,3	0,7	0,7	0.12
Erysipelotrichaceae_UCG-003	0,3	0,3	0,3	0.854
Mitsuokella	0,3	0,5	0,5	0.011
Ruminiclostridium_5	0,3	0,3	0,3	0.069
Ruminococcaceae_UCG-005	0,3	0,6	0,6	0.059
Methanobrevibacter	0,3	0,2	0,2	0.092
Oscillibacter	0,3	0,3	0,3	0.002
Barnesiella	0,3	0,5	0,5	0.006

Biblioteca Miguel Hernández

Desulfovibrio	0,3	0,4	0,4	0.004
Ruminiclostridium_6	0,3	0,5	0,5	0.165
Coprococcus_2	0,2	0,4	0,4	0.15
Ruminococcaceae_NK4A214_group	0,2	0,5	0,5	0.008
Parasutterella	0,2	0,4	0,4	0.029
Lactobacillus	0,2	0,2	0,2	0.79
Catenisphaera	0,2	0,1	0,1	0.976
Rikenellaceae_RC9_gut_group	0,2	0,6	0,6	0.011
Butyricicoccus	0,2	0,2	0,2	0.246
Sutterella	0,2	0,6	0,6	p<0.001
Family_XIII_AD3011_group	0,2	0,1	0,1	0.27
Fusicatenibacter	0,2	0,4	0,4	p<0.001
Flavonifractor	0,2	0,2	0,2	0.213
Ruminococcaceae_UCG-010	0,2	0,3	0,3	p<0.001
Prevotella_7	0,1	0,3	0,3	0.102
Ruminococcaceae_UCG-004	0,1	0,1	0,1	0.167
Bilophila	0,1	0,2	0,2	0.001
Oribacterium	0,1	0,2	0,2	0.015
Lachnospiraceae_UCG-001	0,1	0,1	0,1	0.297
Howardella	0,1	0,1	0,1	0.003
Senegalimassilia	0,1	0,0	0,0	0.536
Odoribacter	0,1	0,2	0,2	p<0.001
Slackia	0,1	0,0	0,0	0.303
Erysipelatoclostridium	0,1	0,1	0,1	0.083
Butyricimonas	0,1	0,2	0,2	p<0.001
Fusobacterium	0,1	0,0	0,0	0.02
Ruminiclostridium_9	0,1	0,2	0,2	p<0.001
Intestinimonas	0,1	0,1	0,1	0.179
Ruminococcaceae_UCG-003	0,1	0,3	0,3	p<0.001
Tyzzerella_3	0,1	0,0	0,0	0.767
Faecalitalea	0,1	0,0	0,0	0.038
UBA1819	0,1	0,1	0,1	0.096
CAG-352	0,1	0,0	0,0	0.891
Raoultella	0,1	0,0	0,0	0.174
Prevotellaceae_UCG-001	0,1	0,1	0,1	0.038
Lachnospiraceae_ND3007_group	0,1	0,4	0,4	p<0.001
Negativibacillus	0,1	0,1	0,1	0.071
Olsenella	0,1	0,0	0,0	0.427
Klebsiella	0,1	0,1	0,1	0.673
Lachnospiraceae_UCG-010	0,1	0,1	0,1	0.003
Faecalicoccus	0,1	0,0	0,0	0.913
Lachnospiraceae_UCG-004	0,1	0,2	0,2	p<0.001
Tyzzerella_4	0,1	0,0	0,0	0.057

Sample 1, baseline sample; Sample 2, 48-week sample; Sample 3, 96-week sample

Biblioteca
Universidad Miguel Hernández

10C. Participants not exhibiting carotid intima-media thickness progression

Genus	Sample 1, %	Sample 2, %	Sample 3, %	p-value. Friedman
Prevotella_9	20,3	17,6	17,6	0.325
Faecalibacterium	14,4	7,8	7,8	p<0.001
Bacteroides	14,3	11,2	11,2	0.683
Succinivibrio	4,4	2,5	2,5	0.008
Subdoligranulum	2,9	1,6	1,6	0.04
Dialister	2,3	1,7	1,7	0.21
Alloprevotella	2,2	2,7	2,7	0.524
Parabacteroides	2,2	2,0	2,0	p<0.001
Ruminococcaceae_UCG-014	2,0	1,2	1,2	0.619
Ruminococcaceae_UCG-002	1,7	2,4	2,4	0.144
Bifidobacterium	1,7	1,1	1,1	0.219
Alistipes	1,2	1,3	1,3	p<0.001
Phascolarctobacterium	1,2	1,6	1,6	p<0.001
Holdemanella	1,1	2,0	2,0	p<0.001
Agathobacter	1,1	1,8	1,8	0.011
Ruminococcus_1	1,0	1,4	1,4	0.347
Escherichia/Shigella	0,9	0,6	0,6	0.491
Dorea	0,8	1,0	1,0	0.002
Ruminococcus_2	0,8	1,1	1,1	0.006
Collinsella	0,7	0,4	0,4	0.146
Blautia	0,7	0,6	0,6	0.43
Acidaminococcus	0,7	0,6	0,6	0.394
Streptococcus	0,7	0,6	0,6	0.083
Lachnospira	0,7	1,2	1,2	0.004
Prevotella_2	0,6	1,7	1,7	p<0.001
Roseburia	0,6	1,6	1,6	p<0.001
Lachnoclostridium	0,6	0,7	0,7	p<0.001
Lachnospiraceae_NK4A136_group	0,6	1,1	1,1	p<0.001
Paraprevotella	0,5	0,6	0,6	0.041
Rikenellaceae_RC9_gut_group	0,5	0,8	0,8	0.037
Christensenellaceae_R-7_group	0,4	1,0	1,0	p<0.001
Mitsuokella	0,4	0,7	0,7	0.01
Catenisphaera	0,4	0,2	0,2	0.504
Erysipelotrichaceae_UCG-003	0,4	0,2	0,2	0.021
Megasphaera	0,4	0,7	0,7	0.005
Ruminiclostridium_6	0,4	0,5	0,5	0.002
Methanobrevibacter	0,4	0,1	0,1	0.03
Treponema_2	0,3	0,2	0,2	0.646
Coprococcus_2	0,3	0,8	0,8	p<0.001
Desulfovibrio	0,3	0,5	0,5	p<0.001
Ruminococcaceae_NK4A214_group	0,3	0,6	0,6	p<0.001
Ruminococcaceae_UCG-010	0,3	0,3	0,3	p<0.001
Coprococcus_3	0,3	0,6	0,6	p<0.001
Butyrivibrio	0,3	0,4	0,4	0.171
Prevotellaceae_NK3B31_group	0,3	0,4	0,4	p<0.001
Oribacterium	0,3	0,3	0,3	0.027

Biblioteca

Sutterella	0,2	0,6	0,6	p<0.001
Ruminococcaceae_UCG-005	0,2	0,5	0,5	p<0.001
Catenibacterium	0,2	0,8	0,8	0.001
Haemophilus	0,2	0,1	0,1	0.022
Olsenella	0,2	0,0	0,0	0.201
Ruminococcaceae_UCG-013	0,2	0,3	0,3	0.003
Anaerostipes	0,2	0,2	0,2	0.074
Ruminiclostridium_5	0,2	0,3	0,3	0.027
Oscillibacter	0,2	0,3	0,3	p<0.001
Barnesiella	0,2	0,4	0,4	0.006
Fusicatenibacter	0,2	0,5	0,5	p<0.001
Anaerovibrio	0,2	0,4	0,4	0.098
Butyricicoccus	0,2	0,2	0,2	0.001
Clostridium_sensu_stricto_1	0,2	0,5	0,5	0.088
Klebsiella	0,2	0,0	0,0	0.064
Prevotella_7	0,2	0,8	0,8	p<0.001
Ruminococcaceae_UCG-003	0,1	0,2	0,2	p<0.001
Parasutterella	0,1	0,2	0,2	0.032
Odoribacter	0,1	0,2	0,2	p<0.001
Family_XIII_AD3011_group	0,1	0,1	0,1	p<0.001
Lachnospiraceae_ND3007_group	0,1	0,4	0,4	p<0.001
Veillonella	0,1	0,1	0,1	0.065
Akkermansia	0,1	0,4	0,4	p<0.001
Ruminococcaceae_UCG-004	0,1	0,1	0,1	0.428
Lactococcus	0,1	0,0	0,0	0.102
Pygmaiobacter	0,1	0,0	0,0	0.63
Faecalicoccus	0,1	0,0	0,0	0.913
Flavonifractor	0,1	0,1	0,1	0.357
Senegalimassilia	0,1	0,0	0,0	0.008
Howardella	0,1	0,1	0,1	0.154
Romboutsia	0,1	0,3	0,3	0.029
UBA1819	0,1	0,1	0,1	0.002
Intestinimonas	0,1	0,2	0,2	p<0.001
Lachnospiraceae_UCG-004	0,1	0,2	0,2	p<0.001

Sample 1, baseline sample; Sample 2, 48-week sample; Sample 3, 96-week sample

Biblioteca

FAECAL SAMPLE COLLECTION PROTOCOL

Patients will be provided with the necessary materials for the collection and maintenance of faecal samples. Additionally, they will be given and explained instructions on the procedure to follow for collection and storage until final delivery.

Equipment for faecal collection:

- 1 spatula 210 mm (smartSpatula®).
- 2 Falcon tubes of 50 ml (without skirt, conical tip) for the samples. The containers will contain a volume of 10 ml of RNAlater (invitrogen® by Thermo Fisher Scientific) and will indicate the level to be reached when adding the stool sample (20 ml).
- Opaque plastic bags.

Instructions for proper stool collection:

- Collect stool in a clean and dry container, avoiding contamination with urine, water, or toilet paper. You may use a bidet at home covered with aluminum foil for this purpose.
  Stool collection: Using a spatula, gather small amounts of stool from the container and place them into the sample tubes.

IMPORTANT: Open the containers carefully to avoid spilling the liquid they contain. In each sampling, FILL THE TUBES TO THE LEVEL INDICATED BY THE ARROW.

- Close the tubes properly and shake them to mix the sample with the liquid medium. This medium aids in preserving the sample.
- Label the tubes with the assigned code and date.
- Place the tubes in the plastic bags provided. STORE THE CONTAINERS IN THE REFRIGERATOR AT 4°C, not in the freezer, until the time of delivery.
- Dispose of faecal remnants and used plastic material.

Preservation

Preservation of the sample is critical, so it should be kept at 4°C until properly stored (at -80°C) within a maximum period of 24 hours. Otherwise, the qualitative and quantitative composition of the samples would be altered. Avoid freezing at -20°C, as slow freezing of water leads to the formation of crystals that can affect cell integrity.

Samples collected from Monday to Thursday will be considered valid if delivered within 24 hours. The recommended time for stool collection is preferably on the same day, ideally in the morning between 7:00-10:00 AM, although samples collected the previous night are also acceptable. Samples collected on Friday morning must be delivered that same morning (until 15:00). Do not collect samples on Friday afternoons, Saturday or on Sunday mornings.

Transport

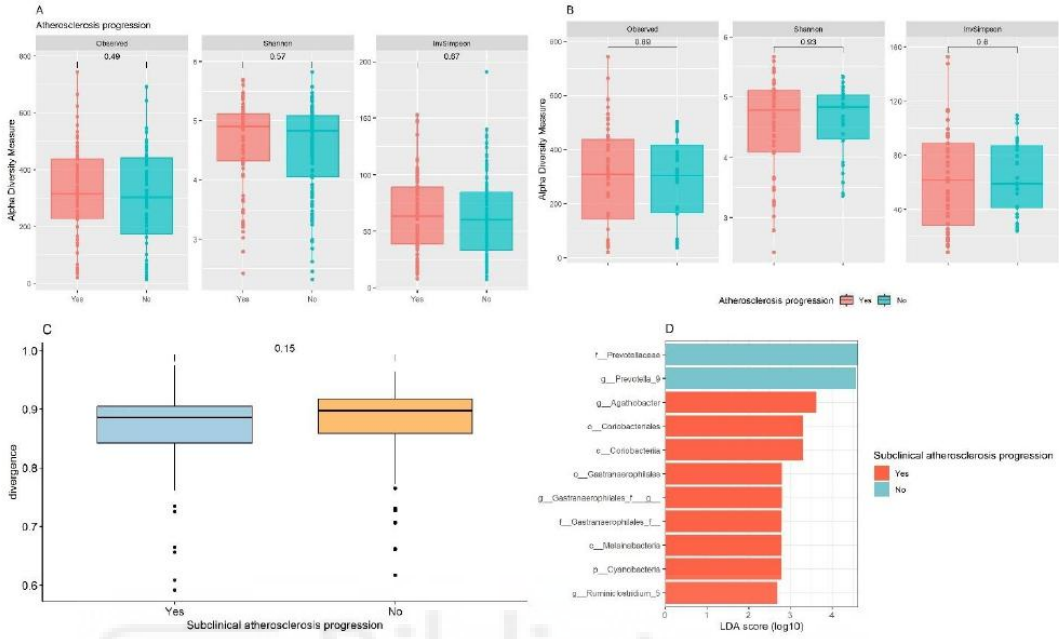
The transfer of samples from the hospital to the laboratory (Genomic and Health Area, CSISP) should be done in a box containing as much dry ice as possible and within the shortest timeframe feasible.

DEFINITION OF CARDIOVASCULAR DISEASE

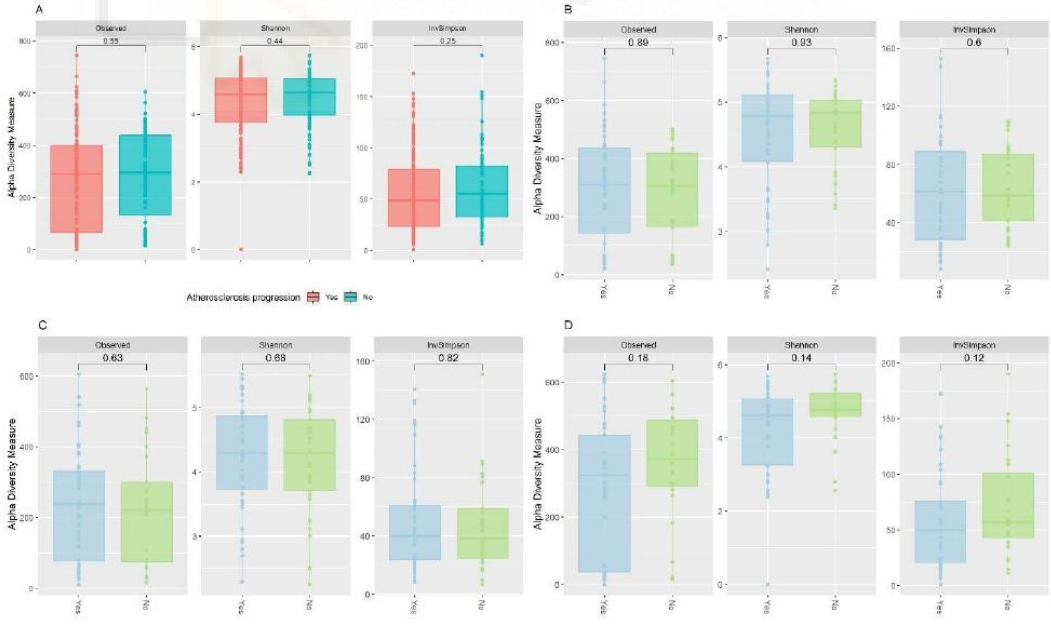
Cardiovascular disease was defined by a medical history of either cardiovascular events or cerebrovascular events. Cardiovascular events included acute myocardial infarction, angina, congestive heart failure, and coronary-related death. Cerebrovascular events comprised stroke and transient ischemic attack

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

Supplementary_figure 1:

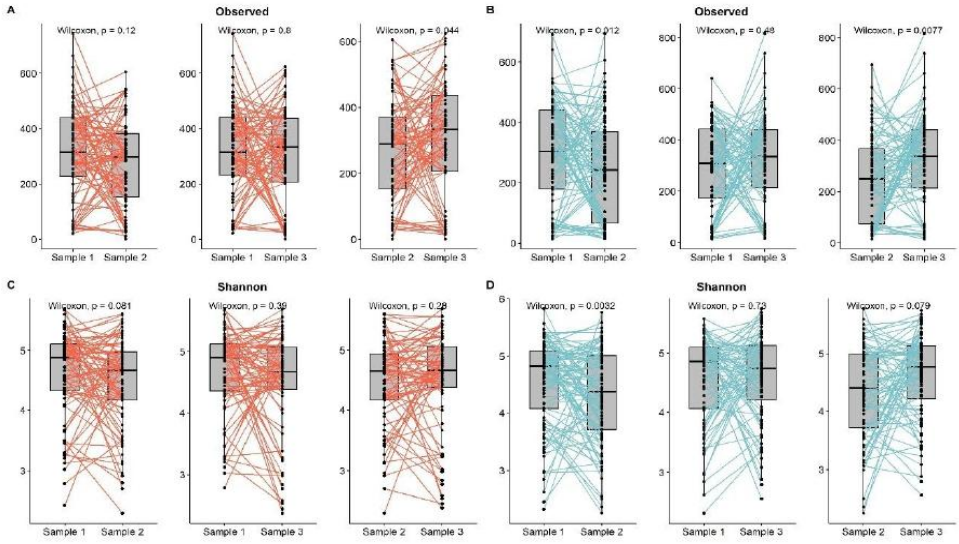


Supplementary_figure 2:

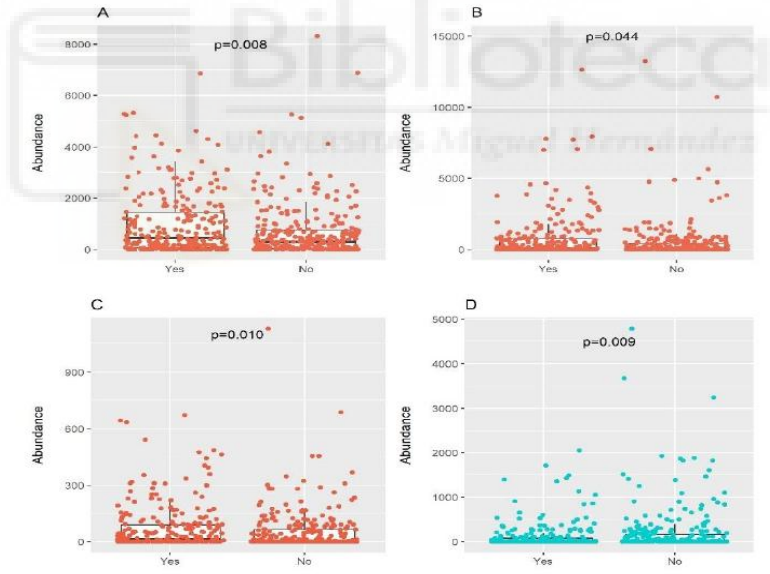


Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

Supplementary figure 3:



Supplementary figure 4:



Biblioteca Universitaria Miguel Hernández

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

Articulo 2 : Gut microbiota and weight gain in people with HIV on integrase inhibitors: a five-year longitudinal study

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

Gut microbiota and weight gain in people with HIV on integrase inhibitors: a five-year longitudinal study

Javier García-Abellán [1,2]†, José A. García [1,2]†, Ronald Galdámez[3], María José Gosalbes[4], Marta Fernández-González [2,3], Sergio Padilla [1,2], Paula Mascarell [1], Guillermo Telenti[3], Félix Gutiérrez [1,2]‡ and Mar Masiá [1,2]*‡

[1]Infectious Diseases Unit, Hospital General Universitario de Elche and Universidad Miguel Hernández de Elche, Alicante, Spain; [2]CIBER de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; [3]Infectious Diseases Unit, Hospital General Universitario de Elche, Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research in the Valencian Region (FISABIO), Alicante, Spain; [4]Genomics and Health Area, Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana, Valencia, and CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain

*Corresponding author. E-mail: mmasia@umh.es
†Co-first authorship.
‡Co-senior authorship.

Received 15 January 2025; accepted 21 May 2025

Objectives: To evaluate the relationship between the gut microbiota composition and significant weight gain in virologically-suppressed people with HIV (PWH) on antiretroviral therapy.

Methods: This 5-year prospective longitudinal study included virologically-suppressed PWH receiving regimens based on the integrase strand transfer inhibitors (INSTIs) or non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs). Body weight was measured annually, with significant weight gain defined as a ≥10% increase between consecutive measurements or compared to baseline. Gut microbiota profiling was conducted using 16S rRNA sequencing (V3–V4 regions) via the Illumina MiSeq platform.

Results: 202 participants were recruited, with 169 completing the 240-week follow-up. Among these, 63 remained on INSTI-based, 79 on NNRTI-based and 27 on NNRTI + INSTI-based regimens. Median (interquartile range (IQR)) 5-year weight gain was 1.3 (−2.8 to 4.5) kg. Significant weight gain occurred in 70 (34.7%) participants, including 20 (9.9%) with ≥10% gain between consecutive measurements and 50 (24.8%) from baseline. No significant differences were observed in adjusted α- and β-diversity indices between groups defined by weight gain. Adjusted analysis of compositions of microbiomes with bias correction 2 model showed that weight gain was associated with the genera *Dialister and Tyzzerella_4,* whereas *Phascolarctobacterium* was enriched in those without significant weight gain. While overall weight gain did not differ between INSTI-based and NNRTI-based groups, participants on INSTIs-based regimens showed higher relative abundances of bacteria linked to weight gain, like *Tyzzerella_4* (0.05% versus 0.02%, $P=0.017$) and *Lactobacillus* (0.29% versus 0.22%, $P=0.009$).

Conclusions: Significant weight gain in the PWH is associated with distinct gut microbiota profiles. The enrichment of weight gain-associated taxa, such as *Tyzzerella_4* and *Lactobacillus,* in individuals on INSTI-based regimens suggests a potential microbiota-mediated mechanism modulating metabolic outcomes.

Introduction

Obesity has emerged as a critical global health challenge, with prevalence tripling in the past two decades. It now affects over 890 million adults (13% of the global population), carrying profound implications for both the general population and people living with HIV (PWH).[1–4] Among PWH, the prevalence of obesity has risen significantly, exacerbating the risk of comorbidities such as cardiovascular disease (CVD), diabetes and non-alcoholic fatty liver disease.[5,6] Despite these trends, the mechanisms underlying weight gain in PWH remain poorly understood.

Downloaded from https://academic.oup.com/jac/advance-article/doi/10.1093/jac/dkaf182/8157146 by guest on 27 June 2025

Several factors are proposed contributors to weight gain in PWH, including sex, genetics, ethnicity, sedentary behaviour, poor dietary habits, chronic inflammation and immune dysregulation.[7,8] Antiretroviral therapy (ART) has also been implicated as a potential factor, with newer agents such as integrase strand transfer inhibitors (INSTIs) and tenofovir alafenamide (TAF) showing associations with significant weight gain compared to older regimens like non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) and tenofovir disoproxil fumarate.[9–11] Although initially considered metabolically neutral, emerging evidence indicates that the initiation or switch to INSTIs may be linked to adverse metabolic outcomes, including weight gain, increases in blood pressure and a heightened risk of developing hypertension or diabetes.[12,13] In contrast, NNRTIs, the second most frequently used class of anchor antiretrovirals, have historically demonstrated a more favourable metabolic profile, with agents such as nevirapine (NVP) and, to a lesser extent, rilpivirine (RPV), associated with minimal cardiovascular risk.[14] Further investigation is warranted to clarify the metabolic pathways through which antiretroviral agents may contribute to weight gain.

Accumulating evidence suggests a role for gut microbiota in regulating energy metabolism, fat storage and immune responses, making it a potential mediator of weight gain.[15,16] Dysbiosis, or disruption of the gut microbiota, is commonly observed in PWH and is associated with chronic inflammation and metabolic disturbances, which are key contributors to obesity pathogenesis.[17,18] In the general population, distinct changes in the gut microbiota composition have been linked to obesity, with specific bacterial taxa associated with either weight gain or protective effects against obesity.[15,19,20] However, data on the influence of gut microbiota on weight gain in PWH are exceedingly scarce, and the long-term impact of ART on gut microbiota composition and weight regulation remains largely unknown.

This study aimed to evaluate the relationship between gut microbiota composition and weight gain over 5 years in virologically-suppressed PWH. It also investigated differences in the microbiota composition and its association with weight gain between the INSTI-based regimens and other ART regimens.

Methods

Study design, patients and study procedures

This was a prospective 5-year, longitudinal cohort study carried out at Hospital General Universitario de Elche, Spain. Participants included were adults (>18 years old) with HIV infection receiving antiretroviral regimens based on the NNRTI or INSTI, with undetectable viral load during at least the last 6 months (HIV-1 RNA levels <50 copies/mL).

Since the study was designed to evaluate the relationship of the gut microbiota with atherosclerosis progression, those participants receiving antiretroviral regimens based on protease inhibitors were deliberately excluded to minimize potential biases affecting cardiovascular risk, as this antiretroviral class has been associated with cardiovascular disease in PWH.[21] Additional exclusion criteria were known cardiovascular disease (see Supplementary material, available as Supplementary data at *JAC* Online for the definition of cardiovascular disease) and pregnancy. A questionnaire was administered on the baseline visit, including physical activity and detailed dietary habits. The questionnaire also included data regarding the name and date of the last antibiotic intake, consumption of probiotics and specific details about any digestive issues.

At baseline, 48-, 96-, 144-, 192- and 240-week visits, physical examination and anthropometric measures were recorded and blood samples were obtained. The use of antibiotics within 90 days before stool sample acquisition precluded the collection of samples. Patients were enrolled between 26 October 2017 and 18 February 2019 and were followed up until 18 September 2024.

Weight measurements

Trained staff used the same calibrated body weight scale at all scheduled study visits. Standardized weight measurements were conducted without outerwear. Based on the established threshold of a 5% weight loss associated with cardiometabolic benefits from recommended lifestyle interventions,[22] we defined significant weight gain as a weight increase of ≥10% between two consecutive measurements or a weight increase of ≥10% compared to baseline body weight. Additionally, a less stringent subanalysis was conducted using a ≥5% cutoff.

Stool sample collection and DNA extraction

Faecal samples were self-collected by patients at home, using a home-based self-collection kit and following predefined instructions, at baseline and at the 48- and 96-week visits, and they were stored at −80°C until use. Briefly, participants were provided with 1 spatula and 1 (50 mL) Falcon tube to collect faecal samples. Ideally, stool collection was recommended in the morning, within 1–3 h before sample delivery. Although samples collected the previous night were also acceptable, patients were advised to store the containers in the refrigerator at 4°C until delivery. A detailed description of the stool sample collection procedure, along with a detailed patient follow-up flowchart, is available in Supplementary material.

The MagNA Pure LC Instrument (Roche) was used as a robotic workstation for automated nucleic acid isolation. This system required a pre-isolation treatment to obtain liquid samples. Briefly, faecal samples, which were collected in RNAlater (Invitrogen), were diluted and homogenized in the PBS solution (dilution 1:2). To remove faecal debris, the samples were centrifuged at 2000 rpm at 4°C for 2 min. Then, the supernatant (500 µL) was centrifuged at 13 000 rpm for 5 min to pellet the cells and the weight of the cellular pellet was determined. Finally, bacterial pellets were lysed with lysozyme at a final concentration of 0.1 mg/ml w for 30 min at 37°C. The bacterial lysate was introduced into the automatic extraction system. To extract the total DNA, we used DNA Isolation Kit III (Bacteria, Fungi) (Roche), following the manufacturer's instructions. DNA samples were quantified with the Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific).

Sequencing and amplicon analysis

The V3–V4 hypervariable region of the 16S rRNA gene was amplified using 12.5 ng of DNA for each sample, following the Illumina protocol for 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation. PCR was performed with forward primer (5′-TCGT CGGC AGCG TCAG ATGT GTAT AAGA GACA GCCT ACGG GNGG CWGCA-G3′) and reverse primer (5′-GTCT CGTG GGCT CGGA GATG TGTA TAAG AGAC AGGA CTAC HVGG GTAT CTAA TCC3′), fitted with adapter sequences for compatibility with the Illumina Nextera XT Index kit. The size of libraries was visualized by agarose gel electrophoresis (0.8% w/v agarose). Then, amplicon libraries were pooled to a final concentration of 4 nM and sequenced in an Illumina Miseq sequencer in 2×300 cycles paired-end runs (MiSeq Reagent kit v3) at the Genomics and Health Area of the Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana (FISABIO)-Salud Pública. 16S rRNA gene amplicon sequencing generated, from both ends of the amplicon, a total of 50 655 806 reads, averaging 91 602 reads per sample.

