

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas



INI

Instituto Nacional de Infectologia

Evandro Chagas

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS

DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

CAROLYN YANAVICH

ESTUDO DO DESENVOLVIMENTO E IMPACTO DA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCÓOLICA (DGHNA) NA INFECÇÃO PELA HIV: NOVOS BIOMARCADORES, MICROBIOTA INTESTINAL E VIAS FUNCIONAIS PARA DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DA PATOGÊNESE NA PRESENÇA DE ESTEATOSE E FIBROSE HEPÁTICA

Rio de Janeiro

2019

CAROLYN YANAVICH

ESTUDO DO DESENVOLVIMENTO E IMPACTO DA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCÓOLICA (DGHNA) NA INFECÇÃO PELA HIV: NOVOS BIOMARCADORES, MICROBIOTA INTESTINAL E VIAS FUNCIONAIS PARA DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DA PATOGÊNESE NA PRESENÇA DE ESTEATOSE E FIBROSE HEPÁTICA

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) para obtenção do grau de Doutor.

Orientadora: Beatriz Grinsztejn

Coorientador: Hugo Perazzo

Rio de Janeiro

2019

Carolyn Yanavich

ESTUDO DO DESENVOLVIMENTO E IMPACTO DA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCÓOLICA (DGHNA) NA INFECÇÃO PELA HIV: NOVOS BIOMARCADORES, MICROBIOTA INTESTINAL E VIAS FUNCIONAIS PARA DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DA PATOGÊNESE NA PRESENÇA DE ESTEATOSE E FIBROSE HEPÁTICA

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) para obtenção do grau de Doutor
Orientadora: Beatriz Grinsztejn
Coorientador: Hugo Perazzo
Aprovada em / /____

BANCA EXAMINADORA

Sandra Wagner Cardoso, MD, PhD (Presidente)
INI/Fiocruz

Valdilea Goncalves Veloso, MD, PhD
INI/Fiocruz

Estevão Portela Nunes, MD, PhD
INI/Fiocruz

Flavia Ferreira Fernandes, MD, PhD
Hospital Federal de Bonsucesso (HFB)

Gustavo Henrique Santos Pereira
Hospital Federal de Bonsucesso (HFB)

Carolyn Yanavich

ESTUDO DO DESENVOLVIMENTO E IMPACTO DA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCÓOLICA (DGHNA) NA INFECÇÃO PELA HIV: NOVOS BIOMARCADORES, MICROBIOTA INTESTINAL E VIAS FUNCIONAIS PARA DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DA PATOGÊNESE NA PRESENÇA DE ESTEATOSE E FIBROSE HEPÁTICA

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) para obtenção do grau de Doutor
Orientadora: Beatriz Grinsztejn
Coorientador: Hugo Perazzo
Aprovada em / /_____

SUPLENTE

Ruth Khalili, MD PhD
INI/Fiocruz

Este trabalho de tese é dedicado ao meu marido, Joseph, e ao meu filho William, que me deram amor, apoio e riso, e aos meus pais Bernard e Catherine, que permanecem para sempre uma fonte de inspiração.

AGRADECIMENTOS

Para os meus pais Bernard e Catherine, vocês sempre me inspiraram a perseguir os meus sonhos e este foi um dos maiores de sempre.

Ao meu marido Joseph e ao meu filho William, obrigado por estarem sempre presentes e apoiarem os meus objectivos e desejos, por muito grandes ou pequenos que fossem. O vosso constante e inabalável encorajamento significa tudo.

Aos meus tios Johnny e John e às tias Martha e Maureen, obrigado pelo vosso apoio e compaixão em cada passo do caminho. Aos meus amigos Mike e Lori, vocês são as líderes de claqué que todos deveriam ter a sorte de ter.

À Profa. Dra. Beatriz Grinsztejn, estou-vos eternamente grata pela vossa inspiração, gentileza e apoio inabalável. Encarnais a definição de mentora, tanto como investigadora como na vida. Tem uma visão para os outros, mesmo quando ainda não a vemos em nós próprios. Os conhecimentos adquiridos com o seu mentor e amizade continuarão a motivar-me enquanto olho para o futuro.

Ao Dr. Hugo Perazzo, sinto-me honrado por ter estado sob a sua tutela e grato pela sua paciência e bondade ao longo deste programa. O senhor é um médico maravilhoso e um cientista dotado, e eu tenho a sorte de ter aprendido com os melhores.

À Profa. Dra. Valdilea Veloso, a sua orientação e amizade significam o mundo para mim. Fico espantada todos os dias com as contribuições que dáis não só ao INI e à comunidade científica, mas também com a oportunidade que investiste em mim. Sois um líder e cientista que tenho a humildade de conhecer.

À Dra. Grace Aldrovandi estou grata pelo vosso apoio ao meu interesse no campo do microbioma. A sua paixão pela ciência e pela inovação inspirou-me durante quase vinte anos e a contar.

Aos participantes do estudo PROSPEC-HIV, obrigado pela vossa confiança e empenho na investigação clínica. A vossa participação motiva-me a estudar novas formas de melhorar os cuidados e o tratamento das pessoas afectadas pelo VIH.

Ao conselho directivo e ao programa de investigação de pós-graduação da FIOCRUZ, estou grato pelo vosso apoio e orientação contínua ao longo dos anos. Sinto-me honrado por me ter sido dada a oportunidade de aprender convosco e com o quadro de cientistas de uma instituição tão famosa e respeitada como a FIOCRUZ.

Yanavich, C.M. Rio de Janeiro, 2019. **Understanding the development and impact of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and HIV infection: Using non-invasive tests, microbial signatures, and functional pathways to diagnose and evaluate the pathogenesis of steatosis and fibrosis.** Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

ABSTRACT

Background: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is characterized by an abnormal accumulation of liver fat. It is a leading cause of chronic liver disease globally and a major health risk for people living with HIV (PLWH). Alternative, non-invasive strategies for early detection and management of NAFLD are needed, particularly in resource limited settings. Understanding the diagnostic value of predictive models for NAFLD and advanced fibrosis that use simple blood tests and anthropometric measures may assist healthcare providers with making earlier care and treatment decisions in the HIV-infected population. In addition to alternative diagnostic methods, we aimed to expand our understanding of NAFLD and the role of gut microbiome on the development of liver steatosis and/or fibrosis in PLWH.

Objectives: To validate the diagnostic value of predictive models for the detection of NAFLD and/or advanced fibrosis in PLWH; to characterize the gut microbiome of HIV-infected participants with evidence of liver steatosis or fibrosis.

First Manuscript: To validate the accuracy of non-invasive predictive models for NAFLD and advanced fibrosis (METAVIR-F3F4) in HIV mono-infection in 437 participants enrolled in the PROSPEC-HIV study (NCT02542020). Clinical evaluations, serum biomarker analysis and liver stiffness measurements (LSM)/Controlled Attenuation Parameter (CAP) by transient elastography (TE) were performed. Predictive models for NAFLD [Steato-ELSA, Fatty Liver Index (FLI), Hepatic Steatosis Index (HSI), NAFLD Liver Fat Score (NAFLD-LFS)] and fibrosis [FIB-4, APRI and NAFLD Fibrosis Score (NFS)] were calculated. The area under the ROC curves (AUROC), sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and likelihood ratio (LR) were assessed. The biomarkers for steatosis had good accuracy and those for fibrosis had a high specificity (>95%) and NPV (90%).

Second Manuscript: To evaluate the relationship between the gut microbiome and liver disease in HIV-1 infected participants. 16S rRNA gene and whole genome shotgun metagenomic sequencing were performed on rectal swabs collected from a subset of HIV mono-infected participants with liver steatosis (n=30), liver fibrosis (n=22) and controls (n=30) based on transient elastography from the PROSPEC-HIV-study (NCT02542020). Bacterial differences were assessed using zero-inflated negative binomial (ZINB) regression and random forests modeling, and taxonomic drivers of functional shifts were identified using FishTaco. Liver health status explained four percent of the overall variation ($r^2=0.04$, $p=0.003$) in bacterial composition. In steatosis, functional analysis revealed increases in primary and secondary bile acid synthesis encoded by increases of *Eubacterium rectale*, *Fingoldia magna*, and *Faecalibacterium prausnitzii* as well as decreases of *Akkermansia muciniphila*, *Bacteroides fragilis*, and *Bacteroides dorei*. Additionally, folate biosynthesis was decreased. HIV mono-infected persons with liver disease possess distinct microbial profiles. Some of the discriminatory bacterial taxa observed in this cohort are similar to those associated with NAFLD and advanced fibrosis in HIV negative populations.

Conclusions: Predictive models that use simple parameters have a satisfactory accuracy for both the detection of NAFLD and the exclusion of advanced liver fibrosis. These models should be incorporated into the routine clinical care setting for PLWH as non-invasive alternatives to liver biopsy for early diagnosis of liver diseases in HIV infection. Through evaluation of the gut microbiome, we identified potential microbial contributions to altered functional pathways of bile

acid and folate biosynthesis that are likely contributors to fatty liver disease pathogenesis. The data from this study support the concept that the gut-liver axis plays an important role in the NAFLD pathogenesis in HIV-infected patients. Overall our findings provide information on strategies for improved diagnostics and further insight on the possible effects of microbial dysbiosis and the progression of NAFLD.

Keywords: HIV infection; nonalcoholic fatty liver disease; steatosis; fibrosis; serological biomarkers, microbiome, 16S rRNA, shotgun.

Yanavich, C.M. Rio de Janeiro, 2019. **Estudo do desenvolvimento e impacto da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) na infecção pelo HIV: novos biomarcadores, microbiota intestinal e vias funcionais para diagnóstico e avaliação da patogênese na presença de esteatose e fibrose hepática.** Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

RESUMO

Introdução: A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é caracterizada pelo acúmulo anormal de gordura no parênquima hepático. Trata-se de uma das principais causas de doença hepática crônica em todo o mundo e um problema de saúde em pessoas vivendo com HIV/AIDS (PVHA). Estratégias não invasivas como alternativa à biópsia hepática são necessárias para a diagnóstico precoce e manejo da DHGNA, principalmente em países em desenvolvimento. A validação do desempenho diagnóstico de modelos preditivos para DHGNA e fibrose avançada que utilizam parâmetros simples, como exames de sangue e medidas antropométricas, podem auxiliar no diagnóstico precoce e manejo da DHGNA em PVHA. Além da validação de métodos alternativos de diagnóstico, torna-se necessária melhor compreensão da DHGNA e o papel da microbiota intestinal no desenvolvimento de esteatose e/ou fibrose hepática na infecção pelo HIV.

Objetivos: Validar o valor diagnóstico de modelos preditivos para detecção de DHGNA e/ou fibrose avançada em PVHA; caracterizar a microbiota intestinal de participantes mono-infectados pelo HIV e avaliar sua relação com presença de esteatose ou fibrose hepática em participantes do estudo PROSPEC-HIV (NCT02542020).

Primeiro manuscrito: Este estudo teve como objetivo primário validar o desempenho diagnóstico de modelos preditivos não invasivos para detecção de DHGNA e fibrose avançada (METAVIR-F3F4) em 437 participantes mono-infectados pelo HIV. Foram realizadas avaliações clínicas, análises de biomarcadores séricos e aferição da rigidez hepática (liver stiffness measurement, LSM)/atenuação dos feixes ultrassonográficos (Controlled Attenuation Parameter, CAP) por elastografia hepática transitória (EHT). Foram calculados modelos preditivos para DHGNA [Steato-ELSA, Fatty Liver Index (FLI), Hepatic Steatosis Index (HSI), NAFLD Liver-Fat-Score (NAFLD-LFS)] e fibrose [FIB-4, APRI e NAFLD Fibrosis Score (NFS)]. Foram avaliadas a área sob as curvas ROC (AUROC), sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e razão de verossimilhança (RV). Os biomarcadores para esteatose apresentaram boa acurácia e aqueles para detecção de fibrose avançada apresentaram alta especificidade (> 95%) e VPN (90%).