The DADA2 (1.20) package as implemented in R (4.1.0) was employed for read processing and forward and reverse read merging.[23] Filtering and trimming parameters were as follows: maxN = 0, maxEE = c(5), trimmin-quality = 20, truncLen = c(270 230) and rm.phix = TRUE. A minimum overlap of 15 nucleotides and a maximum mismatch of 2 were required for read merging. Also, chimeric variants were identified and discarded.

Downloaded from https://academic.oup.com/jac/advance-article/doi/10.1093/jac/dkaf182/8157146 by guest on 27 June 2025

Thus, we obtained a total of 33 914 978 sequences (average 61 329 sequences per sample) that were used to generate amplicon sequence variants (ASVs).

Taxonomic identification was assigned to ASVs using DADA2 and the SILVA v.138 reference database.[24] The MegaBLAST tool[25] was further used for those ASVs identified only at the genus level, requiring at least 97% identity for species-level assignation and a minimum difference of 2% between the first- and second-best matches. Finally, the species of this selected best alignment was assigned to the corresponding ASV.

Statistical analysis

The normalization of the raw sequences was carried out using the compositional method when necessary. The α diversity was evaluated considering observed ASVs, Simpson, Shannon and inverse Simpson indices. To calculate α-diversity indices, the 'estimate_richness' function from the phyloseq (Phyloseq) package in R (version 1.16.2) was used, and an adjustment for age, sex, antiretroviral treatment (INSTI-based, NNRTI-based and tenofovir alafenamide-containing), men who have sex with men (MSM) sexual behaviour, baseline body mass index (BMI), total calorie intake and physical activity was conducted. The β diversity was evaluated through principal coordinate analysis, which summarizes and attempts to represent the (dis)similarity between objects in a low-dimensional Euclidean space with a (dis)similarity matrix as input, using the Bray–Curtis distance with the 'ordinate' and 'plot_ordination' commands from the phyloseq[26] package in R.

Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) was performed in the dissimilarity matrix using the Adonis function of vegan library[27] in R with the distance matrix of Bray–Curtis. To evaluate the differential abundance of gut microbiota between weight gain groups, a longitudinal analysis of compositions of microbiomes with bias correction 2 (ANCOM-BC2)[28] was conducted. This analysis controlled for individual variability and adjusted for covariates of interest. The analysis was carried out using the ANCOMBC R package. For the ANCOM-BC2, we applied standard filtering parameters to improve robustness and reduce spurious associations. Specifically, we used a prevalence cutoff of 0.05 to exclude taxa present in fewer than 5% of samples, and a library size cutoff of 200 to remove samples with low sequencing depth. Structural zeros were modelled in the analysis, and random effects were included to control for inter-individual variability. For the analyses of the weight changes and the microbiota composition associated with INSTI-based versus NNRTI-based regimens, participants receiving a combination of NNRTIs + INSTIs were excluded, as well as those who changed their ART during the study. This was done to avoid overlapping and misclassification, ensuring that each comparison group represented a distinct ART class. The characteristics of the microbiota of participants receiving INSTI + NNRTI are shown in Figure S1.

Ethics

The study was approved by the Ethical Committee of Hospital General Universitario de Elche, and all participants signed an informed consent.

Results

Patient's characteristics

Of the 202 participants initially recruited, 202, 198, 192, 180 and 169 completed follow-up visits at 48, 96, 144, 192 and 240 weeks, respectively. Reasons for dropout included death from lung cancer ($n=1$), pregnancy ($n=2$), relocation ($n=2$) and loss of follow-up or inability to attend clinic visits ($n=28$).

Baseline characteristics are summarized in Table 1. The median (IQR) age at enrolment was 50 (40–56) years, with 153 (80.5%) male participants. Smoking was reported by 96 (50.3%), and comorbidities included dyslipidemia ($n=22$, 11.7%), hypertension ($n=20$, 10%) and diabetes ($n=5$, 2.5%). The median (IQR) 10-year Framingham risk score was 7.5% (3.9–12.5%), and the atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD) risk score was 2.6% (1.3–7.1%).

At baseline, 92 (45.5%) participants were on an NNRTI-based regimen, 69 (34.2%) on an INSTI-based regimen, and 41 (20.3%) on a combination of both. A detailed description of the specific ART agents at baseline is presented in Table 1.

Median (IQR) duration of INSTI exposure was 24.2 (17.1–35.3) months and NNRTI exposure was 34.4 (20–54.2) months. During the 5-year follow-up, 142 (70.3%) participants maintained their baseline ART regimen, with 79 continuing NNRTI-based and 63 continuing INSTI-based regimens. Importantly, virological suppression was consistently maintained across the cohort. A total of 88% of participants had HIV RNA levels <50 copies/mL during more than 90% of the follow-up period, while only 4% maintained suppression for less than 80% of the total follow-up time. Overall, more than 98% of all viral load measurements were below 50 copies/mL, and over 80% were fully undetectable (<20 copies/mL). A total of 50 blips, defined as isolated episodes of HIV RNA >50 copies/mL, were observed in 32 participants. Blips occurred in 20 of 132 (15.2%) individuals without significant weight gain, and in 12 of 70 (17.1%) individuals with weight gain, with no significant difference between groups ($P=0.868$). Similarly, the distribution of blips did not differ between ART regimens (12/63 on the INSTI-based regimens versus 13/79 on the NNRTI-based regimens; $P=0.856$). The magnitude of blips was also comparable between groups: median [IQR] HIV RNA was 87 [67–162] copies/mL in participants with blips in the weight gain group and 82 [65–126]copies/mL in those with blips in the group without weight gain ($P=0.883$), and 79.5 [63.8–94.5] copies/mL in participants with blips in the INSTI-treated group versus 99.5 [65.2–194.8] copies/mL in those with blips on NNRTIs ($P=0.292$).

Five-year body weight changes

At baseline, 105 (52%) participants had normal weight, 77 (38.1%) were overweight and 20 (9.9%) were obese (Figure 1). During follow-up, 180 and 169 participants had four and five weight measurements, respectively. The median (IQR) 5-year weight gain was 1.3 (−2.8 to 4.5) kg, corresponding to an annual weight gain of 0.26 (−0.56 to 0.9) kg. Among the 105 participants with normal baseline weight, 36 developed overweight status. Detailed information about body weight and BMI changes of participants during follow-up are shown in Table S1 and Figure 1. Consistent with these findings, participants who experienced significant weight gain also showed a modest increase in the Framingham cardiovascular risk score (median change: 0.4 [0–2.2] versus 0 [−1.1–0.6]; $P=0.001$). In contrast, no significant changes were observed in the ASCVD score.

Seventy participants experienced significant weight gain; 20 of ≥10% between two consecutive measurements, and 50 of ≥10% from baseline, with a median time to significant weight gain of 34 (23–40) months. Participants with significant weight gain had lower baseline body weight and BMI, lower Framingham risk scores, lower triglyceride levels and a trend towards lower systolic blood pressure (Table 1). No differences were found in the ART regimen composition between the weight gain groups. Significant weight gain was associated with a higher-calorie diet consumption at baseline ($P=0.03$),

Downloaded from https://academic.oup.com/jac/advance-article/doi/10.1093/jac/dkaf182/8157146 by guest on 27 June 2025

Table 1. Baseline clinical characteristics of the study participants in relation to significant weight gain

	All participants		Significant weight gain[a]				*P value*
			Yes		No		
Patients (no.)	202	(100)	70	(34.7)	132	(65.3)	—
Male (sex)	153	(80.5)	47	(74.6)	106	(83.5)	0.174
Age (years)	50	(40–56)	48	(38–54)	50	(40.5–56.5)	0.119
HIV-related variables							
Mode of HIV transmission							0.257
MSM	101	(50)	36	(51.4)	65	(49.2)	
Heterosexual	46	(22.8)	18	(25.7)	28	(21.2)	
IDU	33	(16.3)	10	(14.3)	23	(17.4)	
Unknown	22	(10.9)	6	(8.5)	16	(12.1)	
CD4T-cell count nadir (cells/mm^3)	250	(139–351)	218	(148–310)	258	(136–375)	0.209
CD4T-cell count (cells/mm^3)	687	(530–935)	688	(539–810)	686	(530–983)	0.631
CD4T-cell percentage (%)	36.7	(30–42)	36	(29–42)	37	(30–42)	0.590
CD4/CD8 ratio	1	(0.7–1.4)	1	(0.7–1.4)	1	(0.7–1.3)	0.751
Months of exposure to last ART	33	(18–50)	34.5	(18–54)	33	(19–46)	0.504
NRTI-containing regimen at baseline, no. (%)	162	(80.2)	56	(80)	106	(80.3)	1.000
TAF-containing regimen at baseline, no (%)	14	(6.9)	4	(5.7)	10	(7.6)	0.775
NNRTI-based regimen at baseline, no (%)	92	(45.5)	33	(47.1)	59	(44.7)	0.854
RPV-based	72	(35.6)	27	(38.6)	45	(34.1)	0.442
EFV-based	14	(7)	5	(7.1)	9	(6.9)	1.000
NVP-based	5	(2.5)	1	(1.4)	4	(3.1)	0.659
DOR-based	1	(0.5)	0	(0)	1	(0.8)	—
INSTI-based regimen at baseline, no (%)	69	(34.2)	21	(30)	48	(36.4)	0.452
DTG-based	55	(27.5)	18	(25.7)	37	(28.5)	0.741
RAL-based	7	(3.5)	1	(1.4)	6	(4.6)	0.425
EVG-based	6	(3)	1	(1.4)	5	(3.8)	0.442
BIC-based	1	(0.5)	1	(1.4)	0	(0)	—
NNRTI+INSTI combination at baseline, no (%)	41	(20.3)	16	(22.9)	25	(18.9)	0.635
RPV+CAB regimen	26	(13)	13	(18.6)	13	(10)	0.121
RPV+DTG regimen	13	(6.5)	1	(1.4)	12	(9.2)	0.036
ETV+DTG regimen	1	(1.5)	1	(1.4)	0	(0)	—
NVP+RAL regimen	1	(1.5)	1	(1.4)	0	(0)	—
CVD risk factors, no. (%)							
Current smoking	96	(50.3)	36	(57.1)	60	(46.9)	0.219
Hypertension	20	(10)	4	(5.7)	16	(12.2)	0.215
Dyslipidemia	22	(11.7)	4	(6.3)	18	(14.4)	0.149
Diabetes	5	(2.5)	1	(1.4)	4	(3.1)	0.66
Framingham risk score (%)	7.5	(3.9–12.5)	6.1	(2.6–11.1)	7.8	(4.9–14.7)	0.018
ASCVD risk (%)	2.6	(1.3–7.1)	1.9	(1–5.8)	3.1	(1.4–8.3)	0.106
Cardiometabolic parameters, no. (%)							
Blood pressure (mm Hg)							
Systolic	121	(111–134)	119	(108–132)	122	(113–135)	0.067
Diastolic	70	(63–77)	67	(61–77)	71	(65–77)	0.175
BMI (kg/m^2)	25.4	(23–28.1)	24.8	(22.4–28.4)	25.6	(23.3–28)	0.508
Total cholesterol (mg/dL)	178	(155–207.5)	175	(155–194)	183	(155–210)	0.189
LDL cholesterol (mg/dL)	110	(85–131)	109	(84–126)	110	(87–132)	0.402
HDL cholesterol (mg/dL)	46.5	(39–56)	48	(41–56)	45.5	(38–56)	0.173
Triglycerides (mg/dL)	107	(73–139.2)	93	(66–119)	116	(76–163)	0.003

Categorical variables are expressed as number (percentage) and continuous variables as median (IQR).
IDU, intravenous drug use; NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitor; EFV, efavirenz; DOR, doravirine; RAL, raltegravir; EVG, elvitegravir; BIC, bictegravir; CAB, cabotegravir; ETV, etravirine.
[a]Significant weight gain was defined as a weight increase ≥10%/year between two consecutive measurements or a weight increase ≥10% compared with the baseline body weight.

Downloaded from https://academic.oup.com/jac/advance-article/doi/10.1093/jac/dkaf182/8157146 by guest on 27 June 2025

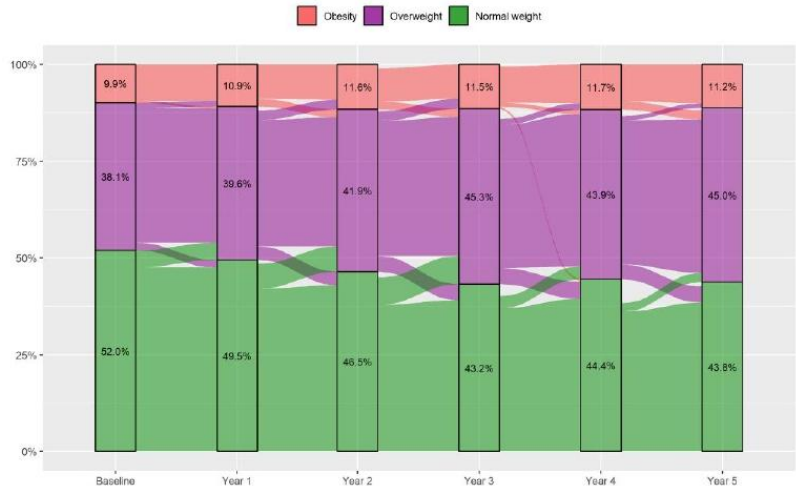


Figure 1. Sankey diagrams illustrating trajectories in the body mass index across study visits.

while physical activity levels were similar between groups (Tables S2–S4).

Weight changes by the ART regimen were analysed (Table S5, Figure 2a and b). No significant differences were observed in weight gain between INSTI-based and NNRTI-based regimens (median 5-year weight gain: 1.5 [−3.5 to 4.9] kg versus 1.1 [−3 to 4.9] kg; $P=0.967$). Similarly, no differences were found between participants receiving tenofovir alafenamide+INSTI versus INSTI alone ($P=0.171$) or versus tenofovir alafenamide+NNRTI ($P=0.164$).

Gut microbiome and body weight

Of participants with ≥2 weight measurements, 193, 192 and 168 provided faecal samples for microbiome analysis at baseline, 48 weeks and 96 weeks, respectively, resulting in 553 sequential samples (Table S6).

No significant differences were observed in α-diversity indices between participants with or without significant weight gain across all samples (Figure S2a). Adjustments for age, sex, ART regimen (INSTI-based, NNRTI-based and tenofovir alafenamide-containing), MSM sexual behaviour, physical activity, total calorie intake and baseline BMI yielded similar results (Figure 3). Temporal changes in α diversity were noted across visits, with a significant decrease between the first and second samples in participants with ≥10% weight gain (Shannon $P<0.001$; inverse Simpson $P<0.001$), while no significant changes were detected in those without substantial weight gain. However, no significant differences were observed between the baseline and the 96-week samples in either group (Figure S2b and c).

Principal coordinate analysis of β diversity using the Bray–Curtis distance and PERMANOVA revealed no significant differences across all samples ($P=0.24$) (Figure 4). Aitchison distance (via ALDEx2), which appropriately addresses the compositional nature of microbiome data, also yielded a non-significant result in the comparison (PERMANOVA $P=0.159$). Using the Jaccard distance, based on the presence/absence of taxa, a trend towards significance was observed between the groups ($P=0.065$), potentially indicating subtle compositional differences (Figure S3). To further investigate whether the observed changes in α diversity reflected broader shifts in microbiota composition, we performed a β-diversity subanalysis comparing samples from baseline and 48-week visits. Using three distance metrics —Bray–Curtis, Jaccard and Aitchison—we evaluated the overall microbial community structure. PERMANOVA results indicated no significant differences in β diversity between the two time points (Bray–Curtis $P=0.684$; Jaccard $P=0.877$; Aitchison $P=0.162$). Additionally, when considering all three sampling points, no significant group separation was observed across visits (Bray–Curtis $P=0.957$; Jaccard $P=0.999$; Aitchison $P=0.562$). In a stratified analysis according to weight gain status, no significant differences were detected in participants with (Aitchison, $P=0.110$; Jaccard, $P=0.510$; Bray–Curtis, $P=0.316$) or without significant weight gain (Aitchison, $P=0.973$; Jaccard, $P=1.000$; Bray–Curtis, $P=0.993$). These findings suggest that, despite the reduction in α diversity among participants with significant weight gain, overall taxonomic composition remained relatively stable over time, even when stratifying by weight gain status.

Among the 16 identified phyla, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* and *Actinobacteria* were most abundant in both groups, with no significant differences ($P>0.2$ for all; Figure 5a, Table S7). Changes in phylum abundance over time showed no group differences based on the weight gain status (Table S8a–c, Figure S4a).

Among 312 bacterial genera identified, the most abundant were *Prevotella_9*, *Bacteroides* and *Faecalibacterium* with no differences among weight gain groups (Figure 5b, Table S9). A significant decrease in *Lachnospiraceae*_NK4A136_group ($P=0.040$) and an increase in *Bacteroides* ($P<0.001$) were observed over time, with no group-specific differences (Table S10a–c, Figure S4b).

Downloaded from https://academic.oup.com/jac/advance-article/doi/10.1093/jac/dkaf182/8157146 by guest on 27 June 2025

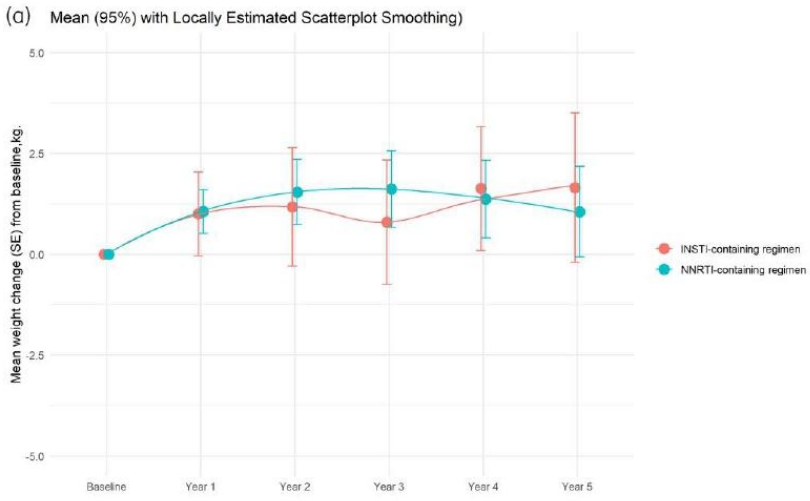


Figure 2. Change in the weight and body mass index from baseline to 240 weeks according to the antiretroviral regimen. (a) Mean weight change across study visits. (b) Sankey diagrams illustrating trajectories in the body mass index across study visits. Participants receiving a combination of NNRTIs+INSTIs were excluded from both groups.

ANCOM-BC2 analysis revealed associations between significant weight gain (≥10%) and specific bacterial taxa (Figure 6a). Adjusted models indicated positive associations with *Dialister* and *Tyzzerella*_4, while *Phascolarctobacterium* was enriched in participants who did not experience significant weight gain.

Subanalyses with a lower threshold (≥5%) identified associations with *Lactobacillus* for weight gain and *Desulfovibrio* and *Roseburia* for no weight gain (Figure 6b).

Figure 5c–g shows box plots depicting the relative abundances of bacterial taxa identified by the ANCOM-BC2 in participants experiencing significant weight gain (≥10%).

Downloaded from https://academic.oup.com/jac/advance-article/doi/10.1093/jac/dkaf182/8157146 by guest on 27 June 2025

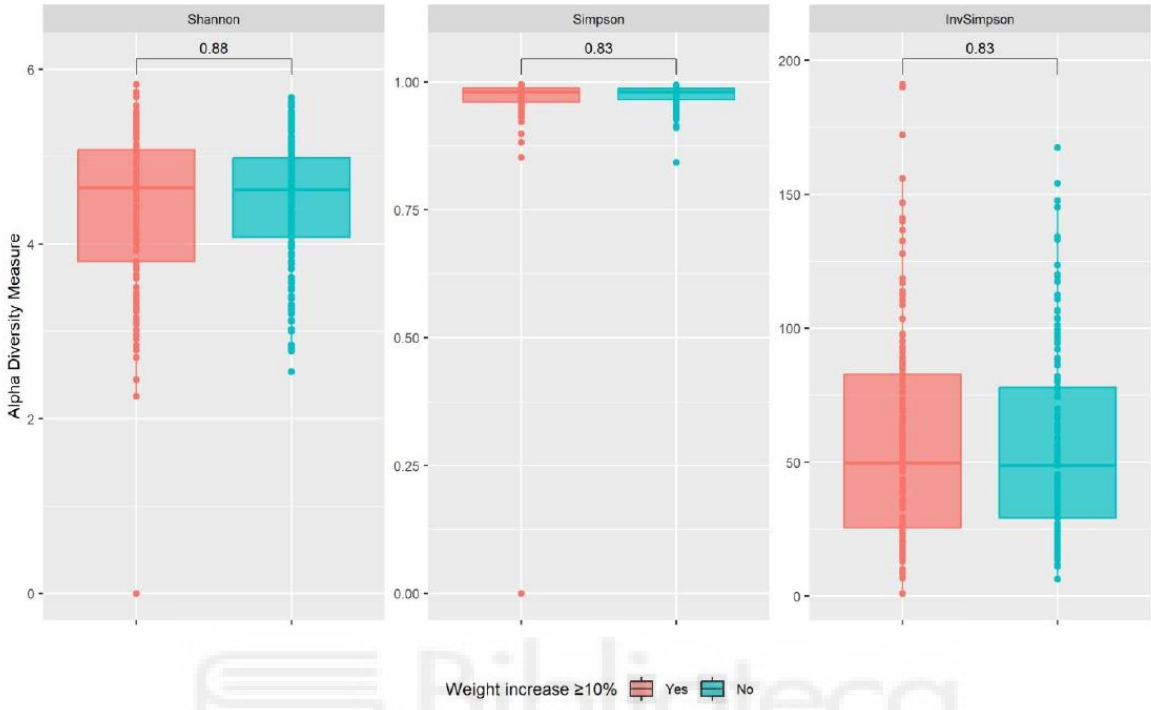


Figure 3. Gut microbiota α diversity at the genus level by significant weight gain group. Box plots show adjusted α diversity using different metrics: Shannon, Simpson and inverse Simpson indices. The analysis includes all study samples. The numbers on the top of the boxes represent *P* values.

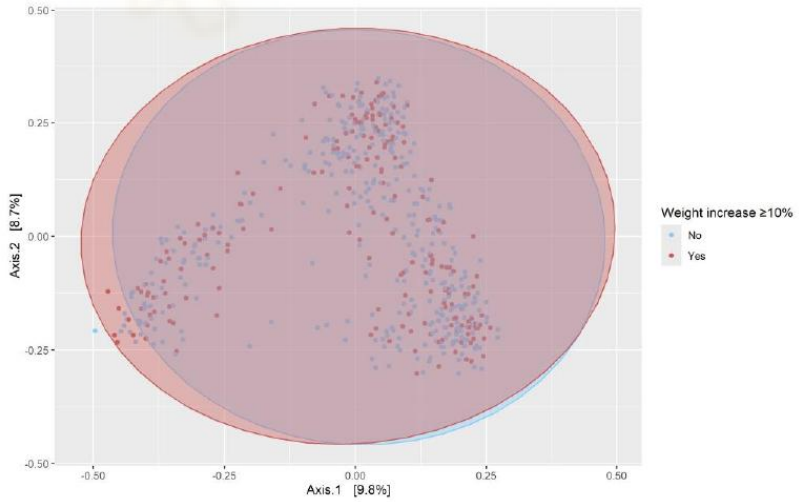


Figure 4. PCoA plots based on the Bray–Curtis distance showing the gut microbiota composition. PCoA, principal coordinate analysis.

Downloaded from https://academic.oup.com/jac/advance-article/doi/10.1093/jac/dkaf182/8157146 by guest on 27 June 2025

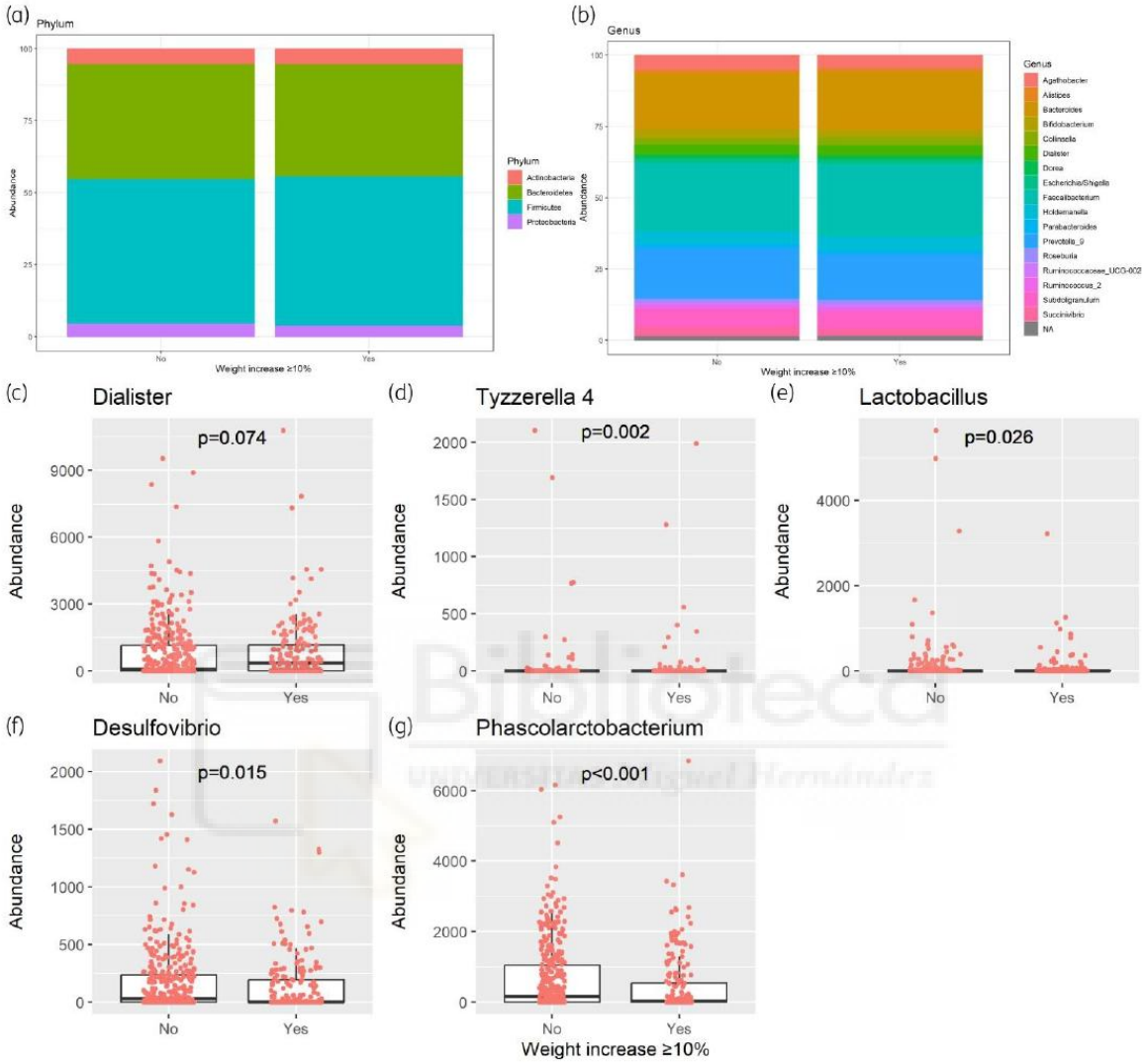


Figure 5. Distribution of abundances at phylum (a) and genus (b) levels by weight gain groups. (c–g) Comparative abundance analysis of bacterial taxa identified by the ANCOM-BC2 as associated with ≥10% weight gain. The total number of faecal samples was 553. Differential abundance was assessed using the ANCOM-BC2. *P* values indicate statistically significant differences between participants with and without ≥10% weight gain.

Gut microbiome composition and ART regimens

Bacterial taxa linked to significant weight gain were analysed based on the ART regimen composition. INSTI-based regimens demonstrated significantly higher relative abundances of *Tyzzerella_4* (0.05% versus 0.02%, $P=0.017$) and *Lactobacillus* (0.29% versus 0.22%, $P=0.009$) compared to NNRTI-based regimens (Figure 7). In a BMI-stratified subanalysis, no significant differences were found in the abundance of *Tyzzerella_4* or *Lactobacillus* between INSTI participants with normal and higher BMI (Figure S5).

Adjusted ANCOM-BC2 models revealed that *Tyzzerella_4* was positively associated with INSTI-based regimens, approaching statistical significance ($P=0.098$). Other taxa enriched in the INSTI group included *Eggerthella*, *Brachyspira* and *Atopobium*. In the NNRTI group, enriched genera included *Catenibacterium*, *Coprococcus_2*, *Acidaminococcus*, *Methanobrevibacter* and *Ruminoclostridium_6* and _9 (Figure S6).

Downloaded from https://academic.oup.com/jac/advance-article/doi/10.1093/jac/dkaf182/8157146 by guest on 27 June 2025

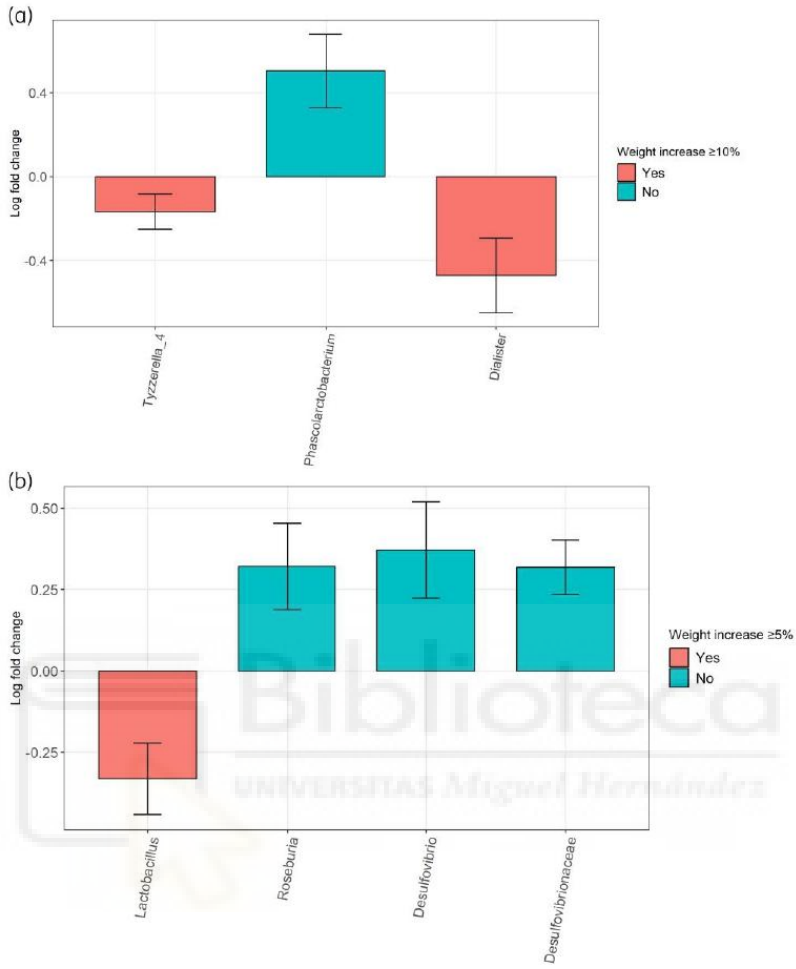


Figure 6. Adjusted ANCOM-BC2: (a) Association with ≥10% weight gain. (b) Association with ≥5% weight gain. Adjustment variables include age, sex, men who have sex with men sexual behaviour, baseline body mass index, antiretroviral regimen composition (based on the integrase strand transfer inhibitors, based on the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors and containing tenofovir alafenamide, daily calorie intake and physical activity). Data are represented by the effect size (log-fold change) and 95% confidence interval bars. The analysis includes 553 faecal samples.

A subgroup analysis of gut microbiota composition by specific INSTI agents revealed no differences in α diversity. β diversity differed modestly but significantly between individual INSTI drugs (Jaccard and Bray–Curtis $P=0.002$) (Figure S7). Differences between dolutegravir (DTG) and other INSTIs trended towards significance ($P=0.06$). ANCOM-BC2 identified some differentially abundant taxa between dolutegravir and other INSTIs (*DTU089*, *Intestinibacter*, *Oscillospira*). Similar analyses for NNRTI agents showed no significant differences in α or β diversity, and ANCOM-BC2 did not identify any differentially abundant genera between rilpivirine and other NNRTIs (Figure S7).

Abundances of bacterial taxa associated with significant weight gain were not different among regimens containing tenofovir alafenamide + INSTIs versus INSTIs without tenofovir alafenamide, or tenofovir alafenamide + INSTIs versus tenofovir alafenamide + NNRTIs. By ANCOM-BC2, regimens containing tenofovir alafenamide + INSTIs showed higher abundance of *Ruminococcaceae*_UCG-013, *Ruminococcaceae*_004 and *Oscillospira* taxa (Figure S8) than regimens based on INSTI with no tenofovir alafenamide. No significant taxa abundance differences were identified between tenofovir alafenamide + INSTIs and tenofovir alafenamide + NNRTIs groups.

Discussion

This study provides novel insights into the complex interplay between gut microbiota composition and weight gain in the PWH

Downloaded from https://academic.oup.com/jac/advance-article/doi/10.1093/jac/dkaf182/8157146 by guest on 27 June 2025

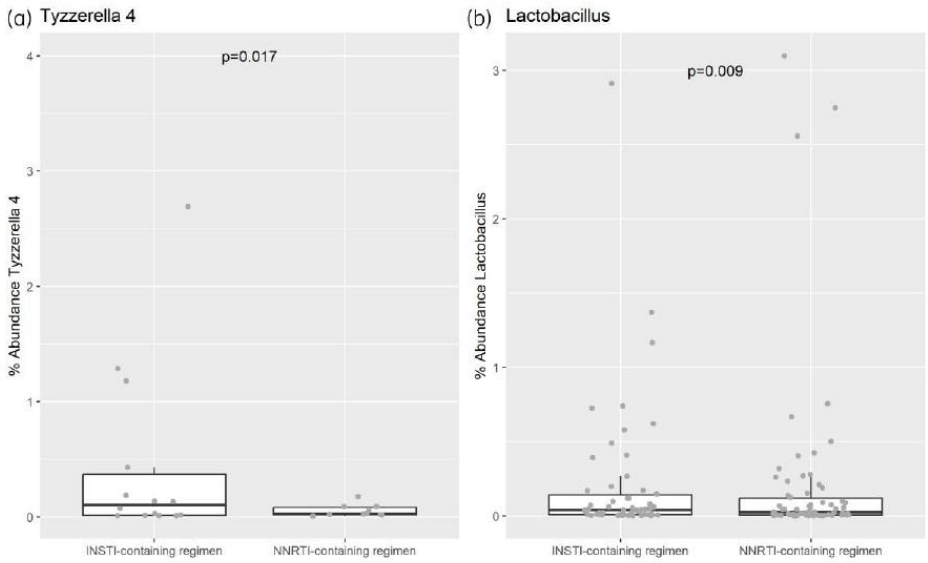


Figure 7. Relative abundances of bacterial taxa associated with significant (≥10%) weight gain, according to the antiretroviral regimen. Participants receiving a combination of NNRTIs + INSTIs were excluded from both groups. Relative abundances are shown for visualization purposes only. Statistical significance was determined using the ANCOM-BC2, a method that accounts for the compositional nature of microbiome data.

receiving ART. We identified subtle taxonomical changes linked to significant weight gain (≥10%), and found a higher prevalence of bacterial taxa associated with metabolic dysfunction and weight gain in INSTI-treated individuals. These taxonomic shifts, although modest in the effect size (log fold change [LFC] < 0.5), were statistically significant and may contribute to advancing our understanding of microbiota-mediated mechanisms that potentially underlie ART-associated weight changes.

Significant weight gain in our cohort was characterized by an increased abundance of *Tyzzerella_4* and *Dialister*, while *Phascolarctobacterium* was enriched in individuals without significant weight changes, compared to those with ≥10% weight gain. Similarly, moderate weight gain (≥5%) was associated with a greater abundance of *Lactobacillus* and a lower abundance of *Desulfovibrio*. These findings align with prior evidence regarding the metabolic roles of these taxa. Specifically, *Tyzzerella_4* (*Lachnospiraceae* family, *Firmicutes* phylum) and *Dialister* (*Veillonellaceae* family, *Firmicutes* phylum) have been implicated in inflammation-driven metabolic dysregulation and obesity-related outcomes, suggesting roles in enhanced energy harvest and fat accumulation.[20,29–34] *Lactobacillus* (*Lactobacillaceae* family, *Firmicutes* phylum) shows a host-specific or bidirectional relationship with weight regulation. In this study, *Lactobacillus* was more abundant in individuals with moderate weight increases, consistent with its reported associations with metabolic dysfunction and weight gain in PWH.[35] *Bifidobacterium*, another anaerobic and acidifying bacterial genus with a two-way relationship with weight, has also been linked to high BMI in persons with HIV.[36,37] Conversely, *Phascolarctobacterium*, known for its anti-inflammatory properties and production of short-chain fatty acids, may mitigate weight gain by promoting metabolic resilience, understood as the capacity to preserve stable metabolic homeostasis, such as glucose levels, lipid profile, cardiovascular risk and body weight regulation.[38–43]

In parallel with these taxonomic findings, we observed a decline in α diversity over time among participants who experienced substantial weight gain. However, β diversity analyses using Aitchison, Bray–Curtis and Jaccard distance metrics did not reveal significant differences in overall microbial community structure across time points. Even after stratifying by weight gain status, no significant compositional shifts were observed. These findings suggest that the broader taxonomic composition of the gut microbiota remained relatively stable, highlighting the potential relevance of early, subtle shifts in microbial diversity over more pronounced structural changes.

Distinct microbiota profiles were also observed between participants on INSTI-based versus NNRTI-based regimens. INSTI-treated participants exhibited significantly higher abundances of *Tyzzerella_4* and *Lactobacillus*, taxa associated with energy harvesting and adiposity. The observed differences in gut microbiota between INSTI-based and NNRTI-based ART regimens could stem from distinct interactions with the gut environment and host metabolic processes. While some studies have described the beneficial effects of INSTIs on gut permeability, reversal of HIV-associated gut dysbiosis and restoration of gut biodiversity comparing to NNRTI- and PI-containing regimens,[44,45] others suggest that in people with metabolic syndrome, INSTI-based regimens may instead be linked to increased dysbiosis and a higher abundance of pro-inflammatory taxa than PI-based regimens.[46]

These effects of INSTI on gut health may facilitate the proliferation of energy-harvesting taxa such as *Tyzzerella_4* and some

Downloaded from https://academic.oup.com/jac/advance-article/doi/10.1093/jac/dkaf182/8157146 by guest on 27 June 2025

strains of *Lactobacillus*. INSTI-associated weight gain is most pronounced in the first two years of treatment initiation in ART-naïve individuals,[47,48] when microbiota shifts in a dysbiotic gut environment are likely to have the greatest impact. In pretreated patients switching regimens, these shifts may be less pronounced, moderating their impact on weight.[49–54] Over time, the relative abundance and influence of energy-harvesting taxa may decline, potentially explaining the lack of significant weight gain differences between regimens in this study.

Beyond microbiota dynamics, INSTIs are known to induce host metabolic alterations, including insulin resistance and an increased risk of diabetes, independent of BMI.[55] These metabolic changes may create a feedback loop with the gut microbiota, promoting the proliferation of taxa that contribute to metabolic dysfunction. For instance, shifts in glucose and lipid profiles may support the growth of *Lactobacillus and Tyzzerella*, which are efficient at extracting energy from dietary sources and have been associated with increased adiposity.[30,56] Additionally, the increased bile acid biosynthesis observed in INSTI users compared to NNRTI users[57] may promote the growth of bile-tolerant taxa such as *Tyzzerella*_4.[58] It has also been suggested that dolutegravir may enhance hunger sensations and exacerbate the effects of a high-calorie diet on microbiota composition.[59] These interactions suggest that, among the multifactorial mechanisms potentially driving INSTI-associated weight gain, both microbial and host metabolic pathways might be involved.

The study has limitations. Its single-center design and specific inclusion criteria may limit the generalizability of findings to broader populations of PWH. Additionally, the operational definition of significant weight gain, while based on cardiometabolic recommendations, requires further validation in this population. The threshold may also oversimplify continuous weight changes, potentially overlooking smaller but clinically meaningful trends. Furthermore, the limited representation of tenofovir alafenamide users in the cohort precluded meaningful analysis of tenofovir alafenamide's impact on weight and microbiota composition. Finally, the predominance of dolutegravir in the INSTI group and rilpivirine in the NNRTI group limits our ability to distinguish class-wide effects from those attributable to individual drugs.

Despite growing interest in microbiota and metabolic health, information on these relationships in PWH remains limited.[36,60] This study builds on the earlier small-scale work by Ishizaka *et al.*,[60] identifying specific taxa associated with weight gain in INSTI-treated PWH. In that case-control longitudinal analysis, participants exhibited persistent gut dysbiosis despite long-term virologically suppressive ART, a pattern that correlated with weight gain and may contribute to the development of metabolic comorbidities.[60] Similarly, a study found that the gut microbiome of individuals treated with INSTIs was enriched in *Bifidobacterium*, a genus also associated with higher BMI.[36] Along with its novel contributions to a relatively unexplored aspect of the aetiology of weight gain in PWH, the study's strengths include a prospective design, standardized data collection protocols, and a five-year follow-up, all of which enhance robustness and reproducibility. The large number of stool samples and high participant retention further ensure the reliability of results, providing valuable insights into microbiota signatures consistently linked to significant weight gain.

In conclusion, this study identifies distinct gut microbiota profiles associated with significant weight gain in PWH, and highlights the enrichment of taxa linked to weight increase, such as *Tyzzerella*_4 and *Lactobacillus*, in individuals receiving INSTI-based regimens. These findings underscore the need for further research into microbiota-mediated mechanisms underlying ART-associated weight changes. Investigating the functional pathways of specific bacterial taxa through complementary metagenomic and metabolomic approaches could yield critical insights, potentially informing strategies to modulate microbiota and mitigate weight-related metabolic risks in PWH.

Acknowledgements

The study would not have been possible without the selfless collaboration of all patients who participated in the project.

Funding

This work was supported by Spanish National Plan for Scientific and Technical Research and Innovation, European Regional Development Fund (ERDF) and Instituto de Salud Carlos III (PI16/01740, PI18/01861, CM19/00160, CM20/00066, CM21/00186, CM22/00026 and PI22/01949); Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación and European Union—NextGenerationEU-European Union (CB21/13/00011); Universidad Miguel Hernandez y Fundacion para el Fomento de la Investigacion Sanitaria y Biomedica de la Comunidad Valenciana UMH-FISABIO, Generalitat Valenciana (A-32 2020); Conselleria de Innovación, Universidades, Ciencia y Sociedad Digital, Generalitat Valenciana (AICO/2021/205).

Transparency declarations

The authors declare no competing interests.

Author contributions

F.G. and M.M. conceived and designed the study; J.G.-A., R.G., S.P., P.M., G.T. and M.F.-G. participated in patient care, investigation and data collection; J.A.G. carried out the statistical analysis; M.F.-G. performed the processing of faecal samples; M.J.G. conducted the extraction, amplification and sequencing of the 16S ribosomal RNA gene; F.G., M.M. and J.G.-A. wrote the first draft of the manuscript. All authors contributed to the revision of the final version of the manuscript and approved the final version submitted.

Supplementary data

Figures S1–S8 and Tables S1–S10 are available as Supplementary data at *JAC* Online.

References

1 WHO. Obesity and overweight. 2024. https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight.

2 NCD Risk Factor Collaboration. Evolution of BMI over time. https://ncdrisc.org/obesity-prevalence-ranking.html.

3 Wang J, Huang Y, Feng N *et al.* Global disease burden attributable to high body mass index in young adults from 1990 to 2019, with projections to 2050: a systematic analysis for the global burden of disease study 2019. *Diabetes Metab Res Rev* 2024; **40**: e70007. https://doi.org/10.1002/dmrr.70007

Downloaded from https://academic.oup.com/jac/advance-article/doi/10.1093/jac/dkaf182/8157146 by guest on 27 June 2025

4 Koethe JR, Jenkins CA, Lau B *et al*. Rising obesity prevalence and weight gain among adults starting antiretroviral therapy in the United States and Canada. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2016; **32**: 50–8. https://doi.org/10.1089/aid.2015.0147

5 Gizamba JM, Davies J, Africa C *et al*. Prevalence of obesity, hypertension and diabetes among people living with HIV in South Africa: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2023; **23**: 861. https://doi.org/10.1186/s12879-023-08736-5

6 Cervo A, Sebastiani G, Milic J *et al*. Dangerous liaisons: NAFLD and liver fibrosis increase cardiovascular risk in HIV. *HIV Med* 2022; **23**: 911–21. https://doi.org/10.1111/hiv.13274

7 Vancampfort D, Mugisha J, De Hert M *et al*. Global physical activity levels among people living with HIV: a systematic review and meta-analysis. *Disabil Rehabil* 2018; **40**: 388–97. https://doi.org/10.1080/09638288.2016.1260645

8 Hyle EP, Martey EB, Bekker LG *et al*. Diet, physical activity, and obesity among ART-experienced people with HIV in South Africa. *AIDS Care* 2023; **35**: 71–7. https://doi.org/10.1080/09540121.2021.2012556

9 Wohl DA, Koethe JR, Sax PE *et al*. Antiretrovirals and weight change: weighing the evidence. *Clin Infect Dis* 2024; **79**: 999–1005. https://doi.org/10.1093/cid/ciae191.

10 Pantazis N, Sabin CA, Grabar S *et al*. Changes in bodyweight after initiating antiretroviral therapy close to HIV-1 seroconversion: an international cohort collaboration. *Lancet HIV* 2024; **11**: e660–9. https://doi.org/10.1016/S2352-3018(24)00183-8

11 Sax PE, Erlandson KM, Lake JE *et al*. Weight gain following initiation of antiretroviral therapy: risk factors in randomized comparative clinical trials. *Clin Infect Dis* 2020; **71**: 1379–89. https://doi.org/10.1093/cid/ciz999

12 Galdamez R, García JA, Fernández M *et al*. Short-term increase in risk of overweight and concomitant systolic blood pressure elevation in treatment-Naïve persons starting INSTI-based antiretroviral therapy. *Open Forum Infect Dis* 2019; **6**: ofz491. https://doi.org/10.1093/ofid/ofz491

13 Savinelli S, Newman E, Mallon PWG. Metabolic complications associated with use of integrase strand transfer inhibitors (INSTI) for the treatment of HIV-1 infection: focus on weight changes, lipids, glucose and bone metabolism. *Curr HIV/AIDS Rep* 2024; **21**: 293–308. https://doi.org/10.1007/s11904-024-00708-x

14 Vos AG, Venter WDF. Cardiovascular toxicity of contemporary antiretroviral therapy. *Curr Opin HIV AIDS* 2021; **16**: 286–91. https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000702

15 Bouter KE, van Raalte DH, Groen AK *et al*. Role of the gut microbiome in the pathogenesis of obesity and obesity-related metabolic dysfunction. *Gastroenterology* 2017; **152**: 1671–8. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.12.048

16 Villanueva-Millán MJ, Pérez-Matute P, Oteo JA. Gut microbiota: a key player in health and disease. A review focused on obesity. *J Physiol Biochem* 2015; **71**: 509–25. https://doi.org/10.1007/s13105-015-0390-3

17 Dillon SM, Frank DN, Wilson CC. The gut microbiome and HIV-1 pathogenesis: a two-way street. *AIDS* 2016; **30**: 2737–51. https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001289

18 Wang Z, Peters BA, Bryant M *et al*. Gut microbiota, circulating inflammatory markers and metabolites, and carotid artery atherosclerosis in HIV infection. *Microbiome* 2023; **11**: 119. https://doi.org/10.1186/s40168-023-01566-2

19 Pinart M, Dötsch A, Schlicht K *et al*. Gut microbiome composition in obese and non-obese persons: a systematic review and meta-analysis. *Nutrients* 2021; **14**: 12. https://doi.org/10.3390/nu14010012

20 Crovesy L, Masterson D, Rosado EL. Profile of the gut microbiota of adults with obesity: a systematic review. *Eur J Clin Nutr* 2020; **74**: 1251–62. https://doi.org/10.1038/s41430-020-0607-6

21 Ryom L, Lundgren JD, El-Sadr W *et al*. Cardiovascular disease and use of contemporary protease inhibitors: the D:A:D international prospective multicohort study. *Lancet HIV* 2018; **5**: e291–300. https://doi.org/10.1016/S2352-3018(18)30043-2

22 Ryan DH, Yockey SR. Weight loss and improvement in comorbidity: differences at 5%, 10%, 15%, and over. *Curr Obes Rep* 2017; **6**: 187–94. https://doi.org/10.1007/s13679-017-0262-y

23 Quast C, Pruesse E, Yilmaz P *et al*. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 2013; **41**: D590–6. https://doi.org/10.1093/nar/gks1219

24 Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ *et al*. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* 2016; **13**: 581–3. https://doi.org/10.1038/nmeth.3869

25 Chen Y, Ye W, Zhang Y *et al*. High speed BLASTN: an accelerated MegaBLAST search tool. *Nucleic Acids Res* 2015; **43**: 7762–8. https://doi.org/10.1093/nar/gkv784

26 McMurdie PJ, Holmes S. Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 2013; **8**: e61217. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217

27 Oksanen J, Simpson G, Blanchet F *et al*. vegan: Community ecology package. Version 2.6-4. 2022. https://CRAN.R-project.org/package=vegan.

28 Lin H, Eggesbø M, Peddada SD. Linear and nonlinear correlation estimators unveil undescribed taxa interactions in microbiome data. *Nat Commun* 2022; **13**: 4946. https://doi.org/10.1038/s41467-022-32243-x

29 Lozano CP, Wilkens LR, Shvetsov YB *et al*. Associations of the dietary inflammatory index with total adiposity and ectopic fat through the gut microbiota, LPS, and C-reactive protein in the multiethnic cohort-adiposity phenotype study. *Am J Clin Nutr* 2022; **115**: 1344–56. https://doi.org/10.1093/ajcn/nqab398

30 Kelly TN, Bazzano LA, Ajami NJ *et al*. Gut microbiome associates with lifetime cardiovascular disease risk profile among Bogalusa heart study participants. *Circ Res* 2016; **119**: 956–64. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309219

31 Borgo F, Garbossa S, Riva A *et al*. Body mass index and sex affect diverse microbial niches within the gut. *Front Microbiol* 2018; **9**: 213. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00213

32 Mena-Vázquez N, Ruiz-Limón P, Moreno-Indias I *et al*. Adiposity is associated with expansion of the genus Dialister in rheumatoid arthritis patients. *Biomed Pharmacother* 2023; **160**: 114388. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114388

33 Aranaz P, Ramos-Lopez O, Cuevas-Sierra A *et al*. A predictive regression model of the obesity-related inflammatory status based on gut microbiota composition. *Int J Obes (Lond)* 2021; **45**: 2261–8. https://doi.org/10.1038/s41366-021-00904-4

34 Ling Z, Jin C, Xie T *et al*. Alterations in the fecal microbiota of patients with HIV-1 infection: an observational study in a Chinese population. *Sci Rep* 2016; **6**: 30673. https://doi.org/10.1038/srep30673

35 Martínez-Sanz J, Talavera-Rodríguez A, Díaz-Álvarez J *et al*. A gut microbiome signature for HIV and metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease. *Front Immunol* 2023; **14**: 1297378. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1297378

36 Narayanan A, Kieri O, Vesterbacka J *et al*. Exploring the interplay between antiretroviral therapy and the gut-oral microbiome axis in people living with HIV. *Sci Rep* 2024; **14**: 17820. https://doi.org/10.1038/s41598-024-68479-4

37 Cook RR, Fulcher JA, Tobin NH *et al*. Combined effects of HIV and obesity on the gastrointestinal microbiome of young men who have sex with men. *HIV Med* 2020; **21**: 365–77. https://doi.org/10.1111/hiv.12838

38 Wu F, Guo X, Zhang J *et al*. Phascolarctobacterium faecium abundant colonization in human gastrointestinal tract. *Exp Ther Med* 2017; **14**: 3122–6. https://doi.org/10.3892/etm.2017.4878

Downloaded from https://academic.oup.com/jac/advance-article/doi/10.1093/jac/dkaf182/8157146 by guest on 27 June 2025

39 Muñiz Pedrogo DA, Jensen MD, Van Dyke CT *et al*. Gut microbial carbohydrate metabolism hinders weight loss in overweight adults undergoing lifestyle intervention with a volumetric diet. *Mayo Clin Proc* 2018; **93**: 1104–10. https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2018.02.019

40 Liu Y, Chen L, Liu L *et al*. Interplay between dietary intake, gut microbiota, and metabolic profile in obese adolescents: sex-dependent differential patterns. *Clin Nutr* 2022; **41**: 2706–19. https://doi.org/10.1016/j.clnu.2022.10.009

41 Serena C, Ceperuelo-Mallafré V, Keiran N *et al*. Elevated circulating levels of succinate in human obesity are linked to specific gut microbiota. *ISME J* 2018; **12**: 1642–57. https://doi.org/10.1038/s41396-018-0068-2

42 Sanz-Herranz Y, López-Almela I, Gómez del Pulgar EM *et al*. Phascolarctobacterium faecium para su uso en la prevención y tratamiento de la obesidad y sus comorbilidades. ES Patent "2763874 A1", November 30, 2018–June 1, 2020. http://hdl.handle.net/10261/242051

43 Petersen C, Bell R, Klag KA *et al*. T cell-mediated regulation of the microbiota protects against obesity. *Science* 2019; **365**: eaat9351. https://doi.org/10.1126/science.aat9351

44 Villanueva-Millán MJ, Pérez-Matute P, Recio-Fernández E *et al*. Differential effects of antiretrovirals on microbial translocation and gut microbiota composition of HIV-infected patients. *J Int AIDS Soc* 2017; **20**: 21526. https://doi.org/10.7448/IAS.20.1.21526

45 Villoslada-Blanco P, Pérez-Matute P, Íñiguez M *et al*. Integrase inhibitors partially restore bacterial translocation, inflammation and gut permeability induced by HIV infection: impact on gut microbiota. *Infect Dis Ther* 2022; **11**: 1541–57. https://doi.org/10.1007/s40121-022-00654-4

46 Baltazar-Díaz TA, Amador-Lara F, Andrade-Villanueva JF *et al*. Gut bacterial communities in HIV-infected individuals with metabolic syndrome: effects of the therapy with integrase strand transfer inhibitor-based and protease inhibitor-based regimens. *Microorganisms* 2023; **11**: 951. https://doi.org/10.3390/microorganisms11040951

47 Venter WDF, Sokhela S, Simmons B *et al*. Dolutegravir with emtricitabine and tenofovir alafenamide or tenofovir disoproxil fumarate versus efavirenz, emtricitabine, and tenofovir disoproxil fumarate for initial treatment of HIV-1 infection (ADVANCE): week 96 results from a randomised, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet HIV* 2020; **7**: e666–76. https://doi.org/10.1016/S2352-3018(20)30241-1

48 Bourgi K, Jenkins CA, Rebeiro PF *et al*. Weight gain among treatment-naïve persons with HIV starting integrase inhibitors compared to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors or protease inhibitors in a large observational cohort in the United States and Canada. *J Int AIDS Soc* 2020; **23**: e25484. https://doi.org/10.1002/jia2.25484

49 Taramasso L, Ricci E, Menzaghi B *et al*. Weight gain: a possible side effect of all antiretrovirals. *Open Forum Infect Dis* 2017; **4**: ofx239. https://doi.org/10.1093/ofid/ofx239

50 Taramasso L, Di Biagio A, Bovis F *et al*. Switching to integrase inhibitors unlinked to weight increase in perinatally HIV-infected young adults and adolescents: a 10-year observational study. *Microorganisms* 2020; **8**: 864. https://doi.org/10.3390/microorganisms8060864

51 Sax PE, Rockstroh JK, Luetkemeyer AF *et al*. Switching to Bictegravir, Emtricitabine, and Tenofovir Alafenamide in virologically suppressed adults with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 2021; **73**: e485–93. https://doi.org/10.1093/cid/ciaa988

52 Burns JE, Stirrup OT, Dunn D *et al*. No overall change in the rate of weight gain after switching to an integrase inhibitor in virologically suppressed adults with HIV. *AIDS* 2020; **34**: 109–14. https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000002379

53 Hagins D, Kumar P, Saag M *et al*. Switching to Bictegravir/Emtricitabine/Tenofovir Alafenamide in black Americans with HIV-1: a randomized phase 3b, multicenter, open-label study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2021; **88**: 86–95. https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000002731

54 Verboeket SO, Boyd A, Wit FW *et al*. Generally rare but occasionally severe weight gain after switching to an integrase inhibitor in virally suppressed AGEhIV cohort participants. *PLoS One* 2021; **16**: e0251205. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251205

55 Rupasinghe D, Bansi-Matharu L, Law M *et al*. Integrase strand transfer inhibitor-related changes in body mass index and risk of diabetes: a prospective study from the RESPOND cohort consortium. *Clin Infect Dis* 2025; **80**: 404–16. https://doi.org/10.1093/cid/ciae406.