Segundo manuscrito: Este estudo teve como objetivo primário avaliar a relação entre microbiota intestinal e doença hepática em 82 participantes mono-infectados pelo HIV-1. Foram realizados sequenciamento metagenômico por *shotgun* do gene 16S rRNA e do genoma inteiro em *swabs* retais coletados de um subconjunto de participantes mono-infectados pelo HIV com esteatose hepática (n=30), fibrose hepática (n=22) e controles (n=30) baseados nos resultados da EHT. As diferenças bacterianas foram avaliadas usando regressão binomial negativa com zero inflacionado (ZINB) e modelagem de florestas aleatórias e foram identificados contribuintes taxonômicos de deslocamentos funcionais usando FishTaco. O estado de saúde do fígado justificou quatro por cento da variação geral ($r^2=0,04$, $p=0,003$) na composição bacteriana. Na esteatose, a análise funcional revelou elevação na síntese de ácidos biliares primários e secundários codificados por aumento de *Eubacterium rectale*, *Fingoldia magna* e *Faecalibacterium prausnitzii*, bem como redução de *Akkermansia muciniphila*, *Bacteroides fragilis* e *Bacteroides dorei*. Além disso, a biossíntese de folato foi reduzida. Pessoas mono-infectadas pelo HIV com doença hepática possuem perfis microbianos distintos. Algumas das diferenças da microbiota intestinal observadas nesta coorte são semelhantes àqueles associados à DHGNA e fibrose avançada em populações não-infectadas pelo HIV.

Conclusões: Modelos preditivos que usam parâmetros simples têm acurácia satisfatória tanto para detecção de DHGNA como para exclusão de fibrose hepática avançada. Esses modelos devem ser

incorporados à rotina de tratamento clínico de PVHA como alternativas não invasivas à biópsia hepática para diagnóstico precoce de doenças hepáticas na infecção pelo HIV. Por meio da avaliação da microbiota intestinal, identificamos possíveis contribuições microbianas na alteração das vias funcionais de biossíntese de ácido biliar e folato que provavelmente contribuem para a patogênese da DHGNA. Os resultados desta tese reforçam a hipótese que a microbiota intestinal tem papel importante na patogênese da DHGNA em pacientes infectados pelo HIV. De modo geral, nossos resultados fornecem evidências para elaboração de futuras estratégias para aprimoramento do diagnóstico e manejo, além de conhecimentos adicionais sobre efeitos da alteração da microbiota intestinal na progressão da DHGNA.

Palavras-chave: Infecção por HIV; doença hepática gordurosa não alcoólica; esteatose hepática; fibrose hepática; biomarcadores sorológicos, microbiota intestinal, 16S rRNA, shotgun.

LISTA DE FIGURAS

Primeiro artigo

- Figura 1.** Fluxograma do recrutamento de pacientes para o estudo 47
- Figura 2.** [A and B] Área sob a curva de característica de operação do receptor (AUROC) do índice de gordura hepática (FLI), índice de esteatose hepática (HSI), escore de gordura hepática na DHGNA (NAFLD-LFS) e Steato-ELSA para DHGNA 48

Segundo artigo

- Figura 1:** A) Composição taxonômica do gênero, agrupada por estado de saúde hepática. B) Gráfico da análise de coordenadas principais (PCoA) utilizando a distância de Bray-Curtis. C) Diagramas de caixa da proporção entre Bacteroidetes e Firmicutes de acordo com o estado de saúde do fígado 60
- Figura 2.** Os modelos de classificação binária e de classificação multiclases identificam táxons bacterianos semelhantes como preditores importantes do estado de saúde do fígado. 61
- Figura 3:** Composição bacteriana por sequenciamento metagenômico por shotgun e fatores taxonômicos de mudanças funcionais. 62

LISTA DE TABELAS

Primeiro artigo

Tabela 1. Características basais dos pacientes 46

Tabela 2. Área sob as curvas do operador receptor [AUROC (intervalo de confiança de 95%) de biomarcadores serológicos/modelos preditivos para detecção de doença hepática gordurosa alcoólica (NAFLD)(definida pelo CAP \geq 248 dB/m) ou fibrose avançada [definida pelo LSM \geq 8,7 kPa (sonda M) ou \geq 7,2 kPa (sonda XL)] 49

Tabela 3. Exatidão de modelos preditivos para detecção de DHGNA [CAP \geq 248 dB/m] 50

Tabela 4. Exatidão de modelos preditivos para detecção de fibrose avançada [LSM \geq 8,7 kPa (sonda M) ou \geq 7,2 kPa (sonda XL)] 50

Segundo artigo

Tabela 1. Características basais de 82 participantes de pesquisa 59

LISTA DE ABREVIACÕES

ALT: Alanina aminotransferase

APRI: Índice de relação aspartato aminotransferase sobre plaquetas

TARV: Terapia antirretroviral

AST: Aspartato aminotransferase

AUDIT: Teste para identificação de problemas relacionados ao uso de álcool

AUROC: Área sob a curva de característica de operação do receptor

IMC: Índice de massa corporal

CAP: Parâmetro de atenuação controlada

IC: Intervalo de confiança

D:A:D: Data Collection on Adverse Events of Anti-HIV Drugs

AAD: Antiviral de ação direta

DMA: Dimetilamina

EHEC: *E. coli* entero-hemorrágica

AGL: Ácidos graxos livres

FIB-4: Escore Fibrosis-4

FLI: Índice de gordura hepática

FMT: Transplante de microbiota fecal

FXR: Receptor farsenoide X

GALT: Tecido linfoide associado ao intestino

GGT: Gama glutamil transferase

GUDCA: Ácido glicoursodesoxicólico

CHC: Carcinoma hepatocelular

HCV: Vírus da hepatite C

HDL: Lipoproteína de alta densidade

HSI: Índice de esteatose hepática

IQR: Amplitude interquartil

LBP: Proteína de ligação ao LPS

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

LPS: Lipopolissacarídeo

RV: Razão de verossimilhança

LSM: Medição da rigidez hepática

ERM: Espectroscopia por ressonância magnética

ERM: Espectroscopia por ressonância magnética

DHGNA: Doença hepática gordurosa não alcoólica

NAFLD-LFS: Escore de gordura hepática na DHGNA

NAS: Escore de atividade da DHGNA

EHNA: Esteato-hepatite não alcoólica

NFS: Escore de fibrose na DHGNA

NPV: Valor preditivo negativo

ITRN: Inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeo

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PLWH: Pessoas que vivem com HIV

PPV: Valor preditivo positivo

AGCC: Ácidos graxos de cadeia curta

Se: Sensibilidade

Sp: Especificidade

DM2: Diabetes mellitus tipo 2

EHT: Elastografia hepática transitória

TLR: Receptores do tipo Toll

TMA: Trimetilamina

LSN: Limite superior normal

ZO-1: zônula de oclusão-1

ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIACOES	xii
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 DHGNA	17
1.2 Resultados em longo prazo da DHGNA	18
1.3 Diagnóstico de DHGNA/EHNA e estágio de fibrose.....	19
1.4 HIV e comorbidades: A epidemia de DHGNA	21
<i>Carga da doença hepática gordurosa não alcoólica em pessoas com HIV/AIDS</i>	<i>22</i>
<i>O que explica o alto risco de DHGNA em pessoas infectadas pelo HIV?</i>	<i>23</i>
<i>Como o HIV influencia a história natural da DHGNA</i>	<i>23</i>
1.5 Microbioma e a relação com a DHGNA	24
<i>Microbiota gastrointestinal, translocação microbiana e ativação imune.....</i>	<i>25</i>
<i>Estudos clínicos.....</i>	<i>27</i>
<i>Mecanismo</i>	<i>27</i>
<i>Metablitos</i>	<i>28</i>
<i>cidos graxos de cadeia curta (AGCCs).....</i>	<i>28</i>
<i>Colina</i>	<i>28</i>
<i>Fermentao alcolica por microrganismos</i>	<i>29</i>
<i>Fenilacetato.....</i>	<i>29</i>
<i>Bile</i>	<i>29</i>
<i>Quebra da barreira intestinal.....</i>	<i>29</i>
<i>Via inflamatria.....</i>	<i>30</i>
<i>Esforos baseados em microbioma para o tratamento da DHGNA</i>	<i>30</i>
<i>Probiticos, prebiticos e simbiticos.....</i>	<i>31</i>
1.6 Infecção pelo HIV e o microbioma intestinal	32
<i>Introdução.....</i>	<i>32</i>
1.7 Microbioma do intestino humano	34
<i>Microbioma intestinal e microbiota intestinal.....</i>	<i>34</i>
<i>Mtodos de estudo do microbioma</i>	<i>34</i>
<i>Sequenciamento do gene 16S rRNA</i>	<i>34</i>
<i>Sequenciamento por shotgun</i>	<i>35</i>

<i>Desenvolvimento da microbiota intestinal</i>	35
<i>Heterogeneidade entre os indivíduos</i>	36
<i>Simbiose da microbiota intestinal e saúde humana</i>	36
<i>Proteção contra patógenos</i>	37
<i>Microbiota intestinal e sistema imunológico</i>	37
<i>Disbiose e doença da microbiota intestinal</i>	38
2. FUNDAMENTAÇÃO DO PROJETO	39
1. OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo primário:	40
3.2 Objetivo secundário:	40
1. Estrutura da tese	41
2. PRIMERIO ARTIGO	42
3. SEGUNDA ARTIGO	55
4. CONCLUSÕES	66
5. RECOMENDAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	67
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
7. ANEXOS	80

1. INTRODUÇÃO

1.1 DHGNA

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) caracteriza-se pelo acúmulo anormal de gordura no fígado (>5% dos hepatócitos) na ausência de consumo excessivo de álcool (<30 g/semana para homens e <20 g/semana para mulheres). Atualmente, a DHGNA representa uma das principais manifestações de doença hepática crônica em todo o mundo.(1) Existem cada vez mais evidências que indicam a alta prevalência de DHGNA na população geral em todo o mundo, principalmente devido à sua estreita relação com alterações metabólicas, como diabetes mellitus tipo 2 (DM2), dislipidemia e obesidade. A prevalência global da DHGNA estimada foi de 25%, com maior prevalência no Oriente Médio e na América do Sul (32% e 30%, respectivamente) e menor prevalência na África (14%). Além disso, as taxas de prevalência da DHGNA na América do Norte, Europa e Ásia variaram de 24% a 27%.(2) Pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e pacientes com obesidade mórbida apresentam maior risco, com taxas de prevalência da DHGNA de 60% e 95%, respectivamente. O espectro clínico da DHGNA pode variar de esteatose simples, ou fígado gorduroso não alcoólico (FGNA), até a forma progressiva, conhecida como esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), caracterizada por inflamação lobular e balonização hepatocelular.(3) Em alguns pacientes, a EHNA está associada a progressão da fibrose, levando a cirrose e suas complicações, como hipertensão portal e carcinoma hepatocelular (CHC).(4) Os estudos descrevem que a prevalência da EHNA pode ser de até 6% na população geral. Um estudo de modelagem recente prevê uma epidemia de DHGNA/EHNA na próxima década nos Estados Unidos: a prevalência de EHNA irá aumentar 63% até 2030, resultando no aumento da incidência de cirrose descompensada e CHC de 168% e 137%, respectivamente, e no aumento das mortes relacionadas a doenças hepáticas de 178%.(5)

A teoria dos dois eventos (ou, mais recentemente, múltiplos eventos) tem sido usada para explicar a patogênese da DHGNA e a possível progressão para EHNA e cirrose. Na presença de resistência à insulina, as células musculares e adiposas oxidam os lipídios, resultando em aumento dos ácidos graxos livres (AGL), que podem ser incorporados aos triglicérides no fígado, levando à esteatose, que representa o primeiro evento. Na presença de esteatose, a ativação de uma cascata inflamatória associada a uma interação complexa (por exemplo, múltiplos eventos posteriores) entre hepatócitos, células estreladas, adipócitos e células de Kupffer resulta em progressão para apoptose/necrose (EHNA), fibrose e, conseqüentemente, cirrose(6). Em geral, a DHGNA resulta

da interação entre uma dieta não saudável, a microbiota intestinal, a presença de características metabólicas e fatores genéticos.

1.2 Resultados em longo prazo da DHGNA

Vários estudos relatam uma forte relação entre a DHGNA e doenças cardiovasculares. A DHGNA está significativamente associada a marcadores substitutos de doenças cardiovasculares, como aterosclerose,(7) e ao aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não fatais.(8) Esses resultados evidenciam que a DHGNA pode desempenhar um papel importante no processo complexo da aterosclerose. No entanto, ainda não está claro se a DHGNA está associada a doenças cardiovasculares por causa de fatores de risco compartilhados, ou se a doença pode contribuir de forma ativa para eventos cardiovasculares independentemente desses fatores. Em segundo lugar, ainda não se sabe se as doenças cardiovasculares representam um risco na esteatose simples ou se deve haver uma lesão hepática necroinflamatória (isto é, EHNA) para que o processo de aterosclerose seja desencadeado.

Dados publicados sobre mortalidade em longo prazo sugerem que a DHGNA está significativamente associada a maior risco de mortalidade geral. Além disso, as doenças cardiovasculares são uma das principais causas de morte nessa população. Apesar dessa forte associação, a relação exata entre a DHGNA e doenças cardiovasculares ainda não é clara. No entanto, uma hipótese é que existe uma via patogênica comum compartilhada, criada por um ambiente pró-inflamatório perpetuado por características metabólicas, principalmente obesidade e diabetes.(9) Outros estudos prospectivos devem ser conduzidos para estabelecer a real relação entre a morte por doenças cardiovasculares e a presença de características de lesão hepática.(10) Por outro lado, em um grande estudo recente da DHGNA comprovada por biópsia, com acompanhamento de longo prazo, a presença de EHNA não aumentou o risco de morbidade específica do fígado ou mortalidade geral. O estágio da fibrose foi o preditor mais robusto dos resultados específicos do fígado e da mortalidade geral, mesmo após o ajuste pelos fatores de confusão.(11) Esses resultados sugerem que a identificação de fibrose/cirrose avançada deve ser mais importante que o diagnóstico de EHNA para prever a mortalidade geral ou complicações relacionadas ao fígado em pacientes com DHGNA.

Pacientes com DHGNA/EHNA correm risco de desenvolver carcinoma hepatocelular (CHC).(12) Estima-se que pacientes com DHGNA com fibrose/cirrose avançada (METAVIR F3/F4) têm risco até sete vezes maior de desenvolver CHC do que aqueles sem doença hepática.(13) Além disso, as evidências sugerem que o CHC pode se desenvolver em pacientes com DHGNA sem fibrose em ponte. Atualmente, a DHGNA/EHNA é a principal causa de

transplante de fígado. A maioria dos pacientes com infecção crônica pelo HCV está sendo curada com agentes antivirais de ação direta (AADs) e, portanto, menos pacientes evoluem para cirrose e doença hepática terminal. Portanto, a proporção de pacientes que receberam ou estão na lista de espera para receber transplante de fígado para EHNA está aumentando.(14) Na última década, o número de novos pacientes com EHNA inscritos na lista de espera para transplante de fígado aumentou 170%.(15)

Em suma, a prevalência/incidência de DHGNA está aumentando rapidamente nas últimas décadas, fazendo com que essa doença se torne uma das doenças hepáticas associadas à cirrose e ao CHC mais frequentes, bem como uma indicação para transplante de fígado. Os dados publicados sugerem que a DHGNA está fortemente associada ao diabetes tipo 2 e à obesidade e que os pacientes que apresentam essas comorbidades têm maior risco de obter resultados graves, como complicações relacionadas ao fígado e mortalidade. Esses dados também são cruciais para o desenvolvimento de estratégias de tratamento voltadas para a população cujo risco de apresentar resultados adversos na DHGNA é maior. O rastreamento de rotina da DHGNA não está incluído nas diretrizes atuais, e a identificação de esteatose hepática pode ser usada para estratificar indivíduos com alto risco de fibrose em ponte ou cirrose.(12)

1.3 Diagnóstico de DHGNA/EHNA e estágio de fibrose

Como a DHGNA é caracterizada pelo acúmulo anormal de gordura nos hepatócitos, ela pode ser diagnosticada por exames de imagem do fígado. A esteatose hepática pode ser detectada com base na ecogenicidade do parênquima hepático ou na atenuação das ondas ultrassônicas que leva à perda de definição do diafragma e ao borramento das margens vasculares.(16) O valor diagnóstico da ultrassonografia para detecção de esteatose hepática foi validado [0,93 (IC 95% 0,91-0,95)] em uma metanálise (n = 2.815 participantes) com 34 estudos que utilizaram a biópsia hepática como referência.(17) No entanto, a variabilidade entre observadores desse método é considerável e a sensibilidade pode ser reduzida na presença de menos de 30% de infiltração de gordura.(18) As diretrizes internacionais atuais mencionam a espectroscopia por ressonância magnética (ERM) como o padrão-ouro para avaliação da esteatose hepática.(3) No entanto, o uso da ERM não é viável quando os recursos são limitados, pois é cara e não está amplamente disponível.(19)

A biópsia hepática tem sido usada como padrão-ouro para o diagnóstico de EHNA e de fibrose hepática. A presença de EHNA é determinada de acordo com o sistema de pontuação da

NASH Clinical Research Network (NASH-CRN) e com o escore de atividade da DHGNA (NAS). A esteatose hepática é classificada em três graus, com base na proporção de hepatócitos repletos de gordura: leve (5%–32% dos hepatócitos), moderada (33%–66% dos hepatócitos) ou grave (>66% dos hepatócitos); já a fibrose é classificada em estágios (estágio 0 = ausência de fibrose; 1 = fibrose perissinusoidal ou periportal; 2 = fibrose perissinusoidal e portal/periportal; 3 = fibrose em ponte; 4 = cirrose), de acordo com os critérios de Kleiner e Brunt.(20) No entanto, a biópsia hepática é um método invasivo que tem sido contestado por sua viabilidade limitada e possíveis eventos adversos.(21) Além disso, é um procedimento caro, com baixa aceitação dos pacientes, especialmente se for necessária uma nova biópsia hepática e um fragmento de biópsia clássico representar apenas 1/50.000 do fígado.(22)

Métodos não invasivos, como técnicas de imagem e biomarcadores sorológicos, foram desenvolvidos e validados na última década. A elastografia hepática transitória (EHT) por FibroScan® (EchoSens, Paris, França) é um método não invasivo para avaliação da esteatose hepática e da fibrose por meio da medição do parâmetro de atenuação controlada (CAP)(23) e da medição da rigidez hepática (LSM),(24) respectivamente. Um transdutor ultrassônico é acoplado ao eixo de um vibrador que transmite vibrações de baixa amplitude e baixa frequência (50 Hz), induzindo ondas de cisalhamento elásticas que se propagam através do tecido hepático. A esteatose hepática é avaliada com base na atenuação das ondas de cisalhamento e a fibrose hepática está correlacionada com a rigidez hepática (quanto mais rígido o tecido, mais rapidamente a onda de cisalhamento se propaga no fígado). O exame é indolor, rápido (menos de 5 minutos) e facilmente realizado em um paciente, de preferência, em jejum, posicionado em decúbito dorsal e com o braço direito em abdução máxima.(24) Resumidamente, a sonda é posicionada em um espaço intercostal ao nível do lobo hepático direito e o operador, auxiliado por uma imagem no modo time-motion, localiza uma porção do fígado livre de grandes estruturas vasculares, na qual as medidas podem ser obtidas. Os resultados finais são expressos como a mediana de 10 medidas válidas. A elastografia hepática transitória é considerada confiável quando os seguintes critérios são atendidos: (i) 10 medições bem-sucedidas; (ii) uma amplitude interquartil (IQR) inferior a 30% do valor mediano da LSM para fibrose e da CAP para esteatose; e (iii) uma taxa de sucesso superior a 60%. A falha de LSM ou CAP é definida pela ausência de medições válidas durante o exame de elastografia hepática transitória. Modelos preditivos que usam parâmetros sanguíneos simples e medidas antropométricas têm sido propostos como alternativa para o diagnóstico de DHGNA e/ou fibrose avançada (METAVIR $F \geq 3$). O valor diagnóstico do índice de gordura hepática (FLI),(25) do índice de esteatose hepática (HSI),(26) do escore de gordura hepática na DHGNA (NAFLD-LFS)(27) e do Steato-ELSA(28) foi validado na população geral. Além disso, o índice de relação aspartato aminotransferase sobre plaquetas

(APRI),(29) o escore Fibrosis-4 (FIB-4)(30) e o escore de fibrose na DHGNA (NFS) (31)são os modelos preditivos para o diagnóstico de fibrose avançada mais validados em pacientes com hepatopatias crônicas. A vantagem dos exames sorológicos reside na combinação de parâmetros demográficos e laboratoriais para identificar a presença de gordura no fígado a baixo custo.

1.4 HIV e comorbidades: A epidemia de DHGNA

Embora a epidemia global de AIDS afete mais de 40 milhões de pessoas em todo o mundo, o advento das terapias antirretrovirais (TARV) possibilita o aumento da expectativa de vida de pessoas infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1).(32) Nos países desenvolvidos, esse ganho na sobrevida resultou no envelhecimento da população infectada pelo HIV.(33–35) Essa evolução mudou os padrões de morbimortalidade das doenças definidoras da AIDS para doenças associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, distúrbios metabólicos e declínio cognitivo.(36–39)No entanto, os pacientes infectados pelo HIV que fazem uso de terapia supressora continuam correndo maior risco de morbidade geral e, talvez, mortalidade não relacionada à AIDS do que os adultos não infectados pelo HIV com a mesma idade.(40) Vários fatores contribuem para o risco excessivo desses eventos não relacionados à AIDS, incluindo a toxicidade dos medicamentos antirretrovirais, a alta prevalência de fatores de risco tradicionais (como abuso de substâncias, obesidade e hipertensão), inflamação e disfunção do sistema imunológico.(40)

Em estudos com a população brasileira infectada pelo HIV, tendências semelhantes de comorbidades não relacionadas ao HIV são cada vez mais relatadas como a causa de morte a uma taxa mais alta do que em indivíduos sem infecção pelo HIV. Além disso, esses estudos indicaram que os dados disponíveis sobre a prevalência e interações de doenças não transmissíveis em pacientes com HIV nos países da América Latina são limitados.(41–44)

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é a principal manifestação de doença hepática nos países ocidentais, afetando quase 30% da população em geral.(45,46) Estimativas de prevalência da DHGNA de 30% na América do Sul e 18%–35% no Brasil foram documentadas.(47,48) Apesar do aumento da prevalência de DHGNA, a etiologia da doença não é totalmente compreendida. Na população infectada pelo HIV, as doenças hepáticas são responsáveis por até 13% das mortes, de acordo com o estudo de coorte multicêntrico Data Collection on Adverse Events of Anti-HIV Drugs (D:A:D) realizado entre 1999 e 2011.(49) A DHGNA é cada vez mais relatada como manifestação de doença hepática nessa população.(50–53) Há aumentos relativos previstos na proporção de doenças hepáticas relacionadas à DHGNA

em comparação com as hepatites B e C em PVHS ao longo dos próximos anos, devido a avanços significativos no tratamento dessas hepatites virais.(54)