56 Corcoran BM, Stanton C, Fitzgerald GF *et al*. Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Appl Environ Microbiol* 2005; **71**: 3060–7. https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3060-3067.2005

57 Vos WAJW, Vadaq N, Matzaraki V *et al*. Cardiometabolic differences in people living with HIV receiving integrase strand transfer inhibitors compared to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors: implications for current ART strategies. *Viruses* 2024; **16**: 582. https://doi.org/10.3390/v16040582

58 Quraishi MN, Sergeant M, Kay G *et al*. The gut-adherent microbiota of PSC-IBD is distinct to that of IBD. *Gut* 2017; **66**: 386–8. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-311915

59 Flexner CW, Kashuba A. Editorial: new drugs for HIV: quo vadis? *Curr Opin HIV AIDS* 2022; **17**: 1–3. https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000710

60 Ishizaka A, Koga M, Mizutani T *et al*. Sustained gut dysbiosis and intestinal inflammation show correlation with weight gain in person with chronic HIV infection on antiretroviral therapy. *BMC Microbiol* 2024; **24**: 274. https://doi.org/10.1186/s12866-024-03431-0

Downloaded from https://academic.oup.com/jac/advance-article/doi/10.1093/jac/dkaf182/8157146 by guest on 27 June 2025

Material Suplementario .

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

Table S1. Weight and body mass index evolution of the study participants during follow-up in relation to significant weight gain.

Categorical variables are expressed as number (percentage) and continuous variables as median (IQR).

	Significant weight gain*		All participants	
	Yes	No		P value
Patients, no.	70 (34.7)	132 (65.3)	202 (100)	-
BMI, kg/m2				
Baseline	23.7 (21.7- 25.8)	25.5 (23.3- 27.9)	24.7 (22.5 - 27.7)	0.005
48-week visit	24.6 (22.2- 27.9)	25.4 (23.3- 28.1)	25.2 (22.9 - 28.1)	0.275
96-week visit	25.8 (22.8- 28.4)	25.4 (23.1- 27.9)	25.5 (22.9 - 28.2)	0.629
144-week visit	26.0 (23.5- 28.1)	25.5 (22.9- 27.6)	25.6 (23.1 - 27.8)	0.263
192-week visit	25.8 (22.8- 28.3)	25.4 (23.1- 27.8)	25.5 (23.0 - 28.0)	0.511
240-week visit	26.0 (22.9- 29.1)	25.7 (22.9- 28.0)	25.7 (22.9 - 28.4)	0.285
BMI category, median (%)				
Baseline				0.073
Normal weight	44 (62.9)	61 (46.2)	105 (52.0)	
Overweight	20 (28.6)	57 (43.2)	77 (38.1)	
Obese	6 (8.6)	14 (10.6)	20 (9.9)	
48-week visit				0.345
Normal weight	39 (55.7)	61 (46.2)	100 (49.5)	
Overweight	23 (32.9)	57 (43.2)	80 (39.6)	
Obese	8 (11.4)	14 (10.6)	22 (10.9)	
96-week visit				0.705
Normal weight	29 (42.6)	63 (48.5)	92 (46.5)	
Overweight	30 (44.1)	53 (40.8)	83 (41.9)	
Obese	9 (13.2)	14 (10.8)	23 (11.6)	
144-week visit				0.198
Normal weight	30 (44.8)	53 (42.4)	83 (43.2)	
Overweight	26 (38.8)	61 (48.8)	87 (45.3)	
Obese	11 (16.4)	11 (8.8)	22 (11.5)	
192-week visit				0.360
Normal weight	25 (39.7)	55 (47.0)	80 (44.4)	
Overweight	28 (44.4)	51 (43.6)	79 (43.9)	
Obese	10 (15.9)	11 (9.4)	21 (11.7)	
240-week visit				0.520
Normal weight	25 (41.7)	49 (45.0)	74 (43.8)	
Overweight	26 (43.3)	50 (45.9)	76 (45.0)	
Obese	9 (15.0)	10 (9.2)	19 (11.2)	
Weight, kg				
Baseline	67.8 (61.0- 80.1)	73.5 (66.0- 85.0)	72.0 (64.0 - 83.0)	0.010
48-week visit	74.8 (62.2- 82.0)	74.5 (66.9- 85.2)	74.5 (65.0 - 84.0)	0.201
96-week visit	75.8 (65.4- 83.3)	74.0 (66.3- 85.0)	74.0 (65.5 - 84.4)	0.986
144-week visit	76.5 (65.5- 82.5)	74.2 (66.0- 84.0)	75.1 (65.9 - 83.5)	0.521
192-week visit	77.5 (64.2- 83.2)	74.0 (66.8- 83.5)	75.0 (66.2 - 83.5)	0.669
240-week visit	76.5 (64.3- 85.2)	74.6 (67.0- 84.5)	75.0 (65.8 - 84.5)	0.574
Weight gain relative to baseline, kg				
48-week visit	2.5 (0.0- 5.0)	0.2 (-1.6- 1.8)	0.7 (-1.2 - 2.5)	<0.001
96-week visit	4.8 (0.4- 8.5)	0.5 (-2.0- 2.2)	0.9 (-1.5 - 4.5)	<0.001
144-week visit	5.8 (0.4- 9.0)	0.0 (-3.0- 2.5)	0.9 (-2.0 - 4.5)	<0.001
192-week visit	5.5 (0.0- 8.8)	-0.1 (-2.5- 2.6)	1.0 (-2.0 - 5.3)	<0.001
240-week visit	4.6 (1.0- 9.1)	0.0 (-3.5- 2.6)	1.1 (-3.0 - 4.3)	<0.001

BMI, body mass index.

* Significant weight gain was defined as a weight increase ≥10%/year between two consecutive measurements or a weight increase ≥10% compared with baseline body weight.

Table S2. Baseline food frequency questionnaire of the study participants by significant weight gain.

	Significant weight gain*					
	Yes		No		P value	
Patients, no.	70	(34.7)	132	(65.3)	-	
DAIRY PRODUCTS						
Whole milk, (1 glass, 200 cc)	0.6234 (0.9029)		0.4525 (0.8914)		0.2184	
Skim milk (1 glass, 200 cc)	0.5419 (0.8111)		0.5837 (1.0335)		0.7823	
Condensed milk (1 tablespoon)	0.1426 (0.7812)		0.2046 (0.6947)		0.5879	
Yogurt (One, 125 grams)	0.3491 (0.4977)		0.5192 (0.8655)		0.1350	
Cottage cheese, curd, fresh cheese (100g)	0.2119 (0.4030)		0.1708 (0.2489)		0.3906	
Cream cheese or cheese portions (One portion)	0.2203 (0.4152)		0.0920 (0.2789)		0.0151	
Aged or semi-aged cheese: Manchego (1 piece)	0.3556 (0.3397)		0.3920 (0.6784)		0.6808	
Custard, flan, pudding (one)	0.1065 (0.2243)		0.1887 (0.5342)		0.2341	
Ice cream (1 cone, cup, or scoop)	0.1752 (0.3766)		0.1014 (0.1913)		0.0723	
EGGS, MEATS, FISH						
Chicken eggs (one)	0.3626 (0.2498)		0.3885 (0.4316)		0.6475	
Chicken with skin (one serving or piece)	0.1078 (0.1487)		0.1259 (0.1852)		0.4972	
Skinless chicken (one serving or piece)	0.2318 (0.3384)		0.2585 (0.2157)		0.5064	
Beef, pork, lamb as main dish (one serving)	0.1925 (0.2287)		0.2321 (0.2198)		0.2395	
Game meat: rabbit, quail, duck (one serving)	0.0465 (0.0959)		0.0485 (0.0880)		0.8853	
Beef, pork, or chicken liver (one serving)	0.0382 (0.0839)		0.0279 (0.0632)		0.3368	
Offal: tripe, brains, sweetbreads (100 g)	0.0445 (0.1506)		0.0193 (0.0834)		0.1406	
Cured meats: ham, salami, mortadella (50g)	0.3421 (0.4640)		0.4526 (0.6749)		0.2303	
Sausages and similar products (one medium)	0.1325 (0.2090)		0.0915 (0.1412)		0.1091	
Pâtés, foie gras (half serving, 50 g)	0.1091 (0.3363)		0.0569 (0.1140)		0.1199	
Hamburger (one, 100 g)	0.1150 (0.1880)		0.0923 (0.1094)		0.2932	
Bacon (two slices, 50 g)	0.0613 (0.1379)		0.0644 (0.1101)		0.8694	
Assorted fried fish (one serving or portion)	0.0966 (0.1342)		0.1026 (0.1515)		0.7856	
Boiled fish:hake,sole,sardines, tuna (one serving)	0.1689 (0.2040)		0.1619 (0.1912)		0.8131	
Salted fish: cod, anchovies (half serving, 50 g)	0.1044 (0.3213)		0.0501 (0.0921)		0.0841	
Canned fish: tuna, sardines, herrings (one can)	0.2082 (0.2339)		0.2299 (0.4450)		0.7097	
Clams, mussels, oysters (one serving, 100 g)	0.0768 (0.1156)		0.0802 (0.1528)		0.8743	
Squid, octopus (one serving, 100 g)	0.0692 (0.1150)		0.0657 (0.1011)		0.8253	
Shellfish: shrimp, lobster, and similar (100 g)	0.0544 (0.0827)		0.0581 (0.1186)		0.8159	
VEGETABLES AND LEGUMES						
Cooked spinach (one serving)	0.1123 (0.1830)		0.0633 (0.1035)		0.0185	
Cooked cabbage, cauliflower, broccoli (one serv.)	0.1606 (0.3420)		0.1351 (0.1843)		0.5030	
Lettuce, endives, escarole (one serving)	0.4782 (0.7939)		0.4827 (0.3850)		0.9577	
Tomatoes (one medium)	0.6372 (0.8491)		0.6438 (0.6446)		0.9515	
Onion (one medium)	0.5153 (0.7921)		0.4807 (0.6055)		0.7362	
Carrot, pumpkin (one or small serving)	0.3012 (0.4131)		0.3511 (0.6196)		0.5564	
Cooked green beans (one serving)	0.1687 (0.2259)		0.2216 (0.5654)		0.4633	
Eggplants, zucchinis, cucumbers (one)	0.3078 (0.7331)		0.1654 (0.2153)		0.0444	
Bell peppers (one)	0.3567 (0.7414)		0.1672 (0.1982)		0.0082	
Asparagus (one serving or portion)	0.1403 (0.2016)		0.0842 (0.1305)		0.0225	
Mushrooms (one serving)	0.2758 (0.7369)		0.1355 (0.1701)		0.0471	
Cooked legumes: lentils, chickpeas, kidney beans	0.3205 (0.5716)		0.2866 (0.5539)		0.6892	
Cooked peas (one serving)	0.1495 (0.3535)		0.0950 (0.1534)		0.1433	
FRUITS						
Oranges, grapefruit, mandarins (One)	0.4946 (0.8447)		0.3362 (0.4937)		0.1065	
Fresh orange juice (one small glass, 125 cc)	0.3923 (0.8446)		0.2853 (0.4006)		0.2430	
Banana (one)	0.4859 (0.6140)		0.4284 (0.4722)		0.4782	
Apple, pear (one medium)	0.3092 (0.6044)		0.2525 (0.3574)		0.4211	
Strawberries (one serving or dessert cup)	0.1423 (0.2245)		0.1443 (0.2229)		0.9536	
Cherries (one serving or dessert cup)	0.1045 (0.1663)		0.0976 (0.1980)		0.8140	
Peach, apricots (one medium)	0.1475 (0.3538)		0.1184 (0.1905)		0.4723	
Fresh figs (one)	0.2171 (0.7874)		0.0986 (0.2026)		0.1258	
Watermelon, cantaloupe (one slice)	0.2528 (0.3045)		0.3239 (0.6030)		0.3836	
Grapes (one medium bunch or dessert plate)	0.3078 (0.7979)		0.1561 (0.2403)		0.0645	
Olives (small serving or plate)	0.3078 (0.7839)		0.2691 (0.5826)		0.7070	
Fruit in syrup: peach, pears, pineapple (2 halves)	0.1914 (0.8166)		0.0583 (0.1456)		0.0889	
Dried fruits: pine nuts, almonds (one serving)	0.4491 (0.6653)		0.3784 (0.4570)		0.3930	

BREAD, CEREALS, AND SIMILAR			
White bread (One small piece or 3 slices)	1.0503 (1.0101)	0.9928 (1.2269)	0.7454
Whole wheat bread (One small piece or 3 slices)	0.4004 (0.5537)	0.3803 (0.6190)	0.8285
Breadsticks, crackers, and similar items (one unit)	0.2546 (0.7339)	0.1079 (0.2984)	0.0598
French fries (one serving, 100 g)	0.1926 (0.2871)	0.1639 (0.2328)	0.4612
Boiled, baked potatoes (one medium potato)	0.2874 (0.3845)	0.3055 (0.5713)	0.8192
Bag of potato chips (one small bag, 25-30 g)	0.1522 (0.3635)	0.1183 (0.2755)	0.4822
Cooked rice (one medium plate)	0.4249 (0.3722)	0.2949 (0.2316)	0.0033
Pasta: spaghetti, macaroni (one plate)	0.4377 (0.4628)	0.2767 (0.2084)	0.0011
OILS AND FATS			
Olive oil (1 tablespoon)	1.8644 (1.5142)	1.8430 (1.5758)	0.9272
Other vegetable oils: sunflower (1 tablespoon)	0.2205 (0.4306)	0.2397 (0.5662)	0.8126
Margarine added to bread or food (1 tablespoon)	0.1344 (0.3752)	0.0925 (0.2150)	0.3377
Butter added to bread or food (1 tablespoon)	0.1414 (0.3842)	0.0807 (0.1773)	0.1451
Lard (pork) added to bread or food (1 tablespoon)	0.0032 (0.0194)	0.0114 (0.0589)	0.2803
SWEETS AND PASTRIES			
Maria biscuits (1 biscuit)	0.4564 (1.1004)	0.5682 (1.3773)	0.5680
Chocolate biscuits (1 double biscuit)	0.2973 (0.7545)	0.1348 (0.3676)	0.0486
Croissant, doughnuts (one)	0.1269 (0.2232)	0.1604 (0.4561)	0.5729
Muffin, sponge cake (one)	0.2924 (0.6093)	0.2342 (0.4219)	0.4404
Cakes, pie (unit or medium slice)	0.1418 (0.5594)	0.0776 (0.1645)	0.2421
Churros (fried dough), 1 serving	0.1004 (0.5585)	0.0197 (0.0520)	0.1185
Chocolate, chocolates (one bar or two chocolates)	0.3262 (0.6704)	0.2022 (0.3474)	0.0937
Cocoa powder and similar (1 tablespoon)	0.3089 (0.9354)	0.1369 (0.2858)	0.0617
DRINKS			
White, red, or rosé wine (1 glass, 125 cc)	0.1312 (0.2234)	0.1514 (0.2729)	0.6090
Beer (one draft or small bottle, 200 cc)	0.3920 (0.8563)	0.3438 (0.5744)	0.6434
Brandy, gin, rum, whiskey, vodka, 40º (1 shot)	0.0786 (0.3351)	0.0431 (0.1246)	0.2940
Carbonated soft drinks: cola, orange, lemon (one)	0.4343 (0.8974)	0.3401 (0.6617)	0.4111
Packaged fruit juice (1 small can or glass, 200 cc)	0.3026 (0.6243)	0.2637 (0.6004)	0.6784
Coffee (1 cup)	1.4768 (1.6080)	1.2780 (1.2353)	0.3402
Decaffeinated coffee (1 cup)	0.4822 (1.2376)	0.3141 (0.8731)	0.2819
Tea (1 cup)	0.4519 (1.1622)	0.3556 (0.7316)	0.4880
PRECOOKED, PRE-PREPARED, AND MISCELLANEOUS			
Croquettes (one)	0.0626 (0.1395)	0.0550 (0.1293)	0.7073
Fried fish sticks or delights (one unit)	0.0674 (0.1653)	0.0337 (0.1007)	0.0867
Packaged soups and cream soups (one serving)	0.0695 (0.1528)	0.0675 (0.1480)	0.9330
Mayonnaise (one tablespoon)	0.1883 (0.7462)	0.1443 (0.2793)	0.5598
Tomato sauce (half a cup)	0.3204 (0.8369)	0.1785 (0.2955)	0.0939
Spices: Tabasco, pepper, chili (half a teaspoon)	0.1756 (0.3009)	0.1226 (0.3047)	0.2598
Salt (one pinch or two-finger pinch)	1.2909 (1.2511)	1.3429 (1.2847)	0.7888
Garlic (one clove)	0.6510 (1.0759)	0.4797 (0.6056)	0.1682
Jams, honey (one tablespoon)	0.2938 (0.7929)	0.2207 (0.3746)	0.3967
Sugar (e.g., in coffee, desserts, etc) (one teaspoon)	1.4613 (1.6622)	1.2192 (1.4478)	0.3072
Plant-based milk: soy, rice, oat, almond	0.2546 (0.7604)	0.1968 (0.5102)	0.5874

Data are expressed as median (SD; standard desviation). Mann-Whitney U test was used for group comparison. For each food item, the number of units consumed per day is shown.

* Significant weight gain was defined as a weight increase ≥10%/year between two consecutive measurements or a weight increase ≥10% compared with baseline body weight.

Table S3. Shortened dietary questionnaire of the study participants in relation to significant weight gain.

	Significant weight gain		
	Yes	No	P value
Patients, no.	70 (34.7)	132 (65.3)	-
Dairy products	2.6321 (1.9683)	2.5179 (2.3725)	0.7562
Eggs, Meat, and Seafood	2.4586 (1.5660)	2.5765 (1.5127)	0.6316
Vegetables and legumes	3.9820 (5.1091)	3.1435 (1.8203)	0.1226
Fruits	3.7166 (3.9675)	2.8076 (1.7417)	0.0496
Pasta	3.1341 (1.9943)	2.5109 (1.4543)	0.0219
Oils	2.4132 (1.6470)	2.2458 (1.7365)	0.5305
Cookies and Chocolates	2.0583 (3.9180)	1.5167 (2.2669)	0.2413
Alcohol and Coffee	3.7653 (3.4170)	3.0376 (2.2732)	0.0906
Fried and Processed Foods	4.5472 (3.8841)	3.7385 (2.6719)	0.1112
Total calorie diet	5074.9 (3777.1-6355.9)	4197.5 (3031.6-5791.6)	0.0317

Data are expressed as median (SD; standard desviation). Mann-Whitney U test was used for group comparison. For each food group, the number of units consumed per day is shown. * Significant weight gain was defined as a weight increase ≥10%/year between two consecutive measurements or a weight increase ≥10% compared with baseline body weight.

Table S4. Physical activity by significant weight gain group.

	Significant weight gain	No significant weight gain	All participants	P value
Total N (%)	N=70 (34.7)	N=132 (65.3)	N=202	
No. of days of intense physical activity last week	0 (0-3)	0 (0-2)	0 (0-2.5)	0.502
Minutes a day of intense physical activity	55 (0-90)	60 (0-67.5)	60 (0-75)	0.865
No. of days of moderate physical activity last week	2 (0-5)	2 (0-5)	2 (0-5)	0.851
Minutes a day of moderate physical activity	60 (30-195)	60 (30-90)	60 (30-90)	0.167
No. of days walking 10 min. straight last week	6 (2.5-7)	7 (5-7)	7 (4.3-7)	0.252
No. minutes you walk daily	60 (22.5-115)	60 (30-90)	60 (30-90)	0.672
Minutes spent sitting on a workday in the last week	150 (60-360)	180 (75-330)	180 (60-360)	0.603
MET / week	887 (165-3365)	1040 (231-2245)	951 (231-2772)	0.920

Data are expressed as median (interquartile range). Mann-Whitney U test was used for group comparison. MET, metabolic equivalent of task. MET represents the energy expended during various activities relative to sitting quietly, which is defined as one MET. Physical activities can be rated using METs to indicate their intensity. Moderate physical activity: ≥600 METS; intense physical activity ≥1500 MET.

Table S5. Weight and body mass index evolution of the study participants during follow-up according to the antiretroviral regimen.

	Antiretroviral treatment		
	INSTI-containing regimen	**NNRTI-containing regimen**	**P value**
Patients, no.	63 (44.3)	79 (55.6)	-
BMI, kg/m2			
Baseline	25 (22.2- 27.8)	24.7 (22.5- 27.6)	1.000
48-week visit	25.2 (23.1- 27.7)	25.3 (22.7- 28.6)	0.933
96-week visit	26 (22.9- 27.9)	25.5 (22.8- 28)	0.892
144-week visit	25.6 (22.7- 27.3)	25.6 (23.3- 27.6)	0.651
192-week visit	26 (23- 27.7)	25.6 (22.7- 28.1)	0.772
240-week visit	26.2 (22.7- 28.1)	25.8 (22.4- 28.7)	0.783
Weight gain relative to baseline, kg			
48-week visit	0.5 (-1.6- 3.5)	1 (-1- 2.5)	0.728
96-week visit	0.8 (-1.0- 4.4)	1.0 (-1.8- 5.1)	0.795
144-week visit	0.5 (-2.5- 3.5)	1.5 (-1- 5)	0.333
192-week visit	0.0 (-1.8- 5.9)	1.5 (-2- 5.5)	0.908
240-week visit	1.5 (-3.5- 4.9)	1.1 (-3- 4.9)	0.967

Categorical variables are expressed as number (percentage) and continuous variables as median (IQR).
BMI, body mass index; INSTI, integrase strand transfer inhibitors; NNRTI, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors

Table S6. Flow-chart of participants follow-up and sample collection at each visit.

	Delivery of faecal samples			
Participants with at least 2 body weight measurements	Baseline visit	48-week visit	96-week visit	Total
Participants with 3 available faecal samples	167	167	167	193 participants with at least 2 faecal samples and 2 body weight measurements
Participants with 2 available faecal samples	25	25	0	
Participants with 2 available faecal samples	1	0	1	
No. of faecal samples	193	192	168	553 faecal samples

Data include participants with at least 2 faecal samples and 2 body weight measurements.

Table S7. Relative abundances at phyla level by significant weight gain group

Phylum	Significant weight gain	No significant weight gain
Firmicutes	59.80	60.11
Bacteroidetes	30.67	30.37
Proteobacteria	4.10	4.16
Actinobacteria	3.49	3.39
Tenericutes	0.49	0.48
Cyanobacteria	0.26	0.28
Euryarchaeota	0.22	0.21
Lentisphaerae	0.19	0.19
Verrucomicrobia	0.18	0.24
Fusobacteria	0.17	0.12
Epsilonbacteraeota	0.10	0.09
Patescibacteria	0.09	0.09
NA	0.07	0.07
Spirochaetes	0.07	0.06
Elusimicrobia	0.05	0.05
Kiritimatiellaeota	0.03	0.03
Synergistetes	0.03	0.06

Data are expressed in %.

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

Table S8. Relative abundances at phyla level by study visit. (a) All participants. (b) Participants exhibiting significant weight gain. (c) Participants not exhibiting significant weight gain

(a)

Phylum	Sample 1, %	Sample 2, %	Sample 3, %
Firmicutes	60.10	59.61	60.27
Bacteroidetes	30.20	30.73	30.53
Proteobacteria	4.31	4.16	3.91
Actinobacteria	3.36	3.53	3.40
Tenericutes	0.51	0.49	0.45
Cyanobacteria	0.27	0.29	0.26
Verrucomicrobia	0.26	0.21	0.18
Euryarchaeota	0.23	0.21	0.21
Lentisphaerae	0.23	0.17	0.18
Fusobacteria	0.14	0.15	0.12
Patescibacteria	0.08	0.10	0.09
Epsilonbacteraeota	0.08	0.08	0.11
NA	0.07	0.05	0.08
Synergistetes	0.06	0.05	0.03
Spirochaetes	0.06	0.06	0.07
Elusimicrobia	0.04	0.05	0.06
Kiritimatiellaeota	0.02	0.04	0.03

Sample 1, baseline sample; Sample 2, 48-week sample; Sample 3, 96-week simple

(b)

Phylum	Sample 1, %	Sample 2, %	Sample 3, %
Firmicutes	59.53	59.72	60.20
Bacteroidetes	30.93	30.48	30.50
Proteobacteria	4.16	4.18	3.95
Actinobacteria	3.35	3.86	3.37
Tenericutes	0.49	0.43	0.55
Cyanobacteria	0.29	0.24	0.24
Verrucomicrobia	0.25	0.14	0.12
Lentisphaerae	0.22	0.13	0.22
Euryarchaeota	0.21	0.24	0.22
Fusobacteria	0.19	0.17	0.14
Epsilonbacteraeota	0.08	0.09	0.13
Spirochaetes	0.08	0.05	0.07
Patescibacteria	0.08	0.12	0.07
NA	0.06	0.09	0.07
Elusimicrobia	0.04	0.03	0.08
Synergistetes	0.03	0.01	0.04
Kiritimatiellaeota	0.02	0.03	0.04

Sample 1, baseline sample; Sample 2, 48-week sample; Sample 3, 96-week sample

Biblioteca Universitaria Miguel Hernández

(c)

Phylum	Sample 1, %	Sample 2, %	Sample 3, %
Firmicutes	60.43	59.56	60.31
Bacteroidetes	29.78	30.84	30.55
Proteobacteria	4.40	4.15	3.90
Actinobacteria	3.36	3.39	3.42
Tenericutes	0.52	0.52	0.40
Verrucomicrobia	0.26	0.24	0.21
Cyanobacteria	0.26	0.31	0.26
Euryarchaeota	0.24	0.20	0.20
Lentisphaerae	0.23	0.18	0.16
Fusobacteria	0.11	0.14	0.12
Patescibacteria	0.09	0.10	0.10
Epsilonbacteraeota	0.08	0.08	0.10
Synergistetes	0.08	0.07	0.03
NA	0.07	0.04	0.09
Spirochaetes	0.04	0.06	0.07
Elusimicrobia	0.04	0.07	0.05
Kiritimatiellaeota	0.03	0.04	0.02

Sample 1, baseline sample; Sample 2, 48-week sample; Sample 3, 96-week sample

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

Table S9. Relative abundances at genus level by significant weight gain group.