A DHGNA é a manifestação hepática de síndrome metabólica que varia de esteatose simples a esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), histologicamente caracterizada por lesão hepatocitária, inflamação e estágios variáveis de fibrose, podendo evoluir para cirrose.(55,56)Cerca de 25% dos pacientes evoluem para inflamação e fibrose hepática, levando à cirrose e suas complicações.(1) Os dados publicados revelam aumento da mortalidade em pacientes com DHGNA em comparação com a população geral.(57–60)

Em geral, a prevalência de DHGNA é maior em indivíduos com infecção pelo HIV (30%–40%) do que na população geral. (46–48,50) Vodkin et al. estudaram as diferenças entre a DHGNA associada ao HIV e a DHGNA primária e constataram que os pacientes com DHGNA associada ao HIV apresentam lesão hepática mais grave do que os pacientes não infectados pelo HIV, apesar de ambos os grupos de apresentarem características semelhantes.(61) Alguns relatos indicam prevalência de até 50% em indivíduos monoinfectados pelo HIV sem causas secundárias, como consumo excessivo de álcool e hepatite B ou C viral,(50,62) sugerindo que, na ausência dessas causas secundárias, o HIV isolado poderia levar ao espectro da DHGNA. Em uma coorte soropositiva para o HIV constatou-se prevalência de até 55%.(63)

Embora existam fatores de risco metabólicos comuns, como obesidade e diabetes tipo 2, suspeita-se que haja outros fatores associados às taxas mais altas de DHGNA em pacientes infectados pelo HIV, como o uso de TARV e, possivelmente, fatores associados à disbiose intestinal. Especificamente, o uso de TARV pode prejudicar o controle da glicose e o metabolismo lipídico, afetar a redistribuição da gordura corporal e causar resistência à insulina e toxicidade mitocondrial.(47) Os inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeo (ITRN) estão associados à toxicidade mitocondrial. São necessárias estratégias de diagnóstico mais fáceis e melhor compreensão da patogênese da DHGNA, especialmente na população infectada pelo HIV que está envelhecendo.

Carga da doença hepática gordurosa não alcoólica em pessoas com HIV/AIDS

Após a infecção pelo HIV, ocorre uma rápida depleção de células T CD4+, estimulando a desestabilização da integridade imunológica e estrutural da barreira epitelial. Isso resulta em translocação microbiana, inflamação local, fibrose e, talvez, disbiose. À medida que esses produtos microbianos atingem o fígado, podem contribuir para a disfunção hepática. Foi demonstrado que, após a fase aguda da infecção, a depleção de células T CD4 na mucosa intestinal continua presente durante a fase crônica em uma extensão muito maior do que no sangue

periférico e nos linfonodos. Conseqüentemente, ocorre o comprometimento da estrutura e da função do sistema imunológico e da barreira mucosa do intestino, o que leva à translocação microbiana sustentada.(64)

A infecção pelo HIV danifica os tecidos linfoides e as mucosas, causando problemas como imunodeficiência e inflamação. Essas alterações no GALT e subseqüentes alterações no microbioma intestinal tornam a comunidade bacteriana desequilibrada e menos diversa. Essa disbiose resulta em aumento da translocação microbiana, seguido pelo aumento do estado de inflamação sistêmica que resulta em doença de órgão-alvo,(64) como doenças cardiovasculares e hepáticas, além de sintomas de envelhecimento prematuro.

O que explica o alto risco de DHGNA em pessoas infectadas pelo HIV?

Em PVHS usuárias de terapia antirretroviral (TARV), o risco de desenvolver DHGNA está associado à infecção pelo HIV em si e a fatores relacionados ao tratamento do HIV. Embora existam mecanismos claramente descritos pelos quais cada um dos fatores de predisposição pode levar à DHGNA de forma independente, a doença e/ou sua progressão podem ser o resultado de um único fator de risco ou o efeito combinado desses fatores.(65) Por exemplo, embora a TARV tenha sido associada a hepatotoxicidade e complicações metabólicas, como dislipidemia ou resistência à insulina, há evidências de que a própria infecção pelo HIV pode levar a essas complicações, e cada um desses fatores é capaz de contribuir de forma independente para o acúmulo de gordura no parênquima hepático, considerado como DHGNA simples (esteatose).(50,65) Apesar disso, ainda existem evidências conflitantes sobre a associação entre a infecção pelo HIV e a DHGNA. Um grande estudo de caso-controle de autoria de Judge et al. demonstrou que, embora a DHGNA fosse realmente uma causa importante de alterações nas provas de função hepática em pessoas infectadas pelo HIV, a doença está associada a fatores metabólicos, e não a fatores relacionados ao HIV.(62) Separadamente, uma análise de Maurice et al demonstrou que, em pessoas mono infectadas, é a síndrome metabólica que está associada à DHGNA em PVHS.(66,67)

Como o HIV influencia a história natural da DHGNA

O acúmulo de gordura na DHGNA simples resulta em inflamação do parênquima hepático, circunstância em que é considerada esteato-hepatite não alcoólica (EHNA).(50) A inflamação é mediada por citocinas, especialmente, interleucina-6 e fator de necrose tumoral

alfa.(68) Na infecção pelo HIV, ocorre desregulação da barreira imune da mucosa devido à perda do tecido linfóide associado ao intestino.(69) A restauração desse tecido perdido leva um longo período de tempo, resultando em comprometimento da barreira da mucosa intestinal. Da mesma forma, as células CD4+ que sofreram depleção secundária à infecção pelo HIV resultam em aumento do dano da mucosa e da translocação bacteriana do intestino.(70) Esses fatores, juntamente com a ativação imune persistente resultante da infecção pelo HIV, contribuem para a inflamação hepática e, conseqüentemente, a fibrose/EHNA. Por outro lado, a disfunção mitocondrial induzida pela TARV (especificamente os ITRNs)(52) e o envelhecimento acelerado(71,72) também promovem inflamação hepática. No entanto, um achado controverso em um recente estudo de coorte prospectivo de Maurice et al. foi que a resistência à insulina, e não a translocação bacteriana, estava associada à DHGNA em pessoas mono infectadas pelo HIV.(73) Em vista desses resultados contrastantes sobre o papel da microbiota intestinal e da translocação bacteriana na ocorrência e progressão da DHGNA, mais investigações envolvendo populações cuidadosamente selecionadas devem ser conduzidas para elucidar todos os mecanismos subjacentes à progressão da DHGNA na infecção pelo HIV.

Pesquisas detalhadas sobre fatores preditores de progressão da esteatose para os vários estágios avançados do espectro da DHGNA podem orientar o desenvolvimento e o aprimoramento de terapias para DHGNA em PVHS e, possivelmente, na população geral. A alteração do perfil lipídico que precede o início da esteatose parece desempenhar um papel importante na patogênese da DHGNA em PVHS. Isso ilustra ainda que a DHGNA em PVHS pode ser mais complexa do que se considerava até o momento e talvez haja vias do metabolismo lipídico envolvidas na patogênese da doença que ainda não foram totalmente exploradas quanto à eficácia da farmacoterapia. Além disso, há outro desafio importante, pois os estudos genéticos sobre a influência de genes específicos na ocorrência de DHGNA parecem ser inconclusivos.

1.5 Microbioma e a relação com a DHGNA

Acredita-se que a patogênese da DHGNA envolva interações complexas entre variantes relacionadas à suscetibilidade genética, fatores ambientais, resistência à insulina e alterações na microbiota intestinal. A interação entre esses fatores resulta em alteração do metabolismo lipídico e acúmulo excessivo de lipídios nos hepatócitos, culminando no desenvolvimento de DHGNA. No entanto, a disbiose microbiana foi identificada como um fator desencadeante importante em vários estudos.(74–77)

Com aproximadamente 10^{14} bactérias, o intestino abriga uma população microbiana densa e diversificada. Embora imaginemos frequentemente que nosso microbioma está associado à saúde

intestinal, ele também desempenha um papel fundamental em todo o sistema imunológico. Como a microbiota intestinal parece contribuir para quase todos os aspectos de nosso crescimento e desenvolvimento, não é de surpreender que várias doenças e disfunções estejam associadas a um desequilíbrio em sua composição, número ou habitat. A disbiose intestinal pode resultar em alterações na sensibilidade à insulina e quebra da barreira intestinal. Por sua vez, as alterações podem provocar aumento da resposta inflamatória, translocação bacteriana e subsequente inflamação intestinal e hepática.

Quase 70% do suprimento sanguíneo do fígado são fornecidos pelo fluxo venoso intestinal, tornando o fígado o principal mecanismo de defesa contra antígenos, toxinas e microrganismos derivados do intestino.(78,79)A microbiota intestinal está envolvida na permeabilidade intestinal, inflamação de baixo grau e equilíbrio imunológico. Também está envolvida, especificamente, na regulação do metabolismo e extração de energia.(80) Em segundo lugar, a microbiota intestinal tem uma relação coevolucionária com o sistema imunológico e observa-se comprometimento da função imunológica durante a progressão da DHGNA.(81,82) Ao influenciar a produção de hormônios intestinais, como o peptídeo 1 semelhante ao glucagon, a microbiota intestinal afeta o metabolismo geral do hospedeiro, inclusive influenciando o desenvolvimento de inflamação hepática.(83) Além disso, os subprodutos metabólicos de bactérias do cólon, como etanol endógeno e outras endotoxinas, demonstraram ter efeitos tóxicos após a absorção e transporte ao fígado, incluindo indução de esteatose hepática e esteato-hepatite.(84,85) Todos esses fatores são mecanismos moleculares pelos quais a microbiota pode induzir a DHGNA ou sua progressão para esteato-hepatite não alcoólica.

Microbiota gastrointestinal, translocação microbiana e ativação imune

A disbiose, isto é, desequilíbrio da microbiota intestinal normal, pode resultar de uma ampla gama de fatores ambientais, imunológicos ou do hospedeiro, bem como de alterações no fluxo biliar, pH gástrico ou dismotilidade intestinal. As primeiras evidências que associam a disbiose intestinal à lesão hepática vieram de estudos descritivos em seres humanos que demonstraram uma relação entre a EHNA e o crescimento excessivo de bactérias no intestino delgado.(86)

Nos últimos anos, começamos a perceber que o corpo humano é colonizado por comunidades microbianas. Como a microbiota intestinal parece contribuir para quase todos os aspectos de nosso crescimento e desenvolvimento, não é de surpreender que várias doenças e disfunções estejam associadas a um desequilíbrio em sua composição, número ou habitat. Embora o papel da microbiota intestinal na saúde geral esteja sendo cada vez mais reconhecido, ainda são necessárias

mais informações sobre a função da microbiota intestinal e da barreira mucosa e o desenvolvimento da DHGNA.