Genus	All	Significant weight gain	No significant weight gain
Prevotella_9	11,58	9.99	10.02
Bacteroides	8,26	6.33	6.31
Faecalibacterium	5,65	3.83	4.02
Prevotella_2	3,51	2.43	2.26
Parabacteroides	3,68	2.28	2.39
Ruminococcaceae_UCG-002	3,43	2.17	2.08
Christensenellaceae_R-7_group	3,22	1.94	1.90
Alistipes	3,19	1.87	1.81
Ruminococcaceae_UCG-014	3,01	1.65	1.69
Blautia	3,06	1.60	1.68
Lachnospiraceae_NK4A136_group	2,85	1.52	1.47
Lachnoclostridium	2,89	1.46	1.47
Ruminococcaceae_UCG-005	2,63	1.42	1.24
Subdoligranulum	2,89	1.38	1.39
Streptococcus	2,83	1.38	1.29
Lachnospira	3,03	1.35	1.39
Alloprevotella	2,71	1.27	1.15
Roseburia	2,91	1.21	1.26
Agathobacter	2,90	1.16	1.23
Bifidobacterium	2,71	1.13	1.07
Ruminococcaceae_UCG-010	2,68	1.06	1.05
Dorea	2,86	1.04	1.11
Ruminococcus_1	2,58	0.98	0.94
Holdemanella	2,66	0.97	0.95
Sutterella	2,69	0.95	0.94
Ruminococcaceae_NK4A214_group	2,67	0.95	0.90
Dialister	2,47	0.88	0.79
Phascolarctobacterium	3,36	0.87	1.20
Rikenellaceae_RC9_gut_group	2,37	0.81	0.71
Ruminiclostridium_5	2,60	0.81	0.79
Family_XIII_AD3011_group	2,43	0.77	0.70
Ruminiclostridium_9	2,58	0.77	0.74
Megasphaera	2,60	0.74	0.74
Paraprevotella	2,60	0.74	0.71
Oscillibacter	2,46	0.67	0.66
Catenibacterium	2,75	0.66	0.75
Prevotella_7	2,09	0.64	0.48
Acidaminococcus	2,38	0.62	0.58
Succinivibrio	2,45	0.62	0.59
Ruminococcaceae_UCG-003	2,33	0.59	0.54
Ruminococcus_2	2,55	0.59	0.59
Mitsuokella	2,55	0.58	0.58

Butyricicoccus	2,81	0.58	0.64
Butyricimonas	2,80	0.58	0.61
Ruminococcaceae_UCG-013	2,74	0.56	0.58
Desulfovibrio	2,93	0.55	0.62
Collinsella	2,69	0.51	0.54
Coprococcus_3	2,72	0.50	0.53
Coprococcus_2	2,41	0.50	0.43
Intestinimonas	2,58	0.47	0.47
Ruminiclostridium_6	2,64	0.47	0.47
Odoribacter	2,72	0.47	0.47
Lachnospiraceae_UCG-010	2,61	0.44	0.44
Lachnospiraceae_ND3007_group	2,49	0.42	0.40
Fusicatenibacter	2,69	0.42	0.43
Oribacterium	2,36	0.37	0.36
Erysipelotrichaceae_UCG-003	2,28	0.37	0.33
Lachnospiraceae_UCG-004	2,53	0.36	0.38
Prevotellaceae_NK3B31_group	2,68	0.35	0.40
Flavonifractor	2,42	0.35	0.33
Bilophila	2,24	0.32	0.30
Barnesiella	2,41	0.32	0.32
Lactobacillus	2,02	0.30	0.24
Escherichia/Shigella	2,47	0.30	0.32
Ruminococcaceae_UCG-009	2,34	0.30	0.29
Veillonella	1,84	0.30	0.19
Parasutterella	2,39	0.30	0.28
Negativibacillus	2,42	0.29	0.28
Allisonella	2,57	0.28	0.30
Clostridium_sensu_stricto_1	2,80	0.28	0.33
Senegalimassilia	2,49	0.27	0.27
Lachnospiraceae_UCG-001	2,15	0.26	0.21
Coprococcus_1	2,43	0.24	0.26
UBA1819	2,40	0.24	0.24
Romboutsia	2,53	0.23	0.26
Family_XIII_UCG-001	2,36	0.23	0.22
Anaerostipes	2,93	0.23	0.30
Solobacterium	2,64	0.23	0.25
Ruminococcaceae_UCG-004	2,39	0.23	0.20
Slackia	2,63	0.21	0.23
Candidatus_Soleaferrea	2,61	0.21	0.23
Erysipelatoclostridium	2,57	0.21	0.21
Howardella	2,60	0.21	0.21
Methanobrevibacter	2,52	0.20	0.19
Catenisphaera	2,13	0.20	0.14
Butyrivibrio	2,89	0.19	0.22
GCA-900066575	2,68	0.19	0.19
Caproiciproducens	2,57	0.18	0.18

Biblioteca Universitat Rovira i Virgili Tarragona

Klebsiella	2,07	0.17	0.12
GCA-900066225	2,31	0.17	0.15
Olsenella	2,70	0.17	0.18
Anaerovibrio	2,42	0.16	0.15
Defluviitaleaceae_UCG-011	2,67	0.16	0.17
Holdemania	2,60	0.15	0.16
Coprobacter	2,71	0.15	0.16
Enterorhabdus	2,51	0.15	0.14
Lachnospiraceae_FCS020_group	2,58	0.15	0.14
Oscillospira	2,64	0.14	0.14
CAG-56	2,52	0.14	0.13
Peptococcus	2,49	0.14	0.12
Libanicoccus	2,40	0.14	0.11
Pygmaiobacter	3,01	0.14	0.15
DTU089	2,79	0.13	0.13
Haemophilus	2,86	0.13	0.13
Fusobacterium	2,47	0.13	0.10
Lachnospiraceae_NK3A20_group	2,48	0.12	0.10
Erysipelotrichaceae_UCG-004	2,44	0.12	0.10
Akkermansia	3,26	0.11	0.15
Marvinbryantia	3,49	0.11	0.16
Actinomyces	2,74	0.10	0.11
Turicibacter	2,60	0.10	0.10
Oxalobacter	2,62	0.09	0.10
Lachnospiraceae_UCG-008	1,95	0.08	0.06
Campylobacter	1,75	0.08	0.05
Erysipelotrichaceae_UCG-006	2,37	0.08	0.08
FD2005	1,93	0.08	0.06
Sellimonas	1,90	0.08	0.05
Intestinibacter	2,45	0.08	0.08
Gemella	2,36	0.07	0.08
Fournierella	2,63	0.07	0.09
Granulicatella	2,66	0.07	0.09
Anaerotruncus	2,90	0.07	0.09
Prevotella	2,33	0.07	0.07
Prevotellaceae_UCG-003	2,45	0.07	0.07
Tyzzerella	2,36	0.06	0.06
Victivallis	2,42	0.06	0.06
Faecalitalea	3,32	0.06	0.10
Asteroleplasma	2,25	0.06	0.05
Porphyromonas	1,75	0.06	0.03
Tyzzerella_4	1,58	0.06	0.03
Eggerthella	1,92	0.06	0.04
Catabacter	2,76	0.06	0.07
Eisenbergiella	2,30	0.05	0.05
Atopobium	1,73	0.05	0.03

Biblioteca

Merdibacter	2,54	0.05	0.06
Anaerofilum	1,95	0.05	0.04
Coriobacteriaceae_UCG-003	2,28	0.05	0.05
Megamonas	4,15	0.05	0.10
Tyzzerella_3	3,24	0.05	0.07
Elusimicrobium	2,71	0.05	0.05
Brachyspira	2,12	0.05	0.04
Gordonibacter	2,60	0.05	0.05
Parvimonas	1,74	0.05	0.02
Prevotellaceae_UCG-004	2,55	0.05	0.04
Sneathia	1,63	0.04	0.02
Coprobacillus	1,66	0.04	0.02
Enterobacter	2,89	0.04	0.05
Mailhella	2,51	0.04	0.04
DNF00809	2,10	0.04	0.03
Ezakiella	2,02	0.03	0.03
Shuttleworthia	2,23	0.03	0.03
Hungatella	1,98	0.03	0.03
Ruminiclostridium	1,94	0.03	0.02
Eubacterium	2,50	0.03	0.04
Ruminococcaceae_UCG-007	2,43	0.03	0.03
Adlercreutzia	2,45	0.03	0.03
Anaerosporobacter	2,18	0.03	0.03
Lactococcus	2,61	0.03	0.03
Phocea	2,04	0.03	0.02
Citrobacter	2,54	0.03	0.03
Hafnia-Obesumbacterium	1,41	0.03	0.01
Hydrogenoanaerobacterium	2,80	0.03	0.03
Z20	2,23	0.03	0.02
Dielma	2,22	0.03	0.02
Terrisporobacter	1,70	0.03	0.01
Arcanobacterium	1,85	0.02	0.02
CAG-352	3,71	0.02	0.05
Peptoniphilus	2,14	0.02	0.02
Rothia	1,75	0.02	0.01
Ruminiclostridium_1	2,80	0.02	0.03
Ruminococcaceae_UCG-008	2,09	0.02	0.02
Treponema_2	2,41	0.02	0.02
Weissella	1,92	0.02	0.01
Acetanaerobacterium	3,07	0.02	0.03
Angelakisella	2,95	0.02	0.03
UC5-1-2E3	2,45	0.02	0.02
Anaeroplasma	3,81	0.02	0.04
Curvibacter	3,24	0.02	0.03
Dehalobacterium	2,45	0.02	0.02
Enterococcus	2,18	0.02	0.01

Biblioteca

Faecalicoccus	2,66	0.02	0.02
Leuconostoc	2,11	0.02	0.01
Pseudoflavonifractor	3,60	0.02	0.03
Anaerococcus	2,24	0.02	0.01
Christensenella	3,24	0.02	0.02
Lachnospiraceae_UCG-003	4,44	0.02	0.03
Ruminococcaceae_UCG-011	4,44	0.02	0.03
Gardnerella	1,84	0.02	0.01
Helicobacter	5,17	0.02	0.03
Lactonifactor	1,74	0.02	0.01
Papillibacter	3,54	0.02	0.02
Peptostreptococcus	2,33	0.02	0.01
Prevotella_6	4,39	0.02	0.02
dgA-11_gut_group	5,50	0.01	0.03
Raoultella	4,16	0.01	0.02
CAG-873	5,64	0.01	0.03
Finegoldia	1,99	0.01	0.01
Lachnospiraceae_UCG-002	3,13	0.01	0.01
Prevotellaceae_UCG-001	8,24	0.01	0.04
Pseudomonas	2,46	0.01	0.01
Succinatimonas	4,33	0.01	0.02
Anaerofustis	5,09	0.01	0.02
Cloacibacillus	7,95	0.01	0.03
GCA-900066755	3,02	0.01	0.01
Pyramidobacter	4,45	0.01	0.01
Raoultibacter	2,56	0.01	0.00
Succiniclasticum	2,15	0.01	0.00
Caldicoprobacter	2,44	0.01	0.00
Enorma	3,76	0.01	0.01
Fastidiosipila	2,34	0.01	0.00
Acinetobacter	1,33	0.01	0.00
Cerasicoccus	4,32	0.01	0.01
CHKCI002	6,50	0.01	0.02
Lachnospiraceae_NC2004_group	3,93	0.01	0.01
Mogibacterium	6,29	0.01	0.01
Synergistes	7,38	0.01	0.02
Aerococcus	1,45	0.01	0.00
Aggregatibacter	1,47	0.01	0.00
Ruminococcaceae_V9D2013_group	1,87	0.01	0.00
S5-A14a	1,90	0.01	0.00
Sanguibacteroides	7,75	0.01	0.02
Scardovia	2,52	0.01	0.00
Abiotrophia	3,02	0.00	0.00
Actinobacillus	2,22	0.00	0.00
Anaeroglobus	1,36	0.00	0.00
Anaerovorax	1,84	0.00	0.00

Biblioteca Universitat Rovira i Virgili Tarragona

Candidatus_Methanogranum	2,35	0.00	0.00
Catonella	0,96	0.00	0.00
Caulobacter	2,43	0.00	0.00
Comamonas	2,99	0.00	0.00
Epulopiscium	4,62	0.00	0.01
Lachnospiraceae_UCG-006	2,15	0.00	0.00
Lelliottia	3,85	0.00	0.00
Mycoplasma	1,71	0.00	0.00
Proteus	2,91	0.00	0.00
Providencia	1,20	0.00	0.00
Rikenella	14,55	0.00	0.02
Sporobacter	3,55	0.00	0.00
Trichococcus	1,47	0.00	0.00
45410	5,97	0.00	0.01
Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium	1,59	0.00	0.00
Alloscardovia	0,81	0.00	0.00
Anaerobiospirillum	3,25	0.00	0.00
Atlantibacter	4,20	0.00	0.00
Candidatus_Saccharimonas	0,88	0.00	0.00
Carnobacterium	2,65	0.00	0.00
Cellulosilyticum	4,55	0.00	0.00
Clostridioides	0,95	0.00	0.00
Clostridium_sensu_stricto_3	0,96	0.00	0.00
Cricetibacter	0,97	0.00	0.00
Cuneatibacter	1,96	0.00	0.00
Denitrobacterium	4,00	0.00	0.00
Dysgonomonas	1,04	0.00	0.00
Eggerthia	2,11	0.00	0.00
Harryflintia	2,15	0.00	0.00
Herbinix	2,20	0.00	0.00
Hespellia	3,37	0.00	0.00
Kocuria	1,16	0.00	0.00
Lachnospiraceae_NK4B4_group	4,71	0.00	0.00
Mangrovibacterium	1,23	0.00	0.00
Methanosphaera	2,50	0.00	0.00
Paeniclostridium	7,69	0.00	0.00
Paraclostridium	1,39	0.00	0.00
Pediococcus	2,82	0.00	0.00
Pelospora	8,70	0.00	0.00
Phoenicibacter	4,76	0.00	0.00
Pseudochrobactrum	1,67	0.00	0.00
Psychrobacter	1,69	0.00	0.00
Rahnella	3,45	0.00	0.00
Selenomonas_3	3,57	0.00	0.00
Sphingobium	1,85	0.00	0.00

Biblioteca

Staphylococcus	7,55	0.00	0.00
Varibaculum	2,04	0.00	0.00
W5053	2,08	0.00	0.00
Anthococcus	4,26	0.00	0.00
ATCC-39006	2,22	0.00	0.00
Bacillus	2,27	0.00	0.00
Basfia	2,33	0.00	0.00
Breznakia	2,38	0.00	0.00
Chryseobacterium	2,44	0.00	0.00
Clostridium_sensu_stricto_4	2,50	0.00	0.00
Desulfitibacter	2,56	0.00	0.00
Enhydrobacter	2,63	0.00	0.00
Facklamia	2,70	0.00	0.00
Fructobacillus	8,33	0.00	0.00
hoa5-07d05_gut_group	3,03	0.00	0.00
Isobaculum	3,13	0.00	0.00
Johnsonella	3,23	0.00	0.00
Lachnospiraceae_AC2044_group	3,33	0.00	0.00
Lautropia	3,45	0.00	0.00
Lawsonella	3,57	0.00	0.00
Macrococcus	3,70	0.00	0.00
Methanomassiliicoccus	3,85	0.00	0.00
Morganella	4,00	0.00	0.00
Moryella	4,17	0.00	0.00
Murdochiella	4,35	0.00	0.00
Myroides	4,55	0.00	0.00
Negativicoccus	4,76	0.00	0.00
Neisseria	5,00	0.00	0.00
Novosphingobium	21,05	0.00	0.00
Pantoea	6,67	0.00	0.00
Paracoccus	7,14	0.00	0.00
Planomicrobium	7,69	0.00	0.00
Prevotellaceae_YAB2003_group	8,33	0.00	0.00
Propionibacterium	9,09	0.00	0.00
Pseudocitrobacter	10,00	0.00	0.00
Pseudoscardovia	22,22	0.00	0.00
Sarcina	28,57	0.00	0.00
Sporacetigenium	20,00	0.00	0.00
Syntrophomonas	50,00	0.00	0.00
Ureaplasma	50,00	0.00	0.00

Data are expressed in %. P values were calculated the chi square.

Biblioteca Universitat Rovira i Virgili Tarragona

Table S10. Relative abundances at genus level by study visit. (a) All participants. (b) Participants exhibiting significant weight gain. (c) Participants not exhibiting significant weight gain.

(a)

Genus	Sample 1, %	Sample 2, %	Sample 3, %
Prevotella_9	10.10	10.15	9.76
Bacteroides	5.98	6.56	6.48
Faecalibacterium	3.97	3.99	3.92
Prevotella_2	2.31	2.37	2.28
Parabacteroides	2.27	2.47	2.33
Ruminococcaceae_UCG-002	2.11	2.07	2.15
Christensenellaceae_R-7_group	2.01	1.80	1.91
Alistipes	1.82	1.83	1.85
Ruminococcaceae_UCG-014	1.73	1.65	1.64
Blautia	1.62	1.70	1.65
Lachnospiraceae_NK4A136_group	1.59	1.44	1.43
Subdoligranulum	1.41	1.41	1.34
Lachnospira	1.40	1.38	1.34
Lachnoclostridium	1.38	1.53	1.52
Ruminococcaceae_UCG-005	1.35	1.23	1.30
Roseburia	1.31	1.24	1.18
Streptococcus	1.28	1.30	1.39
Agathobacter	1.18	1.24	1.21
Alloprevotella	1.15	1.16	1.26
Phascolarctobacterium	1.12	1.08	1.06
Ruminococcaceae_UCG-010	1.11	1.00	1.03
Dorea	1.06	1.16	1.06
Bifidobacterium	1.02	1.19	1.08
Ruminococcus_1	1.02	0.95	0.88
Sutterella	1.01	0.93	0.88
Holdemanella	0.98	0.97	0.93
Ruminococcaceae_NK4A214_group	0.92	0.89	0.92
Rikenellaceae_RC9_gut_group	0.83	0.62	0.76
Dialister	0.79	0.82	0.86
Ruminiclostridium_9	0.76	0.71	0.77

Biblioteca UNIVERSITAS Miguel Hernández

Ruminiclostridium_5	0.74	0.77	0.89
Family_XIII_AD3011_group	0.74	0.69	0.74
Megasphaera	0.73	0.74	0.75
Paraprevotella	0.69	0.73	0.74
Succinivibrio	0.66	0.62	0.50
Catenibacterium	0.65	0.78	0.75
Oscillibacter	0.64	0.64	0.72
Ruminococcus_2	0.64	0.59	0.54
Desulfovibrio	0.63	0.54	0.61
Acidaminococcus	0.61	0.62	0.55
Butyricimonas	0.60	0.54	0.66
Ruminococcaceae_UCG-003	0.59	0.54	0.53
Butyricicoccus	0.57	0.68	0.62
Ruminococcaceae_UCG-013	0.55	0.56	0.61
Coprococcus_3	0.53	0.55	0.48
Prevotella_7	0.52	0.54	0.55
Collinsella	0.51	0.55	0.53
Ruminiclostridium_6	0.48	0.51	0.41
Intestinimonas	0.48	0.44	0.48
Odoribacter	0.47	0.46	0.47
Mitsuokella	0.47	0.65	0.64
Coprococcus_2	0.46	0.47	0.41
Lachnospiraceae_UCG-010	0.45	0.40	0.46
Lachnospiraceae_ND3007_group	0.42	0.39	0.41
Fusicatenibacter	0.42	0.46	0.41
Prevotellaceae_NK3B31_group	0.40	0.37	0.38
Oribacterium	0.39	0.33	0.37
Lachnospiraceae_UCG-004	0.37	0.37	0.39
Erysipelotrichaceae_UCG-003	0.35	0.37	0.32
Clostridium_sensu_stricto_1	0.33	0.35	0.25
Bilophila	0.31	0.32	0.29
Flavonifractor	0.31	0.33	0.38
Escherichia/Shigella	0.31	0.32	0.33
Senegalimassilia	0.31	0.23	0.26
Barnesiella	0.30	0.33	0.34
Ruminococcaceae_UCG-009	0.30	0.25	0.32

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

Allisonella	0.29	0.28	0.31
Negativibacillus	0.29	0.26	0.30
Anaerostipes	0.27	0.26	0.29
Romboutsia	0.26	0.27	0.21
Parasutterella	0.26	0.31	0.30
Coprococcus_1	0.25	0.24	0.26
Lactobacillus	0.25	0.25	0.30
Solobacterium	0.25	0.22	0.24
Butyrivibrio	0.24	0.19	0.20
Lachnospiraceae_UCG-001	0.24	0.21	0.23
Family_XIII_UCG-001	0.23	0.23	0.22
Candidatus_Soleaferrea	0.22	0.19	0.25
Howardella	0.22	0.21	0.20
Slackia	0.21	0.23	0.24
UBA1819	0.21	0.25	0.26
Methanobrevibacter	0.20	0.19	0.19
Ruminococcaceae_UCG-004	0.19	0.24	0.21
Veillonella	0.19	0.28	0.21
GCA-900066575	0.19	0.19	0.20
Caproiciproducens	0.19	0.16	0.19
Olsenella	0.18	0.17	0.18
Erysipelatoclostridium	0.18	0.23	0.23
Catenisphaera	0.17	0.16	0.16
Coprobacter	0.16	0.14	0.17
Defluviitaleaceae_UCG-011	0.16	0.16	0.17
Marvinbryantia	0.16	0.14	0.13
Enterorhabdus	0.15	0.12	0.15
GCA-900066225	0.15	0.13	0.18
CAG-56	0.15	0.12	0.12
Lachnospiraceae_FCS020_group	0.15	0.13	0.15
Oscillospira	0.15	0.13	0.15
Akkermansia	0.15	0.14	0.12
Pygmaiobacter	0.14	0.12	0.18
Peptococcus	0.14	0.14	0.10
Anaerovibrio	0.14	0.15	0.17
DTU089	0.14	0.13	0.13
Klebsiella	0.14	0.21	0.08

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

Holdemania	0.13	0.17	0.17
Libanicoccus	0.13	0.13	0.10
Haemophilus	0.13	0.14	0.12
Fusobacterium	0.12	0.11	0.10
Lachnospiraceae_NK3A20_group	0.12	0.09	0.11
Erysipelotrichaceae_UCG-004	0.11	0.10	0.10
Oxalobacter	0.10	0.08	0.11
Erysipelotrichaceae_UCG-006	0.09	0.07	0.08
Actinomyces	0.09	0.11	0.12
Turicibacter	0.09	0.11	0.10
Intestinibacter	0.09	0.07	0.08
Anaerotruncus	0.08	0.08	0.10
Fournierella	0.08	0.07	0.10
Gemella	0.08	0.07	0.07
Faecalitalea	0.07	0.08	0.10
Granulicatella	0.07	0.09	0.08
FD2005	0.07	0.06	0.06
Lachnospiraceae_UCG-008	0.07	0.08	0.06
Victivallis	0.07	0.06	0.06
Catabacter	0.07	0.05	0.07
Prevotellaceae_UCG-003	0.07	0.06	0.08
Asteroleplasma	0.06	0.06	0.04
Megamonas	0.06	0.13	0.07
Enterobacter	0.06	0.06	0.02
Tyzzerella_3	0.06	0.06	0.07
Coriobacteriaceae_UCG-003	0.05	0.05	0.03
Mailhella	0.05	0.02	0.05
Porphyromonas	0.05	0.04	0.04
Prevotella	0.05	0.06	0.09
Anaerofilum	0.05	0.03	0.04
Campylobacter	0.05	0.06	0.08
Eisenbergiella	0.04	0.05	0.06
Citrobacter	0.04	0.01	0.03
Merdibacter	0.04	0.05	0.07
Prevotellaceae_UCG-004	0.04	0.04	0.05
Atopobium	0.04	0.04	0.03
Elusimicrobium	0.04	0.05	0.06

Biblioteca
UNIVERSIDAD Miguel Hernández

Tyzzerella_4	0.04	0.04	0.03
Adlercreutzia	0.04	0.04	0.02
Lactococcus	0.04	0.04	0.02
Sellimonas	0.04	0.07	0.09
Brachyspira	0.04	0.05	0.04
Anaeroplasma	0.03	0.03	0.03
Angelakisella	0.03	0.02	0.02
Hydrogenoanaerobacterium	0.03	0.03	0.03
Ruminiclostridium_1	0.03	0.03	0.02
Shuttleworthia	0.03	0.03	0.04
Z20	0.03	0.02	0.02
Anaerosporobacter	0.03	0.03	0.02
CAG-873	0.03	0.02	0.01
Cloacibacillus	0.03	0.02	0.02
Ruminiclostridium	0.03	0.02	0.03
Arcanobacterium	0.03	0.02	0.01
Helicobacter	0.03	0.03	0.03
Lachnospiraceae_UCG-003	0.03	0.03	0.02
Ruminococcaceae_UCG-007	0.03	0.03	0.03
Tyzzerella	0.03	0.09	0.08
CAG-352	0.03	0.04	0.04
DNF00809	0.03	0.03	0.04
Gordonibacter	0.03	0.05	0.06
Raoultella	0.03	0.01	0.01
Eubacterium	0.03	0.04	0.04
Phocea	0.03	0.02	0.02
Prevotella_6	0.03	0.02	0.01
Terrisporobacter	0.03	0.01	0.01
Peptoniphilus	0.03	0.02	0.02
Coprobacillus	0.02	0.03	0.02
Curvibacter	0.02	0.03	0.02
Eggerthella	0.02	0.06	0.06
Ezakiella	0.02	0.04	0.03
Hafnia-Obesumbacterium	0.02	0.01	0.01
Parvimonas	0.02	0.04	0.03
Prevotellaceae_UCG-001	0.02	0.03	0.04
Sneathia	0.02	0.04	0.02
Weissella	0.02	0.02	0.01

Biblioteca
UNIVERSIDAD Miguel Hernández

Anaerofustis	0.02	0.01	0.01
Hungatella	0.02	0.02	0.04
Peptostreptococcus	0.02	0.01	0.00
Acetanaerobacterium	0.02	0.03	0.03
Rikenella	0.02	0.01	0.02
Ruminococcaceae_UCG-011	0.02	0.02	0.04
Treponema_2	0.02	0.01	0.03
Anaerococcus	0.02	0.02	0.01
Cerasicoccus	0.02	0.01	0.00
Dehalobacterium	0.02	0.01	0.02
Dielma	0.02	0.02	0.03
dgA-11_gut_group	0.02	0.03	0.03
Christensenella	0.02	0.03	0.02
Lachnospiraceae_UCG-002	0.02	0.01	0.01
Pseudoflavonifractor	0.02	0.02	0.04
Sanguibacteroides	0.02	0.01	0.01
Enterococcus	0.01	0.01	0.02
Leuconostoc	0.01	0.01	0.02
Mogibacterium	0.01	0.01	0.01
Papillibacter	0.01	0.01	0.03
Pyramidobacter	0.01	0.01	0.01
UC5-1-2E3	0.01	0.01	0.03
Synergistes	0.01	0.02	0.01
Rothia	0.01	0.02	0.02
Succinatimonas	0.01	0.01	0.02
Faecalicoccus	0.01	0.03	0.02
Lachnospiraceae_NC2004_group	0.01	0.01	0.01
Lactonifactor	0.01	0.01	0.01
Ruminococcaceae_UCG-008	0.01	0.03	0.02
Caldicoprobacter	0.01	0.00	0.01
Gardnerella	0.01	0.01	0.01
Pseudomonas	0.01	0.01	0.01
Fastidiosipila	0.01	0.00	0.01
Finegoldia	0.01	0.01	0.01
GCA-900066755	0.01	0.01	0.01
Raoultibacter	0.01	0.01	0.01
Actinobacillus	0.00	0.00	0.00
Cellulosilyticum	0.00	0.00	0.00