Em modelos animais, essas comunidades microbianas são agentes cruciais na modulação das respostas imunes, no metabolismo e na integridade epitelial. Na DHGNA, o aumento de lipopolissacarídeos bacterianos no sangue é uma observação comum, que foi recentemente atribuída a uma perda da função da barreira intestinal e subsequente permeação de bactérias na corrente sanguínea.(87) Esse achado é consistente com uma pesquisa em camundongos, que forneceu evidências de uma ligação entre hábitos alimentares, a microbiota intestinal e o desenvolvimento de DHGNA.(88) Os camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura desenvolveram microbiota rica em *Proteobacteria*, com níveis reduzidos de *Bacteroidetes* e níveis elevados de *Firmicutes*, em comparação com os camundongos alimentados com a dieta controle. Esses perfis microbianos foram previamente associados ao fenótipo obeso em camundongos e em humanos.(89) Os camundongos do grupo de dieta rica em gordura apresentaram aumento da permeação de bactérias através da barreira intestinal e taxas mais altas de danos hepáticos. Os achados foram atribuídos ao aumento da produção de endotoxinas por *Proteobacteria* no grupo de dieta rica em gordura.(88) Esses achados também foram confirmados em estudos em humanos, nos quais pacientes com DHGNA tiveram aumento da abundância de *Proteobacteria*, *Enterobacteriaceae*, *Lachnospiraceae* e *Escherichia*.(90)

Há evidências crescentes de que o intestino e o fígado têm vários níveis de interdependência associada, e os distúrbios no eixo intestino-fígado estão envolvidos em várias doenças relacionadas à obesidade, inclusive DHGNA.(91) As evidências incluem a observação de que a permeabilidade intestinal aumenta em pacientes com DHGNA em comparação a indivíduos sem a doença,(92) a associação de doença hepática com alterações na microbiota bacteriana e os efeitos da manipulação da microbiota na lesão hepática.

A extensão da translocação microbiana e a ativação imune associada podem ser amplamente determinadas pela composição das bactérias intestinais. Estudos em camundongos e humanos demonstraram que a microbiota intestinal é uma comunidade complexa e dinâmica que é desequilibrada em estados patológicos, como obesidade, doença inflamatória intestinal e infecção pelo HIV. Esses organismos desempenham um papel crítico não apenas na manutenção da integridade intestinal, mas também na modulação das respostas imunes sistêmicas aos patógenos. Um aspecto crítico da compreensão da patogênese do HIV e da formulação de novas estratégias de tratamento envolve a avaliação completa da relação entre replicação viral, fibrose intestinal e translocação microbiana.

Estudos clínicos

Os estudos em humanos sugerem os pacientes com DHGNA apresentam microambiente intestinal disbiótico.(93) A maioria dos estudos já realizados se concentrou na identificação de diferenças na composição da comunidade bacteriana entre indivíduos saudáveis e pacientes com DHGNA. Michail et al.(94) descreveram alterações microbianas em pacientes pediátricos obesos com DHGNA, em comparação a crianças obesas sem DHGNA e crianças magras saudáveis. A caracterização taxonômica das bactérias nas fezes desses participantes de pesquisa foi feita por meio da análise do gene 16s rRNA, utilizando uma abordagem de análise de microarranjos. As crianças com DHGNA tiveram uma representação mais alta de Gammaproteobacteria e Epsilonproteobacteria do que as crianças magras e obesas saudáveis.(94) Em relação ao gênero, as crianças com DHGNA apresentaram maior presença de *Prevotella* em comparação com os controles saudáveis.

A análise metagenômica por sequenciamento por shotgun sugeriu que, em comparação aos participantes de pesquisa saudáveis, as crianças com DHGNA tinham um número maior de vias envolvidas no metabolismo energético e na síntese lipídica, possivelmente indicando um microbioma com capacidade de metabolismo energético mais eficiente em pacientes com DHGNA. Essa constatação foi ainda validada por meio de uma análise metaproteômica que identificou proteínas envolvidas no metabolismo energético (por exemplo, aldeído desidrogenase dependente de NAD) que foram altamente expressas em pacientes com DHGNA.(94)

Um estudo de Loomba et al. reforçou a possibilidade de a microbiota intestinal desempenhar um papel na patogênese da DHGNA.(74) Nesse estudo, a fibrose avançada foi caracterizada por aumento da abundância de Proteobacteria e *E.coli* e diminuição de Firmicutes, corroborando a noção de que um perfil de marcadores de microbioma poderia ser usado para diagnosticar fibrose avançada na DHGNA. Outro estudo que avaliou a microbiota intestinal versus DHGNA comprovada por histologia demonstrou que a gravidade da doença hepática na DHGNA pode se correlacionar com os padrões do microbioma.(95)

Mecanismo

O fígado desempenha um papel crucial nonexo das interações microrganismo-hospedeiro, porque é o primeiro órgão a drenar o intestino através da veia porta. O sangue proveniente da veia porta, além de nutrientes, contém outras moléculas que passam, de forma ativa ou passiva, do

intestino para o sangue. Por essa razão, o fígado é um dos órgãos mais expostos a bactérias intestinais e produtos derivados de bactérias. Foi demonstrado que os distúrbios no eixo intestino-fígado desempenham um papel fundamental na patogênese da DHGNA. Esses distúrbios incluem quebra da barreira intestinal, translocação bacteriana e resposta inflamatória no fígado, como sinalização de receptores do tipo Toll (TLR) e ativação do inflamassoma e alterações na composição dos produtos bacterianos.(87)

Metabólitos

Os metabólitos produzidos, degradados ou modulados pelas bactérias comensais do intestino são considerados componentes centrais das redes de comunicação entre o hospedeiro e a microbiota.(90,96) Consequentemente, os metabólitos bacterianos podem contribuir para o desenvolvimento e a progressão da doença, conforme demonstrado em vários modelos de doenças, como colite(97) e distúrbios relacionados à síndrome metabólica.(98)

Ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs)

Os AGCCs, como o ácido acético, propiônico e butírico, são os principais produtos da fermentação de carboidratos pelos microrganismos intestinais.(99) Os efeitos são mediados pela ligação aos receptores acoplados à proteína G, expressos no sistema imunológico e nas células endócrinas do intestino e adipócitos. O tipo e a quantidade de AGCCs sintetizados no intestino são alterados pela quantidade de carboidratos consumidos e pela disbiose, e existem vários mecanismos pelos quais podem contribuir para a progressão da DHGNA.(75) A ativação da sinalização de GPR43 pelo ácido graxo de cadeia curta no tecido adiposo promove o gasto de energia e inibe o acúmulo de gordura no tecido adiposo e no fígado.(100)

Colina

O efeito da deficiência de colina no desenvolvimento de DHGNA e EHNA foi bem estabelecido e corroborado pelo fato de que a dieta deficiente em colina é um modelo murino de EHNA comumente usado.(101) A dieta fornece cerca de 70% de colina, enquanto o restante é sintetizado pelo organismo. A quantidade de colina disponível depende de sua quantidade na dieta e de seu metabolismo no intestino pela microbiota, que também é regulada pelos níveis de colina. Bactérias comensais, por exemplo, *E. coli* e *Desulfovibrio desulfuricans*, podem converter colina

em metilaminas como trimetilamina (TMA), dimetilamina (DMA) e monometilamina.(102)

Fermentação alcoólica por microrganismos

O álcool exacerba o estresse oxidativo e a inflamação hepática. A microbiota abriga genes que podem fermentar açúcares da dieta transformando-os em etanol, que pode então entrar na corrente sanguínea. A quantidade de álcool produzida depende da disponibilidade de carboidratos da dieta e é elevada em camundongos obesos.(103) Em crianças com EHNA e adultos com DHGNA, há significativamente mais bactérias associadas ao aumento dos níveis de álcool no sangue do que em crianças obesas sem EHNA. (102,103)

Fenilacetato

Recentemente, foi sugerido que o metabólito de origem microbiana da fenilalanina, fenilacetato, é regulado positivamente no sangue de mulheres com EHNA.(106) Os níveis sanguíneos dessa molécula têm maior poder preditivo da doença do que o diagnóstico convencional. A microbiota de pacientes com EHNA é enriquecida com genes para o metabolismo da fenilalanina em fenilacetato, o que possivelmente sugere envolvimento na geração dessa molécula associada ao EHNA.

Bile

As enzimas microbianas intestinais podem transformar os ácidos biliares primários em ácidos biliares conjugados, facilitando a digestão e a absorção de gorduras da dieta pela formação de micelas. Além de ajudar na digestão, os ácidos biliares podem atuar como moléculas sinalizadoras. Recentemente, demonstrou-se que a metformina afeta a microbiota intestinal, diminuindo as concentrações de *B. fragilis* e, paralelamente, aumentando as concentrações de ácido glicoursodesoxicólico (GUDCA) no ácido biliar de murinos, o que resulta em inibição da ativação de FXR intestinal e respectivos benefícios metabólicos.(107)

Quebra da barreira intestinal

O epitélio intestinal saudável forma uma barreira física hermeticamente fechada que separa o hospedeiro do conteúdo intestinal. As junções de oclusão são um dos reguladores fisiopatológicos mais importantes da permeabilidade intestinal. Sob condições fisiológicas, as proteínas das junções de oclusão, como a zônula de oclusão, aderem as células epiteliais adjacentes umas às outras nas regiões apicais e impedem a entrada de bactérias na mucosa intestinal e na corrente sanguínea.(108) Estão surgindo novas evidências de que a barreira intestinal de pacientes com DHGNA é disfuncional.(109) Uma metanálise baseada em cinco estudos clínicos revela que pacientes com DHGNA e EHNA têm maior probabilidade de apresentar alterações da permeabilidade intestinal em comparação a controles saudáveis. A associação com o aumento da permeabilidade intestinal é mais forte, principalmente em pacientes com EHNA, demonstrando que esse aumento pode ser responsável pelas alterações inflamatórias observadas nessa doença.(109)

No nível molecular, nos pacientes com DHGNA a expressão de zônula de oclusão-1 (ZO-1) e molécula de adesão juncional A é reduzida. (108,109) No entanto, a ocorrência concomitante de DHGNA/EHNA e quebra da barreira epitelial intestinal não evidenciam a relação causal. Se a alteração da permeabilidade intestinal é uma causa ou consequência da DHGNA é uma questão intrigante, que permanece sem resposta até o momento.

Via inflamatória

Sabe-se que muitas bactérias expressam lipopolissacarídeo (LPS) na superfície celular. O LPS é reconhecido pelo receptor de reconhecimento de padrões específico, chamado receptor do tipo Toll 4 (TLR4) e seus correceptores, a proteína de ligação ao LPS (LBP) e CD14. A ativação do TLR4 desencadeia a cascata inflamatória a jusante, que envolve, dependendo do contexto, ativação de NF-KB, AP-1 e IRF3.(112,113) Camundongos com deficiência de TLR4 apresentam redução da lesão hepática, da inflamação e do acúmulo de lipídios em comparação a camundongos do tipo selvagem em modelos de DHGNA induzida por uma dieta rica em frutose ou dieta deficiente de metionina e colina (MCD),(114) o que sugere a influência do TLR4 na indução da inflamação na DHGNA.

Esforços baseados em microbioma para o tratamento da DHGNA

As abordagens terapêuticas para pacientes com DHGNA geralmente envolvem modificações significativas no estilo de vida, como recomendações para aprimorar o exercício

físico e fazer mudanças na alimentação. Outros tratamentos incluem medicamentos anti-inflamatórios, antioxidantes, agentes hipolipemiantes e sensibilizadores de insulina, além de suplementos como vitaminas. Recentemente, as atenções voltaram-se ao desenvolvimento de tratamentos direcionados ao microbioma em pacientes com DHGNA. A manipulação do microbioma é mais comumente feita com antibióticos, prebióticos, probióticos e transplante de microbiota fecal (FMT). Notavelmente, alguns estudos clínicos que avaliam o tratamento de pacientes com EHNA com FMT estão atualmente em andamento (NCT02469272 e NTR4339).

Probióticos, prebióticos e simbióticos

As estratégias para alterar favoravelmente a microbiota intestinal por meio de “bacterioterapia” incluem o uso de prebióticos não digeríveis, probióticos e simbióticos. A administração de VSL#3 (VSL Pharmaceuticals Inc., Maryland, EUA), uma mistura de oito cepas probióticas, por 4 meses a crianças com obesidade melhorou o quadro da DHGNA, conforme a diminuição da esteatose observada pela ultrassonografia e de acordo com o IMC. Um possível mecanismo de ação dessa preparação pode ser o aumento dos níveis circulantes de GLP-1,(115) O GLP-1 tem muitas funções, como a estimulação da secreção de insulina dependente de glicose, inibição da secreção pós-prandial de glucagon, atraso no esvaziamento gástrico, aumento da saciedade e indução da proliferação de células beta pancreáticas.(116,117)

Em pacientes adultos com DHGNA, o tratamento com *Bifidobacterium longum* e frutooligosacarídeos associado à mudança do estilo de vida reduziu acentuadamente os níveis de TNF, proteína C reativa, AST sérica, HOMA-IR e endotoxina sérica, a esteatose e o índice de atividade da EHNA após 24 semanas em comparação com a mudança do estilo de vida sozinha.(118) Em outro estudo, 20 pacientes adultos com EHNA comprovada por histologia foram alocados aleatoriamente para receber uma fórmula probiótica contendo *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium bifidum*. Os pacientes que receberam essa fórmula apresentaram redução dos níveis intra-hepáticos de triglicérides (de acordo com a espectroscopia por ressonância magnética de prótons) e melhora dos níveis de ALT.(119) Nos estudos sobre diabetes, verificou-se que os prebióticos reduziram os níveis plasmáticos de colesterol e triglicérides e aumentaram as concentrações de HDL. A suplementação com simbióticos também demonstrou reduzir os níveis plasmáticos de insulina e triglicérides em jejum em pacientes com diabetes.(120)

As evidências que corroboram o papel central do microbioma em doenças humanas, como a obesidade e distúrbios relacionados, incluindo DHGNA e síndrome metabólica, estão

aumentando. Embora grande parte do trabalho anterior tenha sido descrita em modelos animais, a maioria das evidências clínicas se baseia em estudos de associação, e não de intervenção. É cada vez mais claro que os efeitos metabólicos da disbiose são de importância central e que o estudo do efeito do microbioma intestinal e da doença pode fornecer informações adicionais.

1.6 Infecção pelo HIV e o microbioma intestinal

A imunidade da mucosa no revestimento epitelial do intestino é importante para a homeostase metabólica do organismo. À medida que a imunidade associada ao intestino se torna desequilibrada durante a infecção pelo HIV, a disbiose microbiana e o metabolismo do hospedeiro são afetados.

Introdução

O maior reservatório de linfócitos no organismo é o tecido linfoide associado ao intestino (GALT).(121,122) Durante a fase aguda da infecção pelo HIV-1, ocorre uma perda substancial de células T CD4 de memória no GALT. Essa perda é mediada pela considerável depleção direta induzida por vírus de células T CCR5+ e/ou células T CD4 conjugada à integrina $\alpha 4\beta 7$. (121–123) O resultado dessa interrupção durante a fase aguda é fibrose intestinal e translocação de produtos microbianos através da mucosa intestinal para a circulação periférica. Esse processo é evidenciado por altos níveis plasmáticos de lipopolissacarídeo (LPS); outros marcadores da translocação microbiana(126–128) coincidem com a ativação das células T e com a redução de células T CD4 em indivíduos infectados pelo HIV. A depleção das células T CD4+ do GALT causa mudanças significativas no intestino, que estimulam a translocação bacteriana, aumentam o fluxo de células inflamatórias para o trato GI e promovem a ativação imune crônica.(126,129,130)

Foi demonstrado que, após a fase aguda da infecção, a depleção de células T CD4 na mucosa intestinal continua presente durante a fase crônica em uma extensão muito maior do que no sangue periférico e nos linfonodos. Conseqüentemente, ocorre o comprometimento da estrutura e da função do sistema imunológico e da barreira mucosa do intestino, o que leva à translocação microbiana sustentada.(64) A ativação imune crônica e a inflamação desencadeadas pela combinação de replicação viral contínua e translocação microbiana ocorrem e persistem, apesar da TARV. Durante a TARV, a ativação de células T periféricas diminui, mas não retorna a níveis comparáveis aos de indivíduos não infectados pelo HIV.(131) É importante notar que a

ativação das células T no GALT não é tão afetada pelo uso da TARV. Como resultado, observa-se inflamação crônica da mucosa intestinal.(132)

A infecção crônica pelo HIV envolve a ativação imune progressiva de linfócitos T CD4 e CD8 e de monócitos/macrófagos,(133–135) associada com a depleção gradual de células T CD4 naíve e de memória periféricas, resultando na síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS). De muitas maneiras, a fase crônica é um distúrbio inflamatório com níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias e aumento da frequência de leucócitos ativados que estão associados, mais do que a carga viral, à patogênese do HIV e à progressão da doença. A ativação imune sistêmica crônica também promove a replicação viral, gerando um ciclo vicioso de viremia, ativação imune e redução de células T CD4. Foi proposto que a inflamação crônica resultante da translocação microbiana é um fator que contribui para o declínio das células T CD4 ao longo do tempo. A TARV combinada eficaz suprime rapidamente a viremia, restaura as células T CD4 periféricas, reduz a ativação linfocitária e restabelece muitas funções imunológicas. No entanto, a terapia não consegue restaurar totalmente as células T de memória no GALT nem reverter a translocação microbiana. Esses são fatores que contribuem para o desenvolvimento de comorbidades associadas ao HIV.

A infecção pelo HIV danifica os tecidos linfoides e as mucosas, causando problemas como imunodeficiência e inflamação. Essas alterações no GALT e subsequentes alterações no microbioma intestinal tornam a comunidade bacteriana desequilibrada e menos diversa. Essa disbiose resulta em aumento da translocação microbiana, seguido pelo aumento do estado de inflamação sistêmica que resulta em doença de órgão-alvo,(64) como doenças cardiovasculares e hepáticas, além de sintomas de envelhecimento prematuro. Os pacientes com HIV apresentam taxas mais altas de inflamação intestinal do que os indivíduos saudáveis. Como a homeostasia imunológica no intestino de pacientes infectados pelo HIV é alterada, espera-se que a microbiota intestinal desses pacientes também seja alterada. A inflamação causa rápida depleção da junção de oclusão do epitélio intestinal. O intestino permeável permite maior passagem de substâncias microbianas para a corrente sanguínea, seguida pelo aumento da inflamação sistêmica. A inflamação excessiva contribui para a disbiose microbiana e para o aumento da permeabilidade intestinal.(136,137) *Bacteroides fragilis*, a partir dos polissacarídeos, produz AGCCs, que induzem a produção de IL-10 e protegem contra a inflamação e aumentam a proporção de células T CD4+ de memória. *Lactobacillus acidophilus* produz lactato, vitamina B e vitamina K, que promovem a saúde, e também aumenta a população de células T CD4 + colônicas. *Bifidobacterium breve* está associado à produção de lactato, vitamina B e vitamina K. *Eubacterium rectale*, *Coprococcus eutactus* e *Blautia hydrogenotrophic* produzem butirato e

outros AGCCs que promovem a saúde do cólon. *Ruminococcus productus* produz oligossacarídeos solúveis, AGCCs que atuam na redução da pró-inflamação intestinal. Quando o microbioma está alterado na presença de infecção pelo HIV, a funcionalidade dessas bactérias é afetada.(69,138)

1.7 Microbioma do intestino humano

Microbioma intestinal e microbiota intestinal

O microbioma intestinal é definido como o material genético pertencente aos microrganismos que habitam o intestino.(139) A microbiota intestinal é um sistema complexo e variado de microrganismos, que inclui bactérias, fungos, arqueias, vírus e bacteriófagos.(139) Mais de 1000 espécies diferentes de bactérias foram detectadas na microbiota intestinal, sendo que mais de 90% delas pertencem aos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes*. A vasta composição de microrganismos no intestino contém cerca de 3,3 milhões de genes, tornando o microbioma intestinal 150 vezes maior que o genoma do hospedeiro humano.(140)

Métodos de estudo do microbioma

Apenas recentemente as metodologias para estudar a composição do microbioma intestinal foram ampliadas para além do uso de técnicas microscópicas rudimentares e agora é possível cultivar, observar e caracterizar o microbioma. As tecnologias avançadas de sequenciamento deram origem ao campo de estudo de microbiomas e facilitaram a caracterização de microrganismos intestinais até então ocultos.(141) Os dois principais métodos de sequenciamento avançado de microbiomas são o sequenciamento do gene 16S rRNA e o sequenciamento por shotgun.

Sequenciamento do gene 16S rRNA

O gene 16S rRNA codifica a pequena subunidade do ribossomo bacteriano, a organela responsável pela síntese de proteínas. Esse gene demora a evoluir, demonstrando altos níveis de conservação entre espécies bacterianas, ao mesmo tempo em que abriga regiões de diversificação genética no nível do filo(140).

.Isso o torna um candidato ideal para análises filogenéticas. O gene 16S rRNA é amplificado

por reação em cadeia da polimerase (PCR), usando iniciadores especificamente desenvolvidos para reconhecer todos os filotipos de bactérias, e, em seguida, sequenciado. As sequências obtidas para o gene 16S rRNA podem então ser comparadas a sequências de filotipos bacterianos conhecidos em um banco de dados.(140)

Sequenciamento por shotgun

O sequenciamento por shotgun não tem como alvo um gene específico, como o gene 16S rRNA. Em vez disso, essa técnica começa fragmentando aleatoriamente o microbioma. Os fragmentos aleatórios são sequenciados e as áreas de sobreposição são usadas para reconstruir o microbioma completo.(140,142) Além de determinar os filotipos e as espécies das bactérias presentes, a técnica de sequenciamento por shotgun fornece informações sobre genes específicos dos microrganismos. Como resultado, obtém-se uma imagem mais completa do microbioma, especificamente as diferenças na diversidade genética entre o microbioma de pessoas diferentes. O sequenciamento por shotgun costuma ser aceito como um método superior em comparação ao sequenciamento de 16S rRNA, no entanto, devido ao custo e às análises computacionais exaustivas necessárias para interpretar os dados, o uso de estudos de sequenciamento de 16S rRNA é usado com maior frequência.

Desenvolvimento da microbiota intestinal

A microbiota intestinal é um componente importante do desenvolvimento humano e agora vemos um crescente corpo de evidências que corroboram a hipótese de coevolução e codesenvolvimento de tecidos humanos e da microbiota. Acredita-se que a microbiota intestinal desempenhe um papel crucial para a educação do sistema imunológico de bebês, a proteção contra patógenos e o fornecimento de nutrientes para o desenvolvimento saudável.(143) A microbiota infantil está em constante mudança até os três anos de idade; após esse período, a microbiota torna-se mais estável e parecida com a de um adulto.(143) Acredita-se que essa transição seja estimulada pelo consumo de alimentos sólidos durante a infância.(144) Uma vez formada, a microbiota intestinal adulta é considerada relativamente estável quando são mantidos hábitos alimentares constantes. Um pequeno estudo de sequenciamento do gene 16S rRNA demonstrou que a maior parte do microbioma intestinal humano é estável por longos períodos de tempo.(145) No entanto, um estudo de sequenciamento do gene 16S rRNA revelou que quando os seres humanos mudam de uma dieta à base de produtos de origem animal para uma dieta à base de

produtos de origem vegetal (e vice-versa), ocorre uma transformação rápida e substancial da composição da microbiota intestinal.(146) Na dieta à base de produtos de origem animal, observou-se aumento da abundância de *Alistipes*, *Bilophila* e *Bacteroides*, com diminuição dos níveis de *Firmicutes*, em comparação com a dieta à base de produtos de origem vegetal.(146) Após o período de intervenção alimentar, os indivíduos retornaram aos hábitos alimentares regulares. Nesse momento, o microbioma intestinal também voltou à sua composição inicial. Esse achado demonstra a capacidade da microbiota intestinal de se adaptar rapidamente ao ambiente, principalmente quando há alterações na disponibilidade de nutrientes.