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

Comamonas	0.00	0.00	0.00
Enorma	0.00	0.02	0.01
Epulopiscium	0.00	0.01	0.00
Lachnospiraceae_NK4B4_group	0.00	0.00	0.00
Succiniclasticum	0.00	0.00	0.01
Abiotrophia	0.00	0.01	0.00
Anaerobiospirillum	0.00	0.00	0.00
Atlantibacter	0.00	0.00	0.00
Candidatus_Methanogranum	0.00	0.00	0.00
Caulobacter	0.00	0.00	0.00
CHKCI002	0.00	0.02	0.02
Facklamia	0.00	0.00	0.00
Hespellia	0.00	0.00	0.00
Lelliottia	0.00	0.00	0.01
Paeniclostridium	0.00	0.01	0.00
Pelospora	0.00	0.00	0.01
Providencia	0.00	0.00	0.00
Ruminococcaceae_V9D2013_group	0.00	0.00	0.00
S5-A14a	0.00	0.01	0.00
Sporobacter	0.00	0.00	0.00
Staphylococcus	0.00	0.00	0.00
Acinetobacter	0.00	0.00	0.01
Aerococcus	0.00	0.00	0.00
Aggregatibacter	0.00	0.01	0.00
Alloscardovia	0.00	0.00	0.00
Anaeroglobus	0.00	0.00	0.00
Anthococcus	0.00	0.00	0.00
Candidatus_Saccharimonas	0.00	0.00	0.00
Carnobacterium	0.00	0.00	0.00
Catonella	0.00	0.00	0.00
Clostridium_sensu_stricto_3	0.00	0.00	0.00
Denitrobacterium	0.00	0.00	0.00
Herbinix	0.00	0.00	0.00
Lachnospiraceae_UCG-006	0.00	0.00	0.00
Lawsonella	0.00	0.00	0.00
Macrococcus	0.00	0.00	0.00

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

Mangrovibacterium	0.00	0.00	0.00
Methanosphaera	0.00	0.00	0.00
Moryella	0.00	0.00	0.00
Myroides	0.00	0.00	0.00
Prevotellaceae_YAB2003_group	0.00	0.00	0.00
Proteus	0.00	0.00	0.01
Pseudocitrobacter	0.00	0.00	0.00
Scardovia	0.00	0.00	0.01
Sphingobium	0.00	0.00	0.00
Sporacetigenium	0.00	0.00	0.00
Syntrophomonas	0.00	0.00	0.00
Trichococcus	0.00	0.00	0.00
Varibaculum	0.00	0.00	0.00
28-abr	0.00	0.01	0.00
Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium	0.00	0.00	0.00
Anaerovorax	0.00	0.00	0.00
ATCC-39006	0.00	0.00	0.00
Bacillus	0.00	0.00	0.00
Basfia	0.00	0.00	0.00
Breznakia	0.00	0.00	0.00
Chryseobacterium	0.00	0.00	0.00
Clostridioides	0.00	0.00	0.00
Clostridium_sensu_stricto_4	0.00	0.00	0.00
Cricetibacter	0.00	0.00	0.00
Cryptobacterium	0.00	0.00	0.00
Cuneatibacter	0.00	0.00	0.00
Desulfitibacter	0.00	0.00	0.00
Dysgonomonas	0.00	0.00	0.00
Eggerthia	0.00	0.00	0.00
Enhydrobacter	0.00	0.00	0.00
Fructobacillus	0.00	0.00	0.00
Harryflintia	0.00	0.00	0.00
hoa5-07d05_gut_group	0.00	0.00	0.00
Isobaculum	0.00	0.00	0.00
Johnsonella	0.00	0.00	0.00
Kocuria	0.00	0.00	0.00

Biblioteca
UNIVERSIDAD Miguel Hernández

Lachnospiraceae_AC2044_group	0.00	0.00	0.00
Lautropia	0.00	0.00	0.00
Methanomassiliicoccus	0.00	0.00	0.00
Morganella	0.00	0.00	0.00
Murdochiella	0.00	0.00	0.00
Mycoplasma	0.00	0.00	0.00
Negativicoccus	0.00	0.00	0.00
Neisseria	0.00	0.00	0.00
Novosphingobium	0.00	0.00	0.00
Pantoea	0.00	0.00	0.00
Paraclostridium	0.00	0.00	0.00
Paracoccus	0.00	0.00	0.00
Pediococcus	0.00	0.00	0.00
Phoenicibacter	0.00	0.00	0.00
Planomicrobium	0.00	0.00	0.00
Propionibacterium	0.00	0.00	0.00
Pseudochrobactrum	0.00	0.00	0.00
Pseudoscardovia	0.00	0.00	0.00
Psychrobacter	0.00	0.00	0.00
Rahnella	0.00	0.00	0.00
Sarcina	0.00	0.00	0.00
Selenomonas_3	0.00	0.00	0.00
Ureaplasma	0.00	0.00	0.00
W5053	0.00	0.00	0.00

Sample 1, baseline sample; Sample 2, 48-week sample; Sample 3, 96-week simple

(b)

Genus	Sample 1, %	Sample 2, %	Sample 3, %
Prevotella_9	10.27	10.25	9.41
Bacteroides	5.96	6.84	6.38
Faecalibacterium	3.75	4.21	3.63
Prevotella_2	2.65	2.00	2.51
Parabacteroides	2.45	2.26	2.09
Christensenellaceae_R-7_group	2.05	1.67	2.04
Ruminococcaceae_UCG-002	2.05	2.16	2.32
Alistipes	1.82	1.99	1.85
Ruminococcaceae_UCG-014	1.68	1.42	1.78
Lachnospiraceae_NK4A136_group	1.64	1.46	1.42
Blautia	1.51	1.69	1.64

Biblioteca
UNIVERSIDAD Miguel Hernández

Subdoligranulum	1.48	1.43	1.22
Ruminococcaceae_UCG-005	1.45	1.31	1.47
Streptococcus	1.42	1.32	1.37
Lachnoclostridium	1.39	1.45	1.57
Lachnospira	1.39	1.39	1.26
Alloprevotella	1.28	1.16	1.36
Roseburia	1.24	1.20	1.17
Agathobacter	1.17	1.22	1.11
Ruminococcus_1	1.11	0.95	0.85
Sutterella	1.08	0.85	0.87
Bifidobacterium	1.07	1.37	1.01
Ruminococcaceae_UCG-010	1.07	1.01	1.08
Dorea	1.06	1.18	0.91
Ruminococcaceae_NK4A214_group	0.89	0.95	1.00
Dialister	0.89	0.93	0.82
Holdemanella	0.85	1.05	1.06
Rikenellaceae_RC9_gut_group	0.85	0.60	0.94
Phascolarctobacterium	0.82	0.82	0.96
Ruminiclostridium_9	0.78	0.72	0.79
Ruminiclostridium_5	0.77	0.77	0.88
Family_XIII_AD3011_group	0.74	0.73	0.85
Megasphaera	0.74	0.79	0.71
Ruminococcaceae_UCG-003	0.66	0.51	0.57
Oscillibacter	0.64	0.65	0.71
Paraprevotella	0.62	0.94	0.72
Butyricimonas	0.62	0.52	0.57
Prevotella_7	0.61	0.63	0.68
Ruminococcus_2	0.60	0.64	0.53
Catenibacterium	0.59	0.70	0.71
Acidaminococcus	0.59	0.73	0.56
Desulfovibrio	0.56	0.50	0.58
Succinivibrio	0.56	0.75	0.58
Butyricicoccus	0.55	0.63	0.57
Ruminococcaceae_UCG-013	0.53	0.54	0.62
Coprococcus_3	0.52	0.54	0.45
Lachnospiraceae_UCG-010	0.51	0.36	0.41

Biblioteca

Intestinimonas	0.51	0.44	0.46
Ruminiclostridium_6	0.49	0.48	0.44
Collinsella	0.47	0.57	0.52
Coprococcus_2	0.46	0.64	0.41
Mitsuokella	0.46	0.58	0.74
Odoribacter	0.45	0.47	0.49
Lachnospiraceae_ND3007_group	0.44	0.40	0.42
Erysipelotrichaceae_UCG-003	0.42	0.37	0.30
Prevotellaceae_NK3B31_group	0.41	0.25	0.37
Fusicatenibacter	0.41	0.47	0.39
Lachnospiraceae_UCG-004	0.40	0.30	0.35
Oribacterium	0.40	0.30	0.40
Lactobacillus	0.35	0.28	0.27
Lachnospiraceae_UCG-001	0.32	0.19	0.23
Clostridium_sensu_stricto_1	0.31	0.24	0.25
Senegalimassilia	0.31	0.23	0.26
Bilophila	0.31	0.38	0.30
Ruminococcaceae_UCG-009	0.30	0.26	0.34
Flavonifractor	0.29	0.39	0.39
Negativibacillus	0.29	0.26	0.31
Romboutsia	0.26	0.23	0.20
Veillonella	0.25	0.46	0.23
Barnesiella	0.24	0.41	0.35
Family_XIII_UCG-001	0.24	0.21	0.23
Allisonella	0.24	0.31	0.30
Coprococcus_1	0.24	0.26	0.23
Escherichia/Shigella	0.24	0.32	0.37
Solobacterium	0.23	0.21	0.23
Candidatus_Soleaferrea	0.22	0.14	0.24
Slackia	0.22	0.21	0.20
Anaerostipes	0.21	0.25	0.23
Parasutterella	0.21	0.40	0.32
UBA1819	0.21	0.26	0.27
Howardella	0.20	0.21	0.20
Butyrivibrio	0.20	0.16	0.22
Caproiciproducens	0.19	0.17	0.15

Methanobrevibacter	0.19	0.21	0.19
Ruminococcaceae_UCG-004	0.19	0.27	0.23
GCA-900066575	0.19	0.17	0.22
Klebsiella	0.18	0.23	0.12
Coprobacter	0.18	0.12	0.14
Fusobacterium	0.17	0.09	0.10
GCA-900066225	0.17	0.17	0.17
Catenisphaera	0.16	0.19	0.24
Olsenella	0.16	0.17	0.17
Oscillospira	0.16	0.11	0.15
Defluviitaleaceae_UCG-011	0.16	0.15	0.18
DTU089	0.16	0.12	0.11
Haemophilus	0.16	0.13	0.09
Peptococcus	0.16	0.14	0.11
CAG-56	0.16	0.13	0.13
Akkermansia	0.15	0.09	0.08
Anaerovibrio	0.15	0.15	0.18
Lachnospiraceae_FCS020_group	0.15	0.13	0.15
Enterorhabdus	0.14	0.12	0.17
Erysipelatoclostridium	0.13	0.26	0.25
Holdemania	0.13	0.21	0.14
Libanicoccus	0.13	0.13	0.14
Marvinbryantia	0.12	0.09	0.12
Pygmaiobacter	0.12	0.13	0.17
Erysipelotrichaceae_UCG-004	0.12	0.11	0.13
Lachnospiraceae_NK3A20_group	0.11	0.13	0.13
Oxalobacter	0.10	0.05	0.12
Porphyromonas	0.09	0.04	0.04
Turicibacter	0.09	0.11	0.10
Actinomyces	0.08	0.13	0.11
Lachnospiraceae_UCG-008	0.08	0.11	0.07
Erysipelotrichaceae_UCG-006	0.08	0.08	0.09
Enterobacter	0.07	0.02	0.02
Intestinibacter	0.07	0.07	0.09
Prevotellaceae_UCG-003	0.07	0.04	0.08
Campylobacter	0.07	0.07	0.11
FD2005	0.07	0.09	0.09

Biblioteca Universitat Rovira i Virgili Tarragona

Gemella	0.07	0.07	0.08
Anaerotruncus	0.06	0.05	0.09
Asteroleplasma	0.06	0.07	0.04
Tyzzerella_4	0.06	0.05	0.07
Anaerofilum	0.06	0.03	0.06
Fournierella	0.06	0.05	0.11
Granulicatella	0.06	0.09	0.07
Mailhella	0.06	0.01	0.04
Prevotella	0.06	0.07	0.08
Victivallis	0.06	0.05	0.09
Catabacter	0.05	0.03	0.08
Coriobacteriaceae_UCG-003	0.05	0.05	0.04
Citrobacter	0.05	0.01	0.02
Eisenbergiella	0.05	0.04	0.07
Faecalitalea	0.05	0.06	0.08
Tyzzerella_3	0.05	0.08	0.03
Atopobium	0.04	0.05	0.06
Merdibacter	0.04	0.05	0.07
Ruminiclostridium_1	0.04	0.01	0.01
Z20	0.04	0.00	0.03
Brachyspira	0.04	0.03	0.06
Coprobacillus	0.04	0.07	0.02
Elusimicrobium	0.04	0.03	0.08
Hungatella	0.04	0.03	0.03
Ruminiclostridium	0.04	0.01	0.04
Ruminococcaceae_UCG-007	0.04	0.03	0.02
Sellimonas	0.04	0.10	0.11
Treponema_2	0.04	0.01	0.01
Gordonibacter	0.04	0.06	0.04
Hafnia-Obesumbacterium	0.04	0.03	0.01
Hydrogenoanaerobacterium	0.04	0.01	0.03
Lactococcus	0.04	0.03	0.02
Megamonas	0.04	0.07	0.06
Parvimonas	0.04	0.07	0.04
Peptoniphilus	0.04	0.01	0.02
Phocea	0.04	0.02	0.03
Prevotellaceae_UCG-004	0.04	0.05	0.06

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

Shuttleworthia	0.04	0.02	0.04
Adlercreutzia	0.03	0.04	0.02
Anaerococcus	0.03	0.01	0.01
Anaerosporobacter	0.03	0.03	0.02
Eggerthella	0.03	0.08	0.07
Angelakisella	0.03	0.02	0.02
Arcanobacterium	0.03	0.03	0.01
Dehalobacterium	0.03	0.01	0.02
DNF00809	0.03	0.03	0.05
Peptostreptococcus	0.03	0.02	0.00
Terrisporobacter	0.03	0.03	0.02
Weissella	0.03	0.03	0.01
Anaeroplasma	0.02	0.01	0.02
Curvibacter	0.02	0.03	0.01
Dielma	0.02	0.01	0.04
Ezakiella	0.02	0.05	0.03
Leuconostoc	0.02	0.01	0.02
Raoultella	0.02	0.01	0.01
Ruminococcaceae_UCG-008	0.02	0.02	0.03
Sneathia	0.02	0.08	0.04
Tyzzerella	0.02	0.09	0.09
Anaerofustis	0.02	0.01	0.01
CAG-352	0.02	0.01	0.04
Cerasicoccus	0.02	0.00	0.00
Eubacterium	0.02	0.04	0.04
Lactonifactor	0.02	0.01	0.02
Papillibacter	0.02	0.01	0.02
Prevotella_6	0.02	0.03	0.01
Acetanaerobacterium	0.01	0.02	0.03
Caldicoprobacter	0.01	0.01	0.01
Christensenella	0.01	0.02	0.02
Gardnerella	0.01	0.03	0.01
GCA-900066755	0.01	0.01	0.01
Helicobacter	0.01	0.01	0.02
Lachnospiraceae_UCG-003	0.01	0.00	0.04
Pseudoflavonifractor	0.01	0.01	0.04

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

Rothia	0.01	0.03	0.03
Ruminococcaceae_UCG-011	0.01	0.01	0.03
Synergistes	0.01	0.00	0.01
UC5-1-2E3	0.01	0.00	0.05
CAG-873	0.01	0.01	0.02
Cloacibacillus	0.01	0.01	0.02
dgA-11_gut_group	0.01	0.00	0.03
Enorma	0.01	0.01	0.01
Enterococcus	0.01	0.03	0.03
Faecalicoccus	0.01	0.03	0.02
Fastidiosipila	0.01	0.01	0.01
Lachnospiraceae_NC2004_group	0.01	0.00	0.01
Lachnospiraceae_UCG-002	0.01	0.01	0.02
Providencia	0.01	0.00	0.00
Pyramidobacter	0.01	0.01	0.02
S5-A14a	0.01	0.01	0.00
Sanguibacteroides	0.01	0.01	0.00
Sporobacter	0.01	0.00	0.00
Succinatimonas	0.01	0.01	0.02
Succiniclasticum	0.01	0.00	0.02
Acinetobacter	0.00	0.00	0.02
Actinobacillus	0.00	0.00	0.01
Alloscardovia	0.00	0.00	0.00
Anaeroglobus	0.00	0.01	0.00
Candidatus_Saccharimonas	0.00	0.00	0.00
Carnobacterium	0.00	0.00	0.00
Catonella	0.00	0.01	0.00
Caulobacter	0.00	0.01	0.00
CHKCI002	0.00	0.01	0.01
Clostridium_sensu_stricto_3	0.00	0.00	0.00
Comamonas	0.00	0.00	0.01
Denitrobacterium	0.00	0.00	0.00
Epulopiscium	0.00	0.01	0.00
Finegoldia	0.00	0.02	0.02
Herbinix	0.00	0.00	0.00
Hespellia	0.00	0.00	0.00
Lachnospiraceae_NK4B4_group	0.00	0.00	0.00
Lachnospiraceae_UCG-006	0.00	0.00	0.01
Lelliottia	0.00	0.00	0.01

Biblioteca UNIVERSITAS Miguel Hernández

Mangrovibacterium	0.00	0.00	0.00
Mogibacterium	0.00	0.01	0.01
Paeniclostridium	0.00	0.00	0.00
Prevotellaceae_UCG-001	0.00	0.01	0.02
Pseudomonas	0.00	0.01	0.02
Raoultibacter	0.00	0.01	0.02
Rikenella	0.00	0.00	0.01
Ruminococcaceae_V9D2013_group	0.00	0.00	0.01
Scardovia	0.00	0.01	0.01
Sphingobium	0.00	0.00	0.00
Staphylococcus	0.00	0.00	0.00
Trichococcus	0.00	0.00	0.01
Varibaculum	0.00	0.00	0.00
28-abr	0.00	0.01	0.00
Abiotrophia	0.00	0.01	0.00
Aerococcus	0.00	0.01	0.01
Aggregatibacter	0.00	0.02	0.00
Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium	0.00	0.01	0.00
Anaerobiospirillum	0.00	0.01	0.00
Anaerovorax	0.00	0.01	0.01
Anthococcus	0.00	0.00	0.00
ATCC-39006	0.00	0.00	0.00
Atlantibacter	0.00	0.01	0.00
Bacillus	0.00	0.00	0.00
Basfia	0.00	0.00	0.00
Breznakia	0.00	0.00	0.00
Candidatus_Methanogranum	0.00	0.01	0.01
Cellulosilyticum	0.00	0.00	0.01
Chryseobacterium	0.00	0.00	0.00
Clostridioides	0.00	0.00	0.01
Clostridium_sensu_stricto_4	0.00	0.00	0.00
Cricetibacter	0.00	0.00	0.01
Cryptobacterium	0.00	0.00	0.00
Cuneatibacter	0.00	0.00	0.01
Desulfitibacter	0.00	0.00	0.00

Biblioteca UNIVERSITAS Miguel Hernández

Dysgonomonas	0.00	0.01	0.00
Eggerthia	0.00	0.00	0.01
Enhydrobacter	0.00	0.00	0.00
Facklamia	0.00	0.00	0.00
Fructobacillus	0.00	0.00	0.00
Harryflintia	0.00	0.01	0.00
hoa5-07d05_gut_group	0.00	0.00	0.00
Isobaculum	0.00	0.00	0.00
Johnsonella	0.00	0.00	0.00
Kocuria	0.00	0.00	0.01
Lachnospiraceae_AC2044_group	0.00	0.00	0.00
Lautropia	0.00	0.00	0.00
Lawsonella	0.00	0.00	0.00
Macrococcus	0.00	0.00	0.00
Methanomassiliicoccus	0.00	0.00	0.00
Methanosphaera	0.00	0.00	0.01
Morganella	0.00	0.00	0.00
Moryella	0.00	0.00	0.00
Murdochiella	0.00	0.00	0.00
Mycoplasma	0.00	0.01	0.01
Myroides	0.00	0.00	0.00
Negativicoccus	0.00	0.00	0.00
Neisseria	0.00	0.00	0.00
Novosphingobium	0.00	0.00	0.00
Pantoea	0.00	0.00	0.00
Paraclostridium	0.00	0.00	0.01
Paracoccus	0.00	0.00	0.00
Pediococcus	0.00	0.01	0.00
Pelospora	0.00	0.00	0.01
Phoenicibacter	0.00	0.00	0.01
Planomicrobium	0.00	0.00	0.00
Prevotellaceae_YAB2003_group	0.00	0.00	0.00
Propionibacterium	0.00	0.00	0.00
Proteus	0.00	0.00	0.01
Pseudochrobactrum	0.00	0.00	0.01
Pseudocitrobacter	0.00	0.00	0.00
Pseudoscardovia	0.00	0.00	0.00
Psychrobacter	0.00	0.00	0.01
Rahnella	0.00	0.01	0.00

Biblioteca

Sarcina	0.00	0.00	0.00
Selenomonas_3	0.00	0.01	0.00
Sporacetigenium	0.00	0.00	0.00
Syntrophomonas	0.00	0.00	0.00
Ureaplasma	0.00	0.00	0.00
W5053	0.00	0.01	0.00

Sample 1, baseline sample; Sample 2, 48-week sample; Sample 3, 96-week sample

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

1 (c)
2

Genus	Sample 1, %	Sample 2, %	Sample 3, %
Prevotella_9	10.01	10.10	9.94
Bacteroides	5.99	6.44	6.53
Faecalibacterium	4.09	3.91	4.07
Parabacteroides	2.17	2.56	2.46
Ruminococcaceae_UCG-002	2.14	2.03	2.07
Prevotella_2	2.11	2.53	2.16
Christensenellaceae_R-7_group	1.98	1.86	1.84
Alistipes	1.81	1.77	1.84
Ruminococcaceae_UCG-014	1.75	1.74	1.56
Blautia	1.67	1.70	1.65
Lachnospiraceae_NK4A136_group	1.56	1.43	1.43
Lachnospira	1.41	1.37	1.38
Lachnoclostridium	1.38	1.56	1.49
Subdoligranulum	1.37	1.41	1.40
Roseburia	1.35	1.25	1.18
Ruminococcaceae_UCG-005	1.30	1.20	1.22
Phascolarctobacterium	1.29	1.19	1.12
Streptococcus	1.20	1.29	1.40
Agathobacter	1.18	1.25	1.26
Ruminococcaceae_UCG-010	1.14	0.99	1.01
Alloprevotella	1.08	1.17	1.21
Dorea	1.06	1.15	1.14
Holdemanella	1.06	0.93	0.86
Bifidobacterium	1.00	1.12	1.11
Ruminococcus_1	0.97	0.95	0.90
Sutterella	0.97	0.96	0.89
Ruminococcaceae_NK4A214_group	0.94	0.87	0.88
Rikenellaceae_RC9_gut_group	0.82	0.63	0.67
Ruminiclostridium_9	0.75	0.71	0.77
Family_XIII_AD3011_group	0.74	0.68	0.68
Megasphaera	0.73	0.72	0.76
Paraprevotella	0.73	0.65	0.74

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

Dialister	0.73	0.78	0.89
Ruminiclostridium_5	0.73	0.77	0.89
Succinivibrio	0.71	0.56	0.47
Catenibacterium	0.68	0.81	0.77
Ruminococcus_2	0.66	0.57	0.54
Desulfovibrio	0.66	0.55	0.63
Oscillibacter	0.64	0.63	0.72
Acidaminococcus	0.62	0.57	0.55
Butyricimonas	0.60	0.54	0.71
Butyricicoccus	0.58	0.70	0.65
Ruminococcaceae_UCG-013	0.56	0.56	0.61
Ruminococcaceae_UCG-003	0.55	0.55	0.51
Coprococcus_3	0.54	0.55	0.49
Collinsella	0.53	0.55	0.54
Odoribacter	0.49	0.46	0.46
Mitsuokella	0.48	0.68	0.58
Ruminiclostridium_6	0.48	0.52	0.40
Intestinimonas	0.47	0.45	0.49
Coprococcus_2	0.46	0.40	0.41
Prevotella_7	0.46	0.50	0.48
Fusicatenibacter	0.42	0.46	0.42
Lachnospiraceae_ND3007_group	0.41	0.38	0.40
Lachnospiraceae_UCG-010	0.41	0.42	0.48
Prevotellaceae_NK3B31_group	0.39	0.42	0.39
Oribacterium	0.39	0.34	0.36
Escherichia/Shigella	0.35	0.32	0.30
Lachnospiraceae_UCG-004	0.35	0.40	0.41
Clostridium_sensu_stricto_1	0.34	0.39	0.25
Barnesiella	0.34	0.30	0.33
Flavonifractor	0.32	0.31	0.37
Allisonella	0.32	0.27	0.31
Bilophila	0.32	0.29	0.28
Anaerostipes	0.31	0.26	0.33
Erysipelotrichaceae_UCG-003	0.31	0.37	0.33
Senegalimassilia	0.30	0.24	0.26

Biblioteca

Ruminococcaceae_UCG-009	0.30	0.25	0.31
Negativibacillus	0.29	0.26	0.29
Parasutterella	0.28	0.27	0.29
Butyrivibrio	0.27	0.20	0.20
Coprococcus_1	0.26	0.24	0.27
Romboutsia	0.26	0.29	0.22
Solobacterium	0.26	0.23	0.25
Howardella	0.22	0.20	0.19
Family_XIII_UCG-001	0.22	0.24	0.22
Candidatus_Soleaferrea	0.22	0.21	0.25
UBA1819	0.22	0.25	0.26
Methanobrevibacter	0.21	0.17	0.19
Slackia	0.21	0.24	0.26
Erysipelatoclostridium	0.20	0.22	0.22
Lachnospiraceae_UCG-001	0.20	0.21	0.23
Lactobacillus	0.20	0.23	0.31
Olsenella	0.19	0.16	0.19
GCA-900066575	0.19	0.20	0.19
Ruminococcaceae_UCG-004	0.19	0.23	0.20
Caproiciproducens	0.18	0.16	0.21
Marvinbryantia	0.18	0.16	0.13
Catenisphaera	0.17	0.14	0.11
Defluviitaleaceae_UCG-011	0.17	0.17	0.16
Enterorhabdus	0.16	0.12	0.14
Coprobacter	0.16	0.14	0.19
Pygmaiobacter	0.16	0.12	0.18
Veillonella	0.16	0.21	0.20
Lachnospiraceae_FCS020_group	0.15	0.13	0.15
CAG-56	0.15	0.12	0.12
Akkermansia	0.15	0.16	0.14
GCA-900066225	0.15	0.12	0.18
Oscillospira	0.14	0.14	0.15
Holdemania	0.14	0.16	0.18
Libanicoccus	0.14	0.12	0.07
Anaerovibrio	0.13	0.15	0.17
Peptococcus	0.13	0.14	0.10

Biblioteca UNIVERSITAS Miguel Hernández

DTU089	0.13	0.13	0.14
Lachnospiraceae_NK3A20_group	0.12	0.08	0.10
Haemophilus	0.12	0.14	0.14
Klebsiella	0.11	0.20	0.06
Erysipelotrichaceae_UCG-004	0.11	0.10	0.09
Erysipelotrichaceae_UCG-006	0.10	0.06	0.08
Intestinibacter	0.10	0.07	0.07
Oxalobacter	0.10	0.09	0.11
Actinomyces	0.09	0.11	0.12
Turicibacter	0.09	0.11	0.10
Anaerotruncus	0.09	0.09	0.10
Fusobacterium	0.09	0.11	0.11
Faecalitalea	0.09	0.09	0.11
Fournierella	0.09	0.08	0.09
Gemella	0.08	0.07	0.07
Granulicatella	0.08	0.08	0.09
Catabacter	0.08	0.06	0.07
Victivallis	0.08	0.06	0.05
FD2005	0.07	0.05	0.05
Megamonas	0.07	0.15	0.08
Asteroleplasma	0.07	0.05	0.04
Lachnospiraceae_UCG-008	0.07	0.06	0.06
Prevotellaceae_UCG-003	0.06	0.06	0.08
Tyzzerella_3	0.06	0.05	0.10
Coriobacteriaceae_UCG-003	0.05	0.05	0.03
Mailhella	0.05	0.02	0.05
Enterobacter	0.05	0.08	0.02
Prevotella	0.05	0.06	0.10
CAG-873	0.05	0.03	0.01
Cloacibacillus	0.05	0.03	0.01
Eisenbergiella	0.04	0.05	0.06
Merdibacter	0.04	0.05	0.08
Prevotellaceae_UCG-004	0.04	0.04	0.04
Adlercreutzia	0.04	0.03	0.03
Anaerofilum	0.04	0.03	0.03
Anaeroplasma	0.04	0.04	0.03

Citrobacter	0.04	0.02	0.04
Helicobacter	0.04	0.03	0.03
Lachnospiraceae_UCG-003	0.04	0.04	0.01
Angelakisella	0.04	0.02	0.02
Elusimicrobium	0.04	0.07	0.05
Lactococcus	0.04	0.04	0.03
Atopobium	0.04	0.04	0.02
CAG-352	0.04	0.06	0.05
Campylobacter	0.04	0.05	0.07
Prevotellaceae_UCG-001	0.04	0.04	0.04
Sellimonas	0.04	0.05	0.08
Tyzzerella	0.04	0.08	0.08
Anaerosporobacter	0.03	0.02	0.02
Arcanobacterium	0.03	0.01	0.00
Brachyspira	0.03	0.05	0.02
Eubacterium	0.03	0.04	0.04
Hydrogenoanaerobacterium	0.03	0.04	0.03
Porphyromonas	0.03	0.04	0.03
Prevotella_6	0.03	0.02	0.02
Raoultella	0.03	0.01	0.01
Shuttleworthia	0.03	0.03	0.03
DNF00809	0.03	0.03	0.03
Rikenella	0.03	0.01	0.02
Ruminiclostridium	0.03	0.02	0.02
Ruminiclostridium_1	0.03	0.03	0.03
Terrisporobacter	0.03	0.00	0.01
Z20	0.03	0.02	0.02
Acetanaerobacterium	0.03	0.03	0.03
Anaerofustis	0.03	0.01	0.02
Curvibacter	0.03	0.02	0.03
Ezakiella	0.03	0.03	0.03
Gordonibacter	0.03	0.05	0.07
Ruminococcaceae_UCG-007	0.03	0.03	0.04
Ruminococcaceae_UCG-011	0.03	0.02	0.04
Sneathia	0.03	0.02	0.01
Tyzzerella_4	0.03	0.04	0.01
dgA-11_gut_group	0.02	0.04	0.03

Biblioteca UNIVERSITAS Miguel Hernández

Phocea	0.02	0.02	0.02
Weissella	0.02	0.01	0.01
Cerasicoccus	0.02	0.01	0.00
Eggerthella	0.02	0.05	0.05
Lachnospiraceae_UCG-002	0.02	0.01	0.01
Mogibacterium	0.02	0.01	0.01
Peptoniphilus	0.02	0.02	0.02
Peptostreptococcus	0.02	0.00	0.00
Sanguibacteroides	0.02	0.01	0.01
Christensenella	0.02	0.04	0.01
Dielma	0.02	0.03	0.03
Enterococcus	0.02	0.01	0.01
Hafnia-Obesumbacterium	0.02	0.00	0.01
Parvimonas	0.02	0.02	0.03
Pseudoflavonifractor	0.02	0.02	0.04
Pyramidobacter	0.02	0.01	0.01
Coprobacillus	0.02	0.02	0.03
Dehalobacterium	0.02	0.02	0.02
UC5-1-2E3	0.02	0.02	0.03
Anaerococcus	0.01	0.02	0.01
Hungatella	0.01	0.02	0.05
Papillibacter	0.01	0.01	0.03
Succinatimonas	0.01	0.01	0.02
Synergistes	0.01	0.03	0.01
Faecalicoccus	0.01	0.02	0.02
Lachnospiraceae_NC2004_group	0.01	0.01	0.01
Leuconostoc	0.01	0.01	0.01
Pseudomonas	0.01	0.01	0.00
Rothia	0.01	0.02	0.01
Treponema_2	0.01	0.01	0.04
Cellulosilyticum	0.01	0.00	0.00
Finegoldia	0.01	0.00	0.01
Raoultibacter	0.01	0.01	0.00
Abiotrophia	0.01	0.00	0.01
Actinobacillus	0.01	0.00	0.00
Anaerobiospirillum	0.01	0.00	0.00
Atlantibacter	0.01	0.00	0.00
Caldicoprobacter	0.01	0.00	0.01

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

Candidatus_Methanogranum	0.01	0.00	0.00
Comamonas	0.01	0.01	0.00
Epulopiscium	0.01	0.01	0.01
Facklamia	0.01	0.00	0.00
Fastidiosipila	0.01	0.00	0.00
Gardnerella	0.01	0.01	0.01
Lachnospiraceae_NK4B4_group	0.01	0.00	0.00
Lactonifactor	0.01	0.01	0.01
Pelospora	0.01	0.00	0.01
Aerococcus	0.00	0.00	0.00
Aggregatibacter	0.00	0.00	0.00
Anthococcus	0.00	0.00	0.00
Caulobacter	0.00	0.00	0.00
CHKCI002	0.00	0.03	0.02
Enorma	0.00	0.02	0.01
GCA-900066755	0.00	0.01	0.01
Hespellia	0.00	0.00	0.00
Lawsonella	0.00	0.00	0.00
Lelliottia	0.00	0.00	0.01
Macrococcus	0.00	0.00	0.00
Methanosphaera	0.00	0.00	0.00
Moryella	0.00	0.00	0.00
Myroides	0.00	0.00	0.00
Paeniclostridium	0.00	0.01	0.00
Prevotellaceae_YAB2003_group	0.00	0.00	0.00
Proteus	0.00	0.00	0.01
Pseudocitrobacter	0.00	0.00	0.00
Ruminococcaceae_UCG-008	0.00	0.03	0.02
Ruminococcaceae_V9D2013_group	0.00	0.00	0.00
Sporacetigenium	0.00	0.00	0.00
Staphylococcus	0.00	0.00	0.00
Succiniclasticum	0.00	0.01	0.00
Syntrophomonas	0.00	0.00	0.00
28-abr	0.00	0.02	0.00
Acinetobacter	0.00	0.00	0.00

Biblioteca UNIVERSITAS Miguel Hernández

Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium	0.00	0.00	0.00
Alloscardovia	0.00	0.00	0.00
Anaeroglobus	0.00	0.00	0.00
Anaerovorax	0.00	0.00	0.00
ATCC-39006	0.00	0.00	0.00
Bacillus	0.00	0.00	0.00
Basfia	0.00	0.00	0.00
Breznakia	0.00	0.00	0.00
Candidatus_Saccharimonas	0.00	0.00	0.00
Carnobacterium	0.00	0.01	0.00
Catonella	0.00	0.00	0.00
Chryseobacterium	0.00	0.00	0.00
Clostridioides	0.00	0.00	0.00
Clostridium_sensu_stricto_3	0.00	0.00	0.00
Clostridium_sensu_stricto_4	0.00	0.00	0.00
Cricetibacter	0.00	0.00	0.00
Cryptobacterium	0.00	0.00	0.00
Cuneatibacter	0.00	0.00	0.00
Denitrobacterium	0.00	0.01	0.00
Desulfitibacter	0.00	0.00	0.00
Dysgonomonas	0.00	0.00	0.00
Eggerthia	0.00	0.00	0.00
Enhydrobacter	0.00	0.00	0.00
Fructobacillus	0.00	0.00	0.00
Harryflintia	0.00	0.00	0.00
Herbinix	0.00	0.00	0.00
hoa5-07d05_gut_group	0.00	0.00	0.00
Isobaculum	0.00	0.00	0.00
Johnsonella	0.00	0.00	0.00
Kocuria	0.00	0.00	0.00
Lachnospiraceae_AC2044_group	0.00	0.00	0.00
Lachnospiraceae_UCG-006	0.00	0.00	0.00
Lautropia	0.00	0.00	0.00
Mangrovibacterium	0.00	0.00	0.00

Biblioteca UNIVERSITAS Miguel Hernández

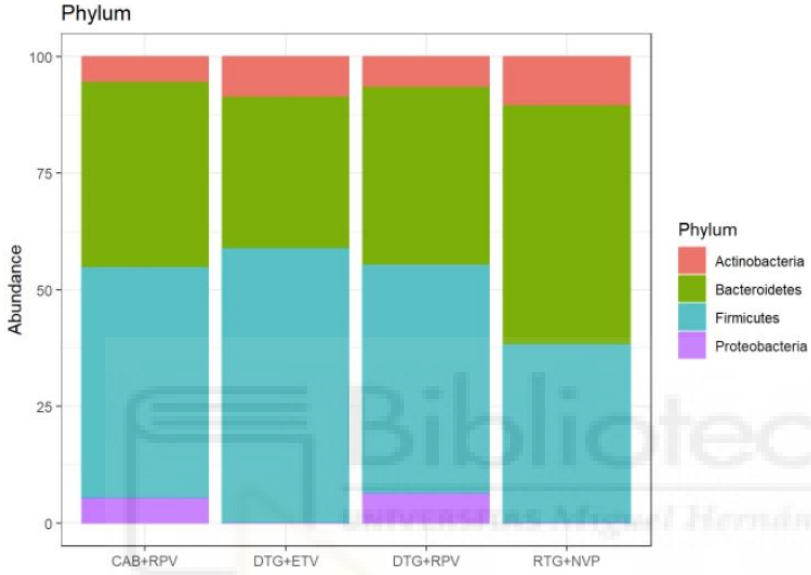
Methanomassiliicoccus	0.00	0.00	0.00
Morganella	0.00	0.00	0.00
Murdochiella	0.00	0.00	0.00
Mycoplasma	0.00	0.00	0.00
Negativicoccus	0.00	0.00	0.00
Neisseria	0.00	0.01	0.01
Novosphingobium	0.00	0.00	0.00
Pantoea	0.00	0.00	0.00
Paraclostridium	0.00	0.00	0.00
Paracoccus	0.00	0.00	0.00
Pediococcus	0.00	0.00	0.00
Phoenicibacter	0.00	0.00	0.00
Planomicrobium	0.00	0.00	0.00
Propionibacterium	0.00	0.00	0.00
Providencia	0.00	0.00	0.00
Pseudochrobactrum	0.00	0.00	0.00
Pseudoscardovia	0.00	0.00	0.00
Psychrobacter	0.00	0.00	0.00
Rahnella	0.00	0.00	0.00
S5-A14a	0.00	0.01	0.00
Sarcina	0.00	0.00	0.00
Scardovia	0.00	0.00	0.01
Selenomonas_3	0.00	0.00	0.00
Sphingobium	0.00	0.00	0.00
Sporobacter	0.00	0.00	0.01
Trichococcus	0.00	0.00	0.00
Ureaplasma	0.00	0.00	0.00
Varibaculum	0.00	0.00	0.00
W5053	0.00	0.00	0.00

Sample 1, baseline sample; Sample 2, 48-week sample; Sample 3, 96-week sample

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

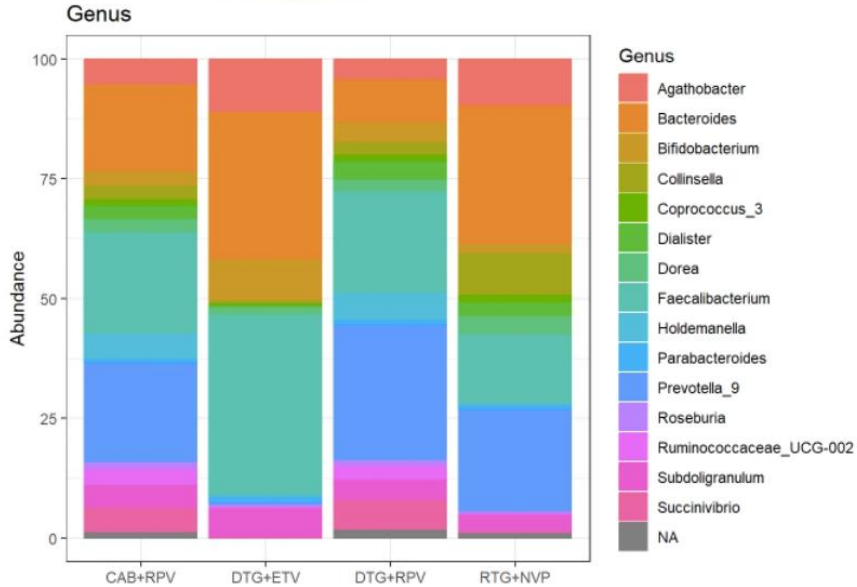
Figure S1. Distribution of gut microbiota composition at phylum (a) and genus (b) levels, and assessment of alpha (c) and beta diversity (d) among individuals who received both INSTI plus NNRTI regimens. Percentage distribution of abundance of the most abundant taxa. This group included 41 participants: 26 receiving CAB/RPV, 13 DTG/RPV, 1 DTG/ETV, and 1 RTG/NVP. Microbiota composition was assessed at both the phylum and genus levels. While no differences in alpha diversity were observed between dual-class regimens and the INSTI-only and NNRTI-only groups, beta diversity analysis showed statistically significant differences using the Jaccard metric ($p = 0.001$).

(a)



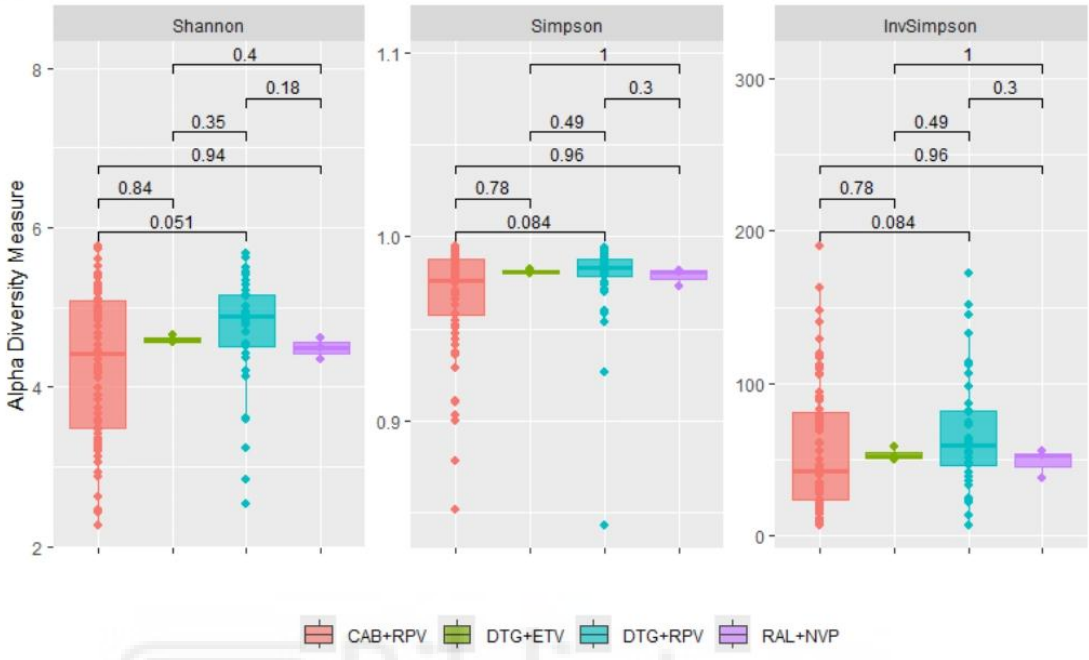
CAB, cabotegravir; RPV, rilpivirine; DTG, dolutegravir; ETV, etravirine; RPV, rilpivirine; RTG, raltegravir; NVP, nevirapine.

(b)



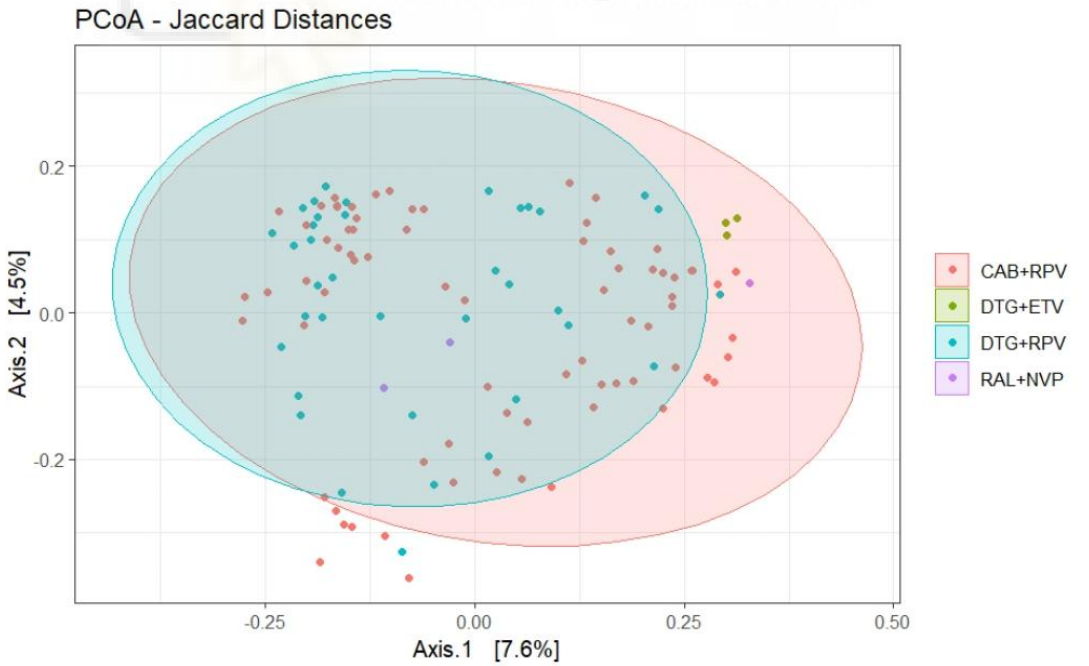
CAB, cabotegravir; RPV, rilpivirine; DTG, dolutegravir; ETV, etravirine; RPV, rilpivirine; RTG, raltegravir; NVP, nevirapine. NA: unclassified genera

(c)



CAB, cabotegravir; RPV, rilpivirine; DTG, dolutegravir; ETV, etravirine; RPV, rilpivirine; RAL, raltegravir; NVP, nevirapine.

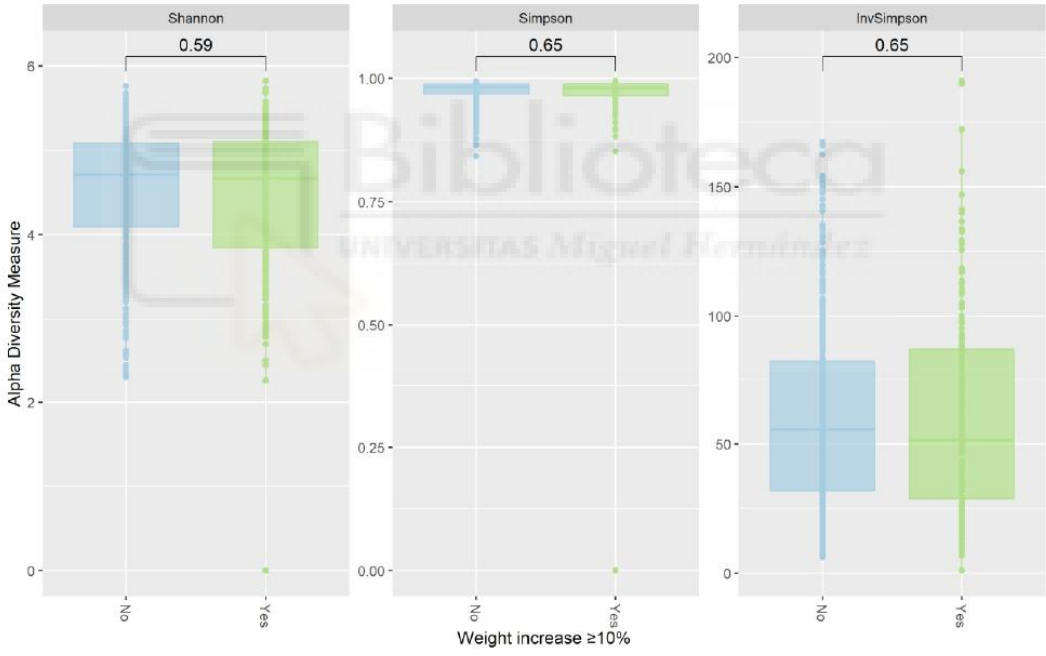
(d)



CAB, cabotegravir; RPV, rilpivirine; DTG, dolutegravir; ETV, etravirine; RPV, rilpivirine; RTG, raltegravir; NVP, nevirapine.
PERMANOVA, p = 0.001 (Jaccard distance)

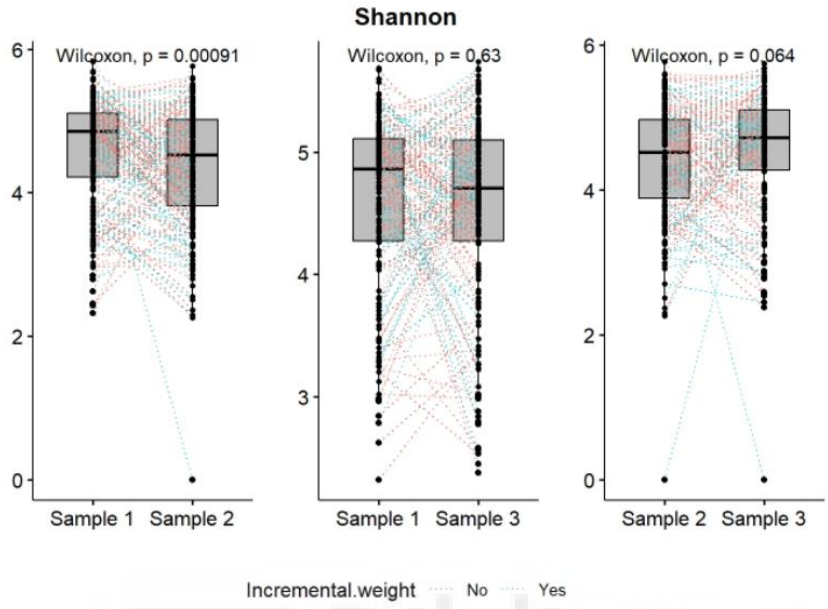
Figure S2. Gut microbiota α-diversity at the genus level by significant weight gain group. (a) Box plots show α-diversity according to weight gain group using different metrics: Shannon, Simpson and inverse Simpson indices. The analysis includes all study samples. (b) Comparison of α-diversity among study visits using the Shannon index. (c) Comparison of α-diversity among study visits using the inverse Simpson index. Numbers on top of boxes represent *P* values. All *P* values were calculated using the Wilcoxon rank sum test. The total number of fecal samples was 553, with 193 collected at the baseline visit (sample 1), 192 at the 48-week visit (sample 2), and 168 at the 96-week visit (sample 3).

(a)

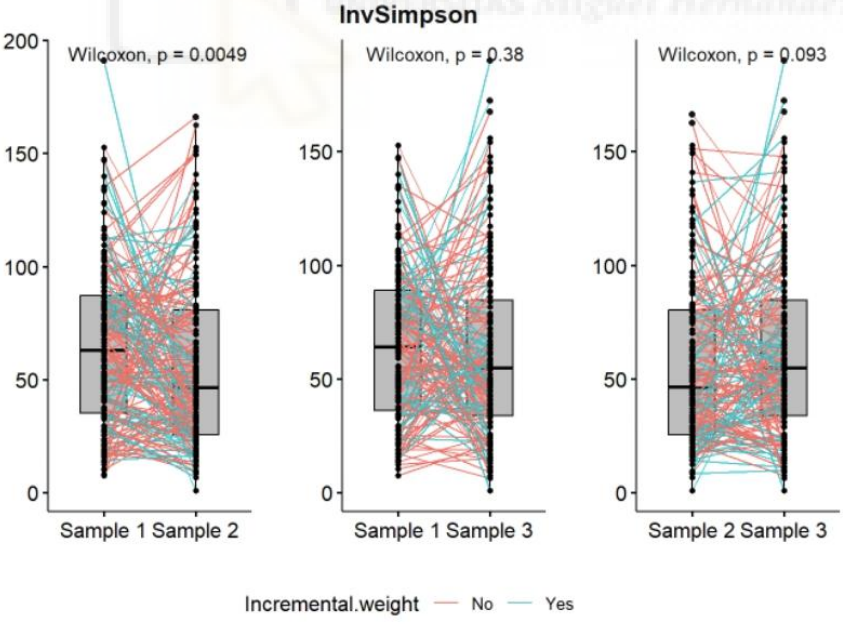


Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

(b)

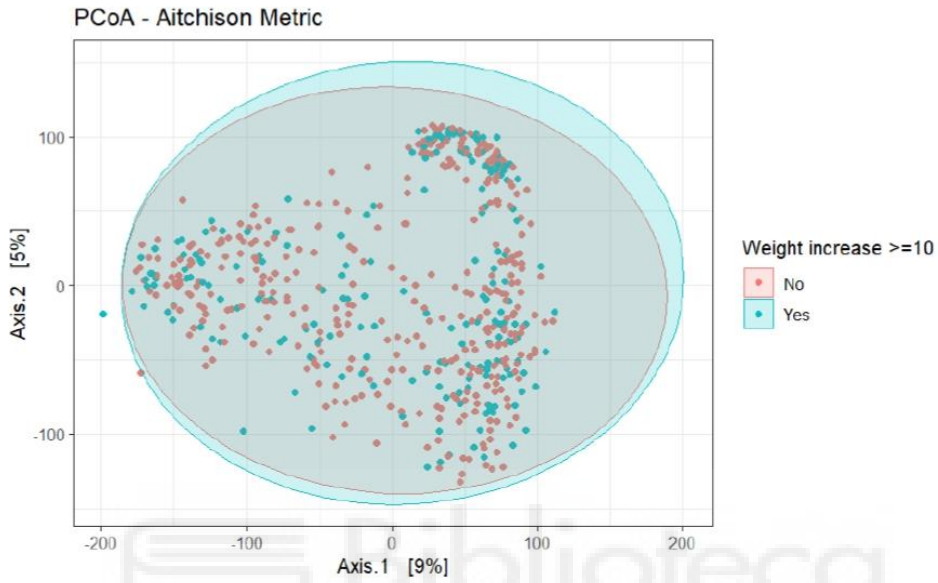


(c)



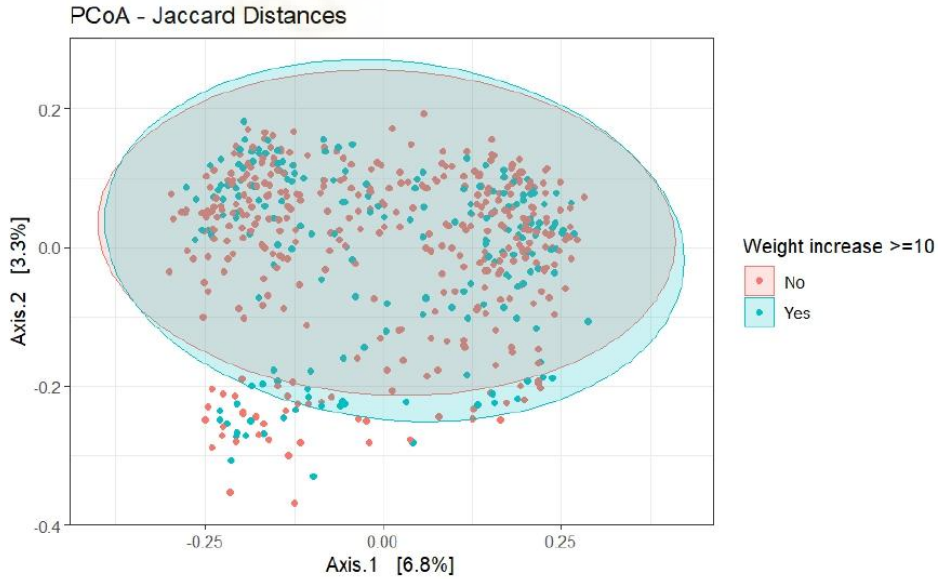
Biblioteca
Universitas Miguel Hernández

Figure S3. Principal coordinate analysis (PCoA) plots based on Aitchison and Jaccard distances showing the gut microbiota composition.
(a)



PERMANOVA, p = 0.159 (Aitchison distance)

(b)

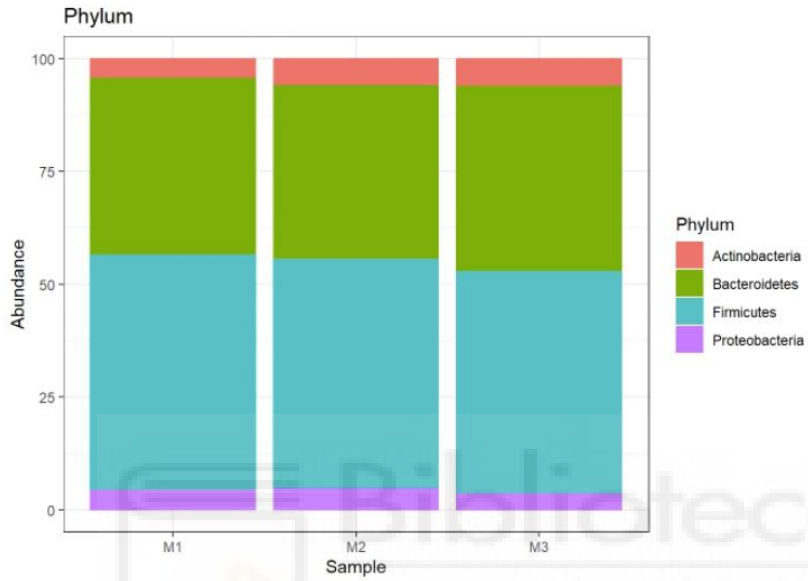


PERMANOVA, p = 0.065 (Jaccard distance)

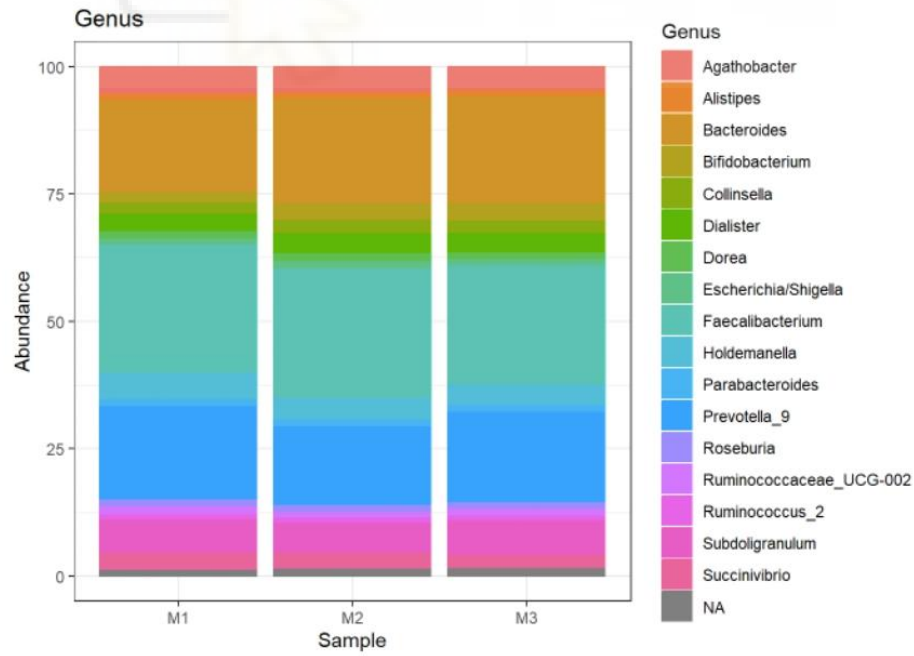
Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

Figure S4. Distribution of abundances at phylum (a) and genus (b) levels by study visit. Percentage distribution of abundance of the most abundant taxa.
The total number of fecal samples was 553, with 193 collected at the baseline visit (M1), 192 at the 48-week visit (M2), and 168 at the 96-week visit (M3).