Heterogeneidade entre os indivíduos

À medida que as tecnologias disponíveis para o estudo do microbioma intestinal são aprimoradas, aumenta a heterogeneidade observada entre os microbiomas individuais. Em estudos com indivíduos não aparentados, a heterogeneidade observada entre os microbiomas tende a ser alta.(147) Por outro lado, em estudos em que etnias ou comunidades específicas são investigadas, tende a haver um nível mais alto de similaridade.(148)

Um estudo recente de sequenciamento do gene 16S rRNA de mais de 1500 adultos nos Estados Unidos revelou que a composição de espécies da microbiota intestinal variava de acordo com a etnia autorreferida.(148) Esse achado foi confirmado por outros estudos, incluindo um grande estudo de sequenciamento do gene 16S rRNA comparando comunidades urbanas nos Estados Unidos com comunidades rurais do Malawi e da Venezuela, que constatou que a composição da microbiota variava significativamente entre essas coortes desde a infância até a vida adulta.(143) Acredita-se que a similaridade dos microbiomas intestinais nas comunidades étnicas seja mediada por genética, alimentação e estilos de vida semelhantes. As semelhanças entre os microbiomas intestinais de membros da mesma família, principalmente quando moram juntos, também foram comprovadas em diversos estudos.(143)

Símbiose da microbiota intestinal e saúde humana

Na história da saúde e medicina humanas, os microrganismos costumavam ser tratados como agentes causadores de doenças. Nas últimas décadas, à medida que novas evidências destacavam a extensão da colonização microbiana em indivíduos *saudáveis*, houve uma mudança.(149) Na vanguarda desse campo está o conceito de cada ser humano como um ecossistema de “ilhas”, em que o hospedeiro humano e seus microrganismos simbiotes se desenvolvem tornando-se um superorganismo altamente complexo. Em modelos animais, essas comunidades microbianas são

agentes cruciais na modulação das respostas imunes, no metabolismo e na integridade epitelial. Há evidências de que a extensão da translocação microbiana e a ativação imune associada são, em grande parte, determinadas pela composição das bactérias intestinais.

Proteção contra patógenos

Acredita-se que o papel protetor dos microrganismos comensais contra infecções patogênicas seja conferido por dois mecanismos principais: primeiro, competição por nutrientes e nichos; e segundo, aprimoramento do sistema imunológico do hospedeiro.(150)

As bactérias comensais do intestino desenvolveram mecanismos para competir com as bactérias patogênicas da mesma espécie ou de espécies similares. Por exemplo, *Bifidobacterium* bloqueia a colonização de *Escherichia coli* patogênica através da produção de acetato, que acidifica seu ambiente e impede o crescimento da *E. coli*.(151)

Além disso, muitas bactérias comensais pertencem à mesma espécie que bactérias patogênicas que compartilham necessidades comuns de nutrientes.(150) Ao competir por nutrientes limitados, as bactérias comensais estabelecidas impedem a colonização de bactérias patogênicas ao evitar que elas absorvam os nutrientes de que precisam para crescer. Um exemplo disso é a *E. coli* comensal, que compete com a *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC) por ácidos orgânicos, aminoácidos e outros nutrientes.(152)

As bactérias comensais também produzem metabólitos de moléculas pequenas, como ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), que regulam negativamente os genes de virulência expressos pelas bactérias patogênicas.(150) Por exemplo, o butirato regula negativamente o sistema de secreção do tipo III, o complexo de proteínas extracelulares usado por patógenos como *Salmonella enterica* para infectar células humanas.(153)

Microbiota intestinal e sistema imunológico

O sistema imunológico humano é programado para identificar e eliminar células estranhas ou não próprias. A existência de vastas colônias de microrganismos estranhos no intestino pode parecer um pouco contraintuitivo para esse propósito. De fato, a presença de uma microbiota requer várias adaptações evolutivas, tanto do hospedeiro humano quanto do habitante microbiano, e baseia-se na homeostasia aguçada entre os dois elementos.(154)

A primeira linha de defesa é uma barreira física e bioquímica; uma camada de muco secretada pelas células caliciformes que recobre o epitélio intestinal.(154) A camada interna de muco é

quase completamente estéril e protege o epitélio intestinal do contato direto com microrganismos, além de impedir a passagem desses microrganismos para outras partes do corpo, como o fígado. Como parte do sistema de defesa inato do intestino, produz peptídeos antimicrobianos, que controlam o crescimento microbiano, e citocinas, que recrutam outros componentes do sistema imunológico. Estudos mostraram que, sem a presença de bactérias comensais para estimular a produção de compostos antimicrobianos, o intestino é mais suscetível a infecções por patógenos.(154)

Disbiose e doença da microbiota intestinal

Quando a microbiota é saudável, o crescimento de patógenos oportunistas é limitado, o sistema imunológico localizado está em homeostasia com a microbiota e a disponibilidade de nutrientes é equilibrada.(140) A disbiose ocorre quando há alterações no desenvolvimento ou na composição da microbiota intestinal, o que muitas vezes leva à deterioração da saúde intestinal e, em alguns casos, da saúde sistêmica.(155) Estudos em camundongos e humanos demonstraram que a microbiota intestinal é uma comunidade complexa e dinâmica que é desequilibrada em estados patológicos, como obesidade, doença inflamatória intestinal e infecção pelo HIV. Esses organismos desempenham um papel crítico não apenas na manutenção da integridade intestinal, mas também na modulação das respostas imunes sistêmicas aos patógenos. Um aspecto crítico da compreensão da patogênese do HIV e da formulação de novas estratégias de tratamento envolve a avaliação completa da relação entre replicação viral, fibrose intestinal e translocação microbiana.

2. FUNDAMENTAÇÃO DO PROJETO

A doença hepática gordurosa é uma das principais causas de morbidade e mortalidade e as taxas estão aumentando em regiões com recursos limitados; entretanto, a maioria dos estudos da doença tem sido realizada em países com bons recursos. Nos locais em que os recursos são escassos, os dados disponíveis são limitados, principalmente os relacionados a pacientes com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV).

Estudos demonstraram que pacientes infectados pelo HIV com doença hepática gordurosa evoluem para esteatose e doença hepática avançada mais rapidamente do que na população em geral. Portanto, a identificação de indivíduos de alto risco para presença de DHGNA e/ou fibrose avançada é essencial para prevenir o desenvolvimento de complicações hepáticas em pacientes infectados pelo HIV. A identificação e validação de estratégias não invasivas para detecção precoce e eliminação da progressão da DHGNA para fibrose são necessárias, especialmente em cenários de recursos limitados.

A identificação precoce é fundamental, mas a compreensão da patogênese da DHGNA também é importante para a identificação de estratégias futuras de tratamento clínico. O objetivo desta pesquisa é melhorar a compreensão dos fatores associados às populações pró-inflamatórias de bactérias intestinais de indivíduos com infecção crônica pelo HIV e distúrbios imunológicos. Estudos limitados têm sido feitos para analisar as relações entre parâmetros metabólicos, composição corporal e translocação microbiana em pacientes infectados pelo HIV. Através do estudo das comunidades microbianas intestinais de indivíduos mono infectados com HIV com diferentes estágios da doença hepática, objetivamos entender como elas contribuem para a progressão da doença.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo primário:

Validar a exatidão dos modelos preditivos não invasivos para DHGNA e fibrose avançada (METAVIR-F3F4) em pacientes mono infectados com HIV.

3.2 Objetivo secundário:

Caracterizar o microbioma intestinal humano em indivíduos mono infectados pelo HIV e correlacionar a composição, diversidade e função do microbioma intestinal com a presença de esteatose e/ou fibrose.

4. ESTRUTURA DA TESE

Os capítulos de metodologia, resultados e discussão são apresentados como dois artigos:

- 1. Validação do valor diagnóstico dos biomarcadores sorológicos para detecção de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e/ou fibrose hepática avançada em pessoas que vivem com HIV.**
- 2. Estudo piloto de assinaturas microbianas de doenças hepáticas em homens e mulheres monoinfectados com HIV no Rio de Janeiro, Brasil**

5. PRIMERIO ARTIGO

Autores







Carolyn Yanavich ^{1,2}, Antonio G Pacheco ³, Sandra W Cardoso ¹, Estevao Portela ¹, Ursula B Chaves ¹, Gabriela Freitas ¹, Ricardo Santos ¹, Michelle Morata¹, Valdilea G Veloso¹, Beatriz Grinsztejn¹, Hugo Perazzo¹

¹ *Laboratory of clinical research in STD/AIDS (LAPCLIN-AIDS), National Institute of Infectious Diseases Evandro Chagas-Oswaldo Cruz Foundation (INI/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil;*

² *University of California Los Angeles (UCLA);* ³ *Scientific Computation Program (PROCC), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil*

Publicado em revista de HIV Medicine

Diagnostic value of serological biomarkers for detection of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and/or advanced liver fibrosis in people living with HIV

C Yanavich ^{1,2}, AG Pacheco ³, SW Cardoso,¹ EP Nunes,¹ USB Chaves ¹, G Freitas,¹ R Santos,¹ M Morata,¹ VG Veloso ¹, B Grinsztejn ¹ and H Perazzo ¹

¹Laboratory of Clinical Research in STD/AIDS (LAPCLIN-AIDS), National Institute of Infectious Diseases Evandro Chagas (INI), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil, ²Department of Pediatrics, University of California Los Angeles, Los Angeles, CA, USA and ³Scientific Computation Program (PROCC), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil

Objectives

We aimed to evaluate the accuracy of serological biomarkers for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and advanced fibrosis (METAVIR-F3F4) in HIV mono-infected individuals.

Methods

In all, 674 participants from the PROSPEC-HIV study (NCT02542020), who had blood sample tests and transient elastography (TE) performed on the same day, were eligible. Exclusion criteria were viral hepatitis co-infection ($n = 90$), abusive alcohol intake ($n = 61$), missing data ($n = 47$) or unreliable TE ($n = 39$). NAFLD was defined by controlled attenuation parameter ≥ 248 dB/m and advanced fibrosis by liver stiffness measurement ≥ 8.7 kPa with M probe or ≥ 7.2 kPa with XL probe. Biomarkers for NAFLD [Steato-ELSA, Fatty Liver Index (FLI), Hepatic Steatosis Index (HSI), NAFLD-Liver Fat Score (NAFLD-LFS)] and fibrosis [Fibrosis-4 score (FIB-4), Aspartate-to-Platelet Ratio Index (APRI) and NAFLD Fibrosis Score (NFS)] were calculated.

Results

A total of 437 patients [57% female, age = 44 (interquartile range: 35–52) years, body mass index (BMI) = 26.1 (23.4–29.3) kg/m², CD4 = 660 (427–901) cells/ μ L] were included. The prevalence [95% confidence interval (CI)] of NAFLD and advanced fibrosis were 38.2% (33.8–42.9) and 10.5% (8.0–13.8), respectively. The areas (95% CI) under the receiver operator curve (AUROCs) for diagnosis of NAFLD were 0.854 (0.818–0.889), 0.840 (0.804–0.877), 0.805 (0.762–0.847) and 0.793 (0.750–0.836) for Steato-ELSA, FLI, HSI and NAFLD-LFS ($P < 0.001$), respectively. All tests yielded satisfactory sensitivities, specificities and negative predictive values (NPVs). The AUROCs (95% CI) for diagnosis of advanced fibrosis were 0.736 (0.659–0.814), 0.700 (0.614–0.7851) and 0.795 (0.726–0.864) for FIB-4, APRI and NFS ($P = 0.077$), respectively. These tests yielded high specificities and negative predictive values (NPVs) $> 90\%$.

Conclusion

Biomarkers for NAFLD had a good accuracy and those for fibrosis had high specificities and NPVs. These tests should be integrated to HIV care to detect NAFLD and to exclude advanced liver fibrosis.

Keywords: fibrosis, HIV infection, serological biomarkers, steatosis

Accepted 12 December 2020

Introduction

Posing as a major health risk to people living with HIV (PLWH), the burden of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is characterized by the abnormal accumulation of liver fat [1]. The clinical presentation of NAFLD can range from simple steatosis to non-alcoholic

Correspondence: Hugo Perazzo, National Institute of Infectious Diseases Evandro Chagas (INI), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Av. Brasil, 4365 – CEP 21040-360 – Rio de Janeiro, Brazil. Tel: +55 21 3865 9128; fax: +55 21 2564 4933; e-mails: perazzohugo@gmail.com; hugo.perazzo@ini.fiocruz.br

steatohepatitis (NASH), which leads to progression for advanced fibrosis/cirrhosis and its complications [2]. NAFLD can be associated with cardiovascular disease in HIV-uninfected individuals [3,4]. In addition, the presence of advanced fibrosis in uninfected patients with biopsy-proven NAFLD is associated with higher mortality rates [5].

Historically, performing a liver biopsy was considered the gold standard for diagnosing steatosis and fibrosis staging; however, this method is not only invasive but it can result in potential complications and sampling error [6]. Transient elastography (TE) has been validated as a non-invasive method to assess liver fibrosis by liver stiffness measurement (LSM) and steatosis by controlled attenuation parameter (CAP) [7]. Nevertheless, TE is not universally available and must be performed by experienced health professionals. Predictive models, which use simple blood parameters and anthropometric measures, have been proposed as alternative methods for the detection of NAFLD and/or advanced fibrosis ($F \geq 3$ METAVIR) [8]. While not yet evaluated in the HIV-infected population, the diagnostic value of Fatty Liver Index (FLI), Hepatic Steatosis Index (HSI), NAFLD-Liver Fat Score (NAFLD-LFS) and Steato-ELSA has been validated for the general population. Additionally, Aspartate-to-Platelet Ratio Index (APRI), Fibrosis-4 score (FIB-4) and NAFLD Fibrosis Score (NFS) are validated predictive models to diagnose advanced fibrosis most validated in patients with chronic liver diseases.

Despite the extensive validation of predictive models for NAFLD and/or advanced fibrosis in HIV-uninfected individuals, the accuracy of these non-invasive tests in PLWH remains scarce. The aim of this study was to validate the diagnostic value of predictive models for the detection of NAFLD and/or advanced fibrosis in individuals with HIV infection.

Methods

Study population

This cross-sectional study analysed data of the baseline visit from the previously described PROSPEC-HIV study (NCT02542020). The PROSPEC-HIV study prospectively enrolled individuals from June 2015 to April 2018 with HIV infection in Rio de Janeiro (Brazil) and assessed the prevalence of liver injury using non-invasive diagnostics [9]. The exclusion criteria for this analysis were viral hepatitis co-infection (positive HCV antibody or HBsAg test), abusive alcohol intake (> 210 g/week for men or > 140 g/week for women), missing parameters for the calculation of serological biomarkers, or an unreliable TE for the

assessment of liver steatosis or fibrosis. The clinical evaluations, blood sample collection and TE by FibroScan (EchoSens, Paris, France) were performed on the same day. The study protocol was approved by the INI/FIOCRUZ Ethics Committee (IRB 32889514.4.0000.5262), and all participants signed an informed consent prior to enrolment in the study.

Clinical assessment and blood sample

Clinical records included age, gender, self-reported skin colour, anthropometric measures, self-reported alcohol consumption [quantified by the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT score)], smoking (never, past or current), presence of co-morbidities and use of concomitant medications. Presence of metabolic syndrome was defined according to the International Diabetes Federation [10]. Blood tests were performed after overnight fasting and analysed in a central laboratory using a Dimension-RxL-Max (Siemens Healthcare Diagnostic, Chicago, IL, USA) analyser. The upper limit of normal (ULN) aminotransferases values were 78 and 37 IU/L for alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), respectively. Plasma levels of total and high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol and triglycerides were determined using enzymatic methods. Low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol was calculated using the Friedewald equation and glucose was measured using the hexokinase method.

Transient elastography

Transient elastography by FibroScan (model 502; EchoSens) was performed by a single experienced operator according to a previous validated procedure on participants following an overnight fast [11]. Final results were expressed as the median of 10 valid measures of CAP for steatosis and LSM for fibrosis. TE was considered reliable when the following criteria were met: (1) 10 successful measurements; (2) interquartile range (IQR) $< 30\%$ of the median value of LSM for fibrosis and CAP for steatosis; and (3) success rate $> 60\%$. TE was the reference for detection of liver steatosis and fibrosis by CAP and LSM, respectively. Presence of NAFLD and advanced fibrosis were defined by $CAP \geq 248$ dB/m [12] and $LSM \geq 8.7$ kPa by M probe or ≥ 7.2 kPa by XL probe [13], respectively.

Serological biomarkers of liver steatosis and fibrosis

Serological biomarkers of steatosis, FLI, HSI, NAFLD-LFS and Steato-ELSA were calculated according to the following formulae:

$$FLI = \frac{(e^{0.953 \log(\text{triglycerides, mg/dL}) + 0.139 \times \text{BMI} + 0.718 \log(\text{GGT}) + 0.053 \log(\text{WC}) - 15.745})}{1 + (e^{0.953 \log(\text{triglycerides, mg/dL}) + 0.139 \times \text{BMI} + 0.718 \log(\text{GGT}) + 0.053 \log(\text{WC}) - 15.745})} \times 100$$

$$HSI = 8 \times \text{ALT/AST ratio} + \text{BMI} + 2 \text{ (if type 2 diabetes)} + 2 \text{ (if female)}$$

$$\text{NAFLD-LFS} = -2.89 + 1.18 (\text{metabolic syndrome} - \text{yes} = 1/\text{no} = 0) + 0.45 (\text{type 2 diabetes} - \text{yes} = 2/\text{no} = 0) + 0.15 (\text{fasting insulin, } \mu\text{U/L}) + 0.04 (\text{AST, U/L}) - 0.94 (\text{AST/ALT})$$

$$\text{Steato-ELSA} = \frac{2.71828^{[(0.0823 \times \text{BMI}) + (0.0337 \times \text{WC}) + (0.0596 \times \text{HOMA-IR}) + (0.0036 \times \text{triglycerides, mg/dL}) + (0.0173 \times \text{ALT}) - (0.0124 \times \text{AST}) - 6.6434]}}{1 + 2.71828^{[(0.0823 \times \text{BMI}) + (0.0337 \times \text{WC}) + (0.0596 \times \text{HOMA-IR}) + (0.0036 \times \text{triglycerides in mg/dL}) + (0.0173 \times \text{ALT}) - (0.0124 \times \text{AST}) - 6.6434]}}$$

The accuracy of these predictive biomarkers for presence of liver steatosis was measured using the previously validated thresholds of $FLI \geq 60$ [14], $HSI \geq 36$ [15], $\text{NAFLD-LFS} \geq -0.640$ [16] or $\text{Steato-ELSA} \geq 0.386$ [17].

Aspartate-to-Platelet Ratio Index, FIB-4 and NFS were the serological biomarkers for detection of advanced fibrosis calculated according to the following formulae:

$$\text{APRI} = [\text{AST}/\text{ULN}]/\text{platelet count} \times 100$$

$$\text{FIB-4} = \frac{[\text{age} \times \text{AST}(\text{UI/L})/[\text{platelet count} \times \sqrt{\text{ALT}(\text{UI/L})}]] \times 100$$

$$\text{NFS} = 1.675 + 0.037 \times \text{age} + 0.094 \times \text{BMI} + 1.13$$

$$\times \text{type} - 2 \text{ diabetes (yes} = 1/\text{no} = 0)$$

$$+ 0.99 \times \text{AST/ALT} - 0.013$$

$$\times \text{platelet count} - 0.66 \times \text{albumin}$$

The accuracy of APRI, FIB-4 and NFS for presence of advanced fibrosis was measured using the previously validated thresholds of $\text{APRI} \geq 1.00$ and ≥ 1.50 [18], $\text{FIB-4} \geq 1.45$ and ≥ 3.25 [19] or $\text{NFS} \geq -1.455$ and ≥ 0.676 [20].

Statistical analysis

Categorical variables were reported as absolute (n) and relative frequencies (%) and continuous variables as medians and IQRs. The area under the receiver operator characteristic (AUROC) curve analyses were performed and the optimal cut-off points for the serological biomarkers were identified using the maximal Youden index. Sensitivity (Se), specificity (Sp), positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), positive (LR+) and negative likelihood ratios (LR-) of previously validated thresholds and optimal cut-offs points identified in this study were assessed. The AUROCs were compared using the empirical non-parametric method according to DeLong *et al.* [21]. Sensitivity analyses were performed to evaluate the accuracy of these biomarkers stratified by clinical conditions. Statistical analyses were performed

using STATA for Windows (2017; StataCorp LP, College Station, TX, USA).

Results

A total of 674 patients with HIV infection were included in the PROSPEC-HIV study from June 2015 to April 2018. Participants were excluded from this analysis due to viral hepatitis co-infection ($n = 90$), abusive alcohol intake ($n = 61$), missing data for serological biomarkers calculation ($n = 47$) and unreliable TE ($n = 39$). Therefore, 437 HIV mono-infected patients without abusive alcohol intake [57% female, median (IQR) age = 44 (35–52) years, median (IQR) body mass index (BMI) = 26.1 (23.4–29.3) kg/m^2 , 35% with metabolic syndrome and 96% under combination antiretroviral therapy (cART)] were included (Table 1). Figure 1 depicts the flowchart of the study. The prevalence rates (95% CI) of NAFLD and advanced fibrosis were 38.2% (33.8–42.9) and 10.5% (8.0–13.8), respectively.

Diagnostic accuracy of predictive models for diagnosis of NAFLD

The median (IQR) values of FLI, HSI, NAFLD-LFS and Steato-ELSA for patients without and with NAFLD were 36 (18–59) and 79 (60–93), 36 (32–39) and 42 (39–48), -1.035 (-1.767 to -0.156) and 0.897 (-0.345 to 2.171) and 0.283 (0.190 – 0.387) and 0.589 (0.438 – 0.783) ($P < 0.001$ for all), respectively (Fig. S1). The AUROCs (95% CI) of FLI, HSI, NAFLD-LFS and Steato-ELSA for prediction of presence of NAFLD were 0.840 (0.804 – 0.876), 0.805 (0.763 – 0.847), 0.793 (0.750 – 0.836) and 0.854 (0.818 – 0.889) ($P < 0.001$), respectively (Fig. 2 a). In two-by-two comparisons, there was no significant difference in the AUROCs between FLI and Steato-ELSA for detection of NAFLD. However, the AUROCs of FLI and Steato-ELSA were significantly higher than HSI (*vs.* FLI: $P = 0.035$; *vs.* Steato-ELSA: $P < 0.001$) and NAFLD-LFS (*vs.* FLI: $P = 0.019$; *vs.* Steato-ELSA: $P = 0.001$). The accuracy of Steato-ELSA calculated without using fasting

Table 1 Baseline characteristics of patients

	All (<i>n</i> = 437)
Demographic characteristics	
Female gender ^a	249 (57)
Age (years) ^b	44 [35 to 52]
Black/mixed skin colour ^a	228 (52)
Former or current smoking ^a	184 (42)
Metabolic features	
BMI (kg/m ²) ^b	26.1 (23.4–29.3)