(a)



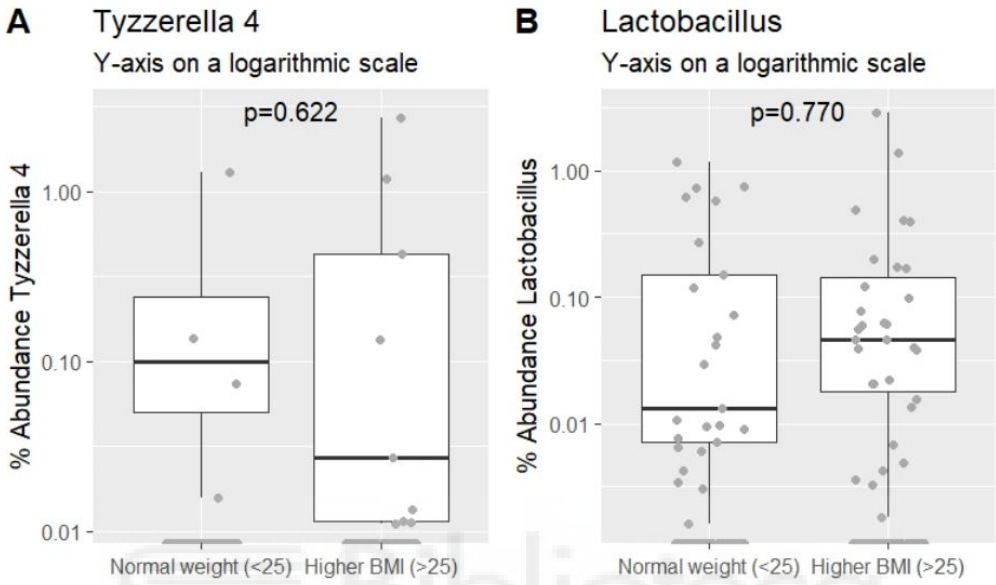
(b)



NA: unclassified genera

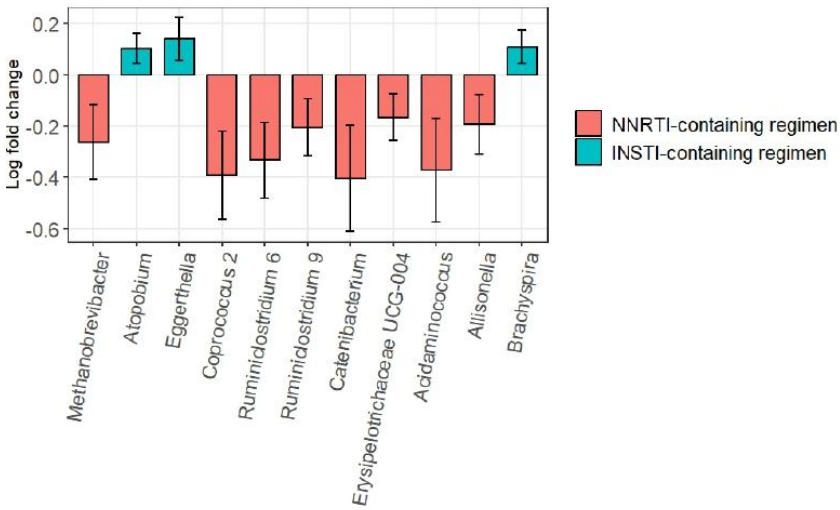
Biblioteca
Universitas Miguel Hernández

Figure S5. Relative abundances of bacterial taxa associated with significant (≥10%) weight gain in INSTI-treated participants, stratified by BMI category (normal weight vs. BMI >25).



BMI: Body mass index

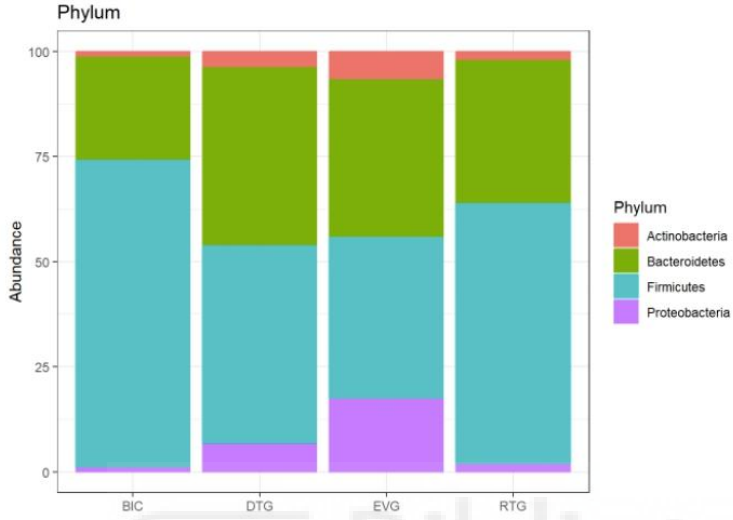
Figure S6. Adjusted analysis of composition of microbiomes with bias correction (ANCOM-BC2) in relation to the antiretroviral regimen (integrase strand transfer inhibitors [INSTI] or non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors [NNRTI]-based).
Data are represented by effect size (log fold change) and 95% confidence interval bars. The analysis includes 388 fecal samples.



INSTI, integrase strand transfer inhibitors; NNRTI, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors

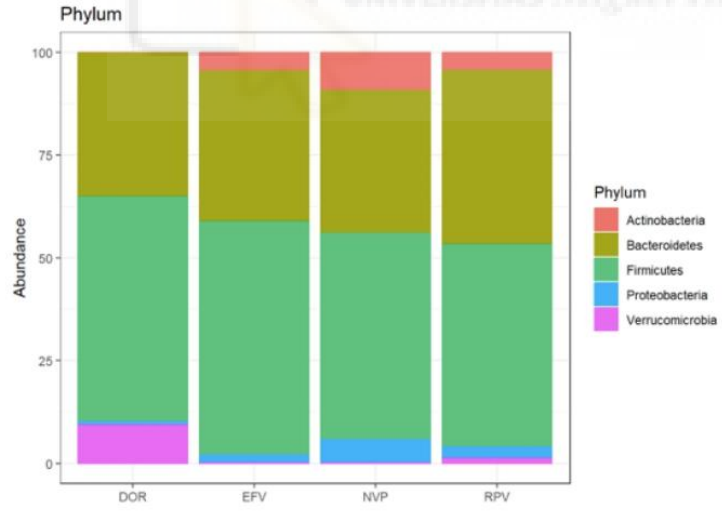
Figure S7. Distribution of abundances at phylum (a,b) and genus (c,d) levels, alpha (e,f) and beta diversity (g,h) of gut microbiota by specific INSTI and NNRTI subtypes. Percentage distribution of abundance of the most abundant taxa.

(a)



BIC, bictegravir; DTG, dolutegravir; EVG, elvitegravir; RTG, raltegravir.

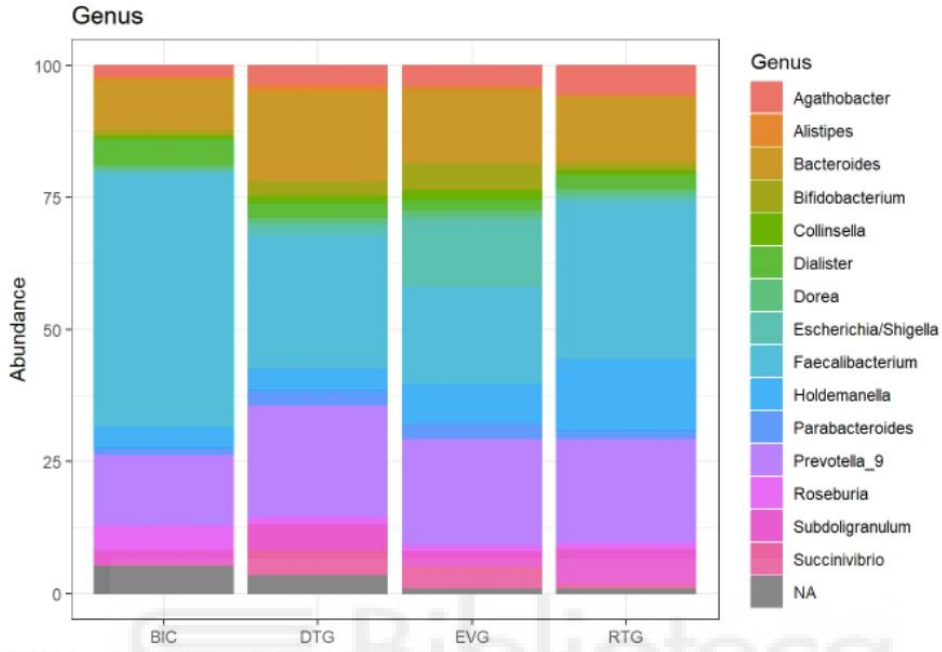
(b)



DOR, doravirine; EFV, efavirenz; NVP, nevirapine; RPV, rilpivirine.

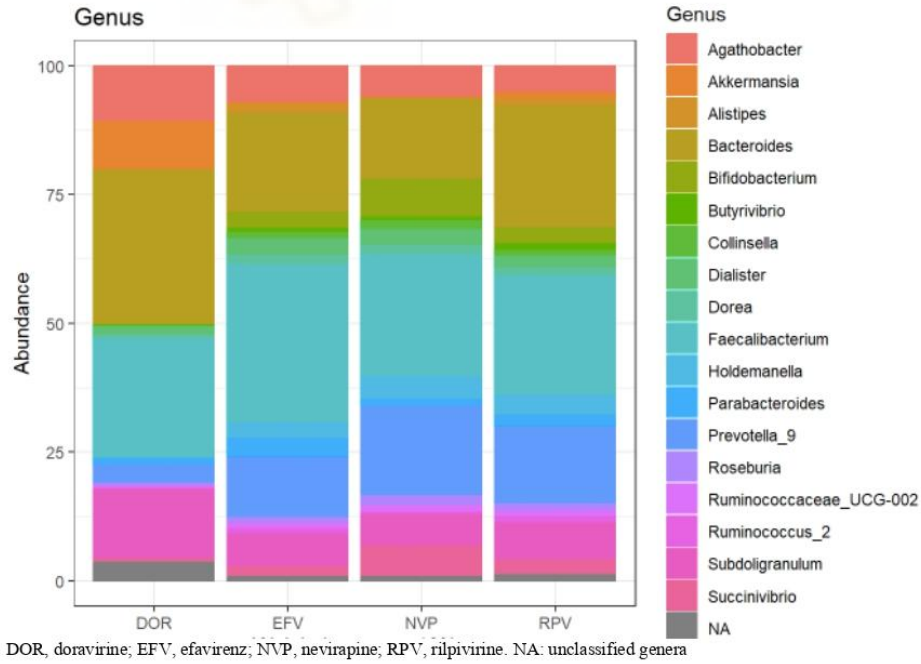
Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

(c)



BIC, bictegravir; DTG, dolutegravir; EVG, elvitegravir; RTG, raltegravir. NA: unclassified genera

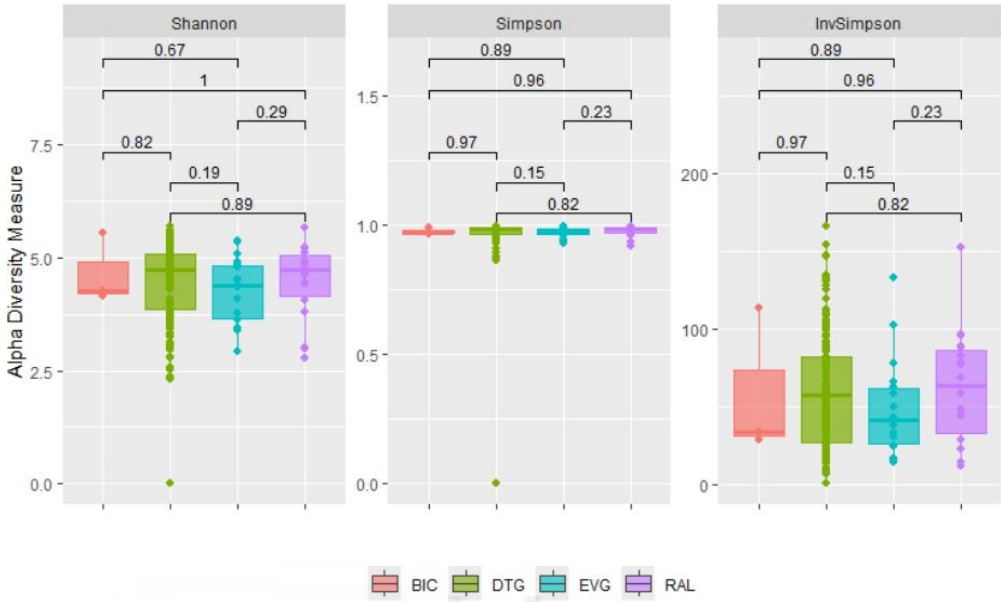
(d)



DOR, doravirine; EFV, efavirenz; NVP, nevirapine; RPV, rilpivirine. NA: unclassified genera

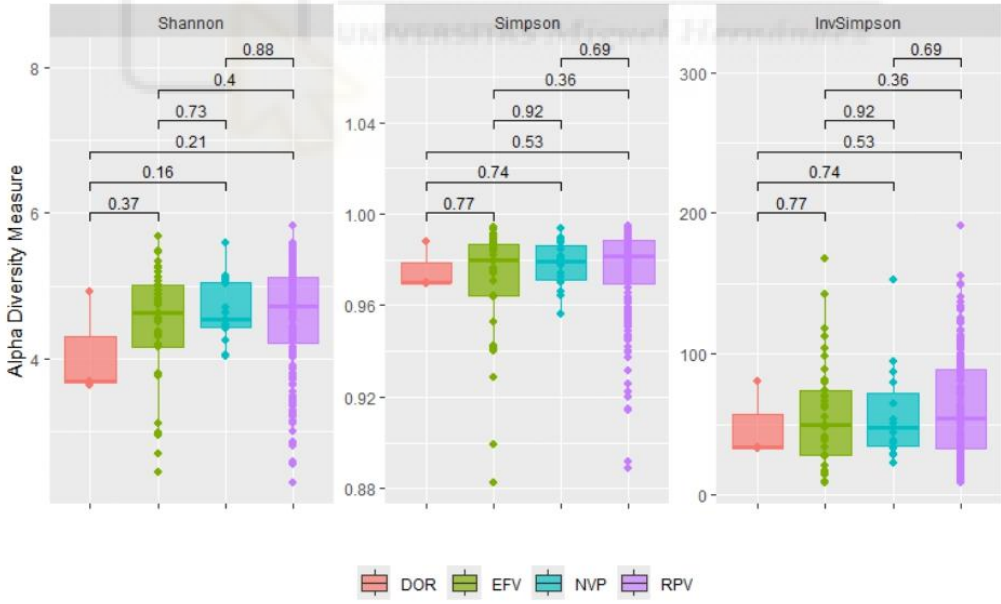
Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

(e)



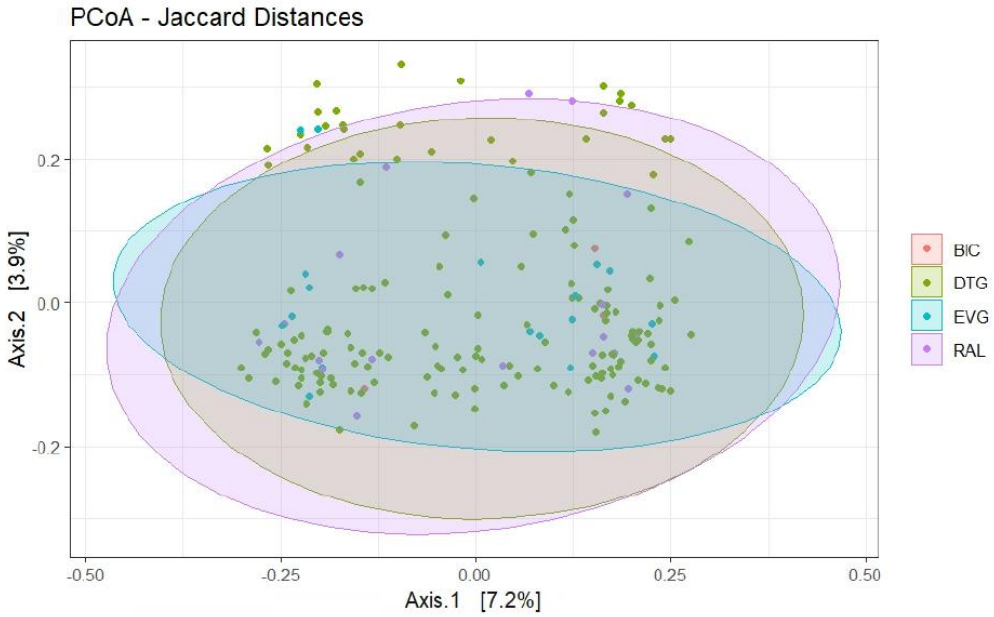
BIC, bictegravir; DTG, dolutegravir; EVG, elvitegravir; RTG, raltegravir.

(f)



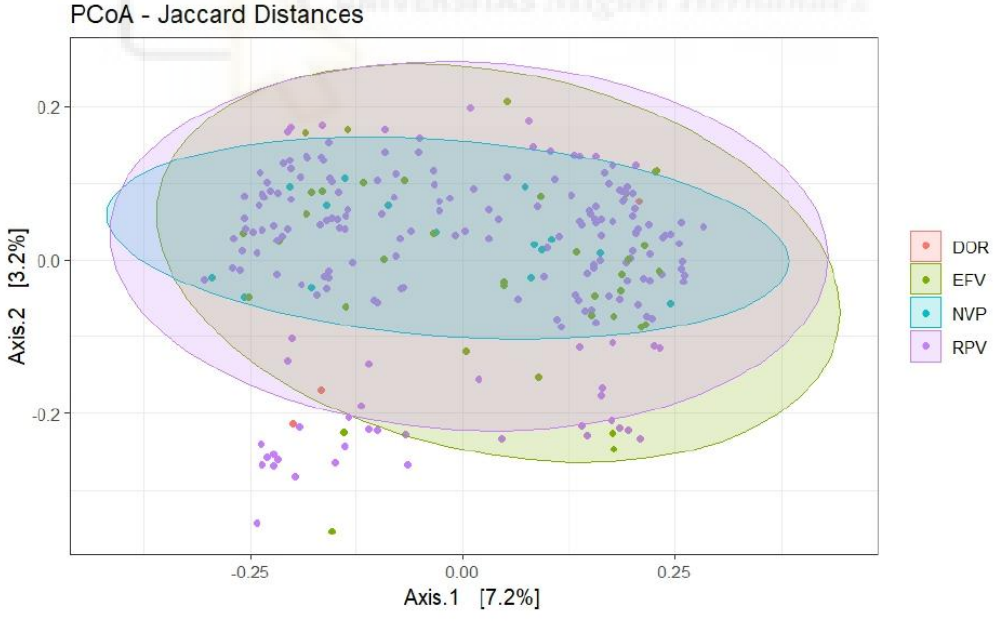
DOR, doravirine; EFV, efavirenz; NVP, nevirapine; RPV, rilpivirine.

(g)



BIC, bictegravir; DTG, dolutegravir; EVG, elvitegravir; RTG, raltegravir. PERMANOVA, p = 0.002 (Jaccard distance)

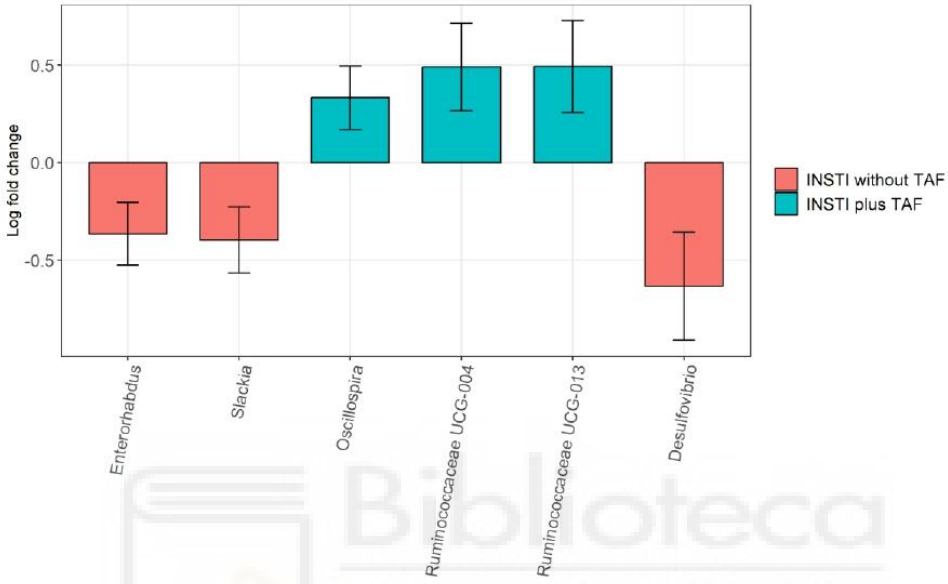
(h)



DOR, doravirine; EFV, efavirenz; NVP, nevirapine; RPV, rilpivirine. PERMANOVA, p = 0.102 (Jaccard distance)

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

Figure S8. Adjusted analysis of composition of microbiomes with bias correction (ANCOM-BC2) in relation to antiretroviral regimen (integrase strand transfer inhibitors plus tenofovir alafenamide versus integrase strand transfer inhibitors without tenofovir alafenamide). Data are represented by effect size (log fold change) and 95% confidence interval bars. The analysis includes 153 fecal samples.



INSTI, integrase strand transfer inhibitors; TAF, tenofovir alafenamide

Biblioteca Miguel Hernández

Supplementary files.

FAECAL SAMPLE COLLECTION PROTOCOL

Patients will be provided with the necessary materials for the collection and maintenance of faecal samples. Additionally, they will be given and explained instructions on the procedure to follow for collection and storage until final delivery.

Equipment for faecal collection:

- 1 spatula 210 mm (smartSpatula®).
- 1 Falcon tube of 50 ml (without skirt, conical tip) for the sample. The container will contain a volume of 10 ml of RNAlater (invitrogen® by Thermo Fisher Scientific) and will indicate the level to be reached when adding the stool sample (20 ml).
- Opaque plastic bag.

Instructions for proper stool collection:

- Collect stool in a clean and dry container, avoiding contamination with urine, water, or toilet paper. You may use a bidet at home covered with aluminum foil for this purpose.

Stool collection: Using a spatula, gather small amounts of stool from the container and place them into the sample tube.

IMPORTANT: Open the container carefully to avoid spilling the liquid they contain. In each sampling, FILL THE TUBE TO THE LEVEL INDICATED BY THE ARROW.

- Close the tube properly and shake to mix the sample with the liquid medium. This medium aids in preserving the sample.
- Label the tube with the assigned code and date.
- Place the tube in the plastic bag provided. STORE THE CONTAINERS IN THE REFRIGERATOR AT 4°C, not in the freezer, until the time of delivery.
- Dispose of faecal remnants and used plastic material.

Preservation

Preservation of the sample is critical, so it should be kept at 4°C until properly stored (at -80°C) within a maximum period of 24 hours. Otherwise, the qualitative and quantitative composition of the samples would be altered. Avoid freezing at -20°C, as slow freezing of water leads to the formation of crystals that can affect cell integrity.

Samples collected from Monday to Thursday will be considered valid if delivered within 24 hours. The recommended time for stool collection is preferably on the same day, ideally in the morning between 7:00-10:00 AM, although samples collected the previous night are also acceptable. Samples collected on Friday morning must be delivered that same morning (until 15:00). Do not collect samples on Friday afternoons, Saturday or on Sunday mornings.

Transport

The transfer of samples from the hospital to the laboratory (Genomic and Health Area, CSISP) should be done in a box containing as much dry ice as possible and within the shortest timeframe feasible.

DEFINITION OF CARDIOVASCULAR DISEASE

Cardiovascular disease was defined by a medical history of either cardiovascular events or cerebrovascular events. Cardiovascular events included acute myocardial infarction, angina, congestive heart failure, and coronary-related death. Cerebrovascular events comprised stroke and transient ischemic attack

REFERENCE OF BIOINFORMATICS PACKAGES

Microbiome data processing and analysis were conducted in R using the following packages:

```
library(microbiome)
library(devtools)
library(dada2)
library(phyloseq)
library(Biostrings)
library(ggplot2)
library(phangorn)
library(ape)
library(BiocManager)
library(readxl)
library(dplyr)
library(gridExtra)
library(grid)
library(lattice)
library(ade4)
library(ggrepel)
library(randomForest)
library(pls)
library(caret)
library(knitr)
library(lefse)
library(dada2)
library(phyloseq)
library(phyloseq)
library(readxl)
library(vegan)
library(phytools)
library(ALDEx2)
```

Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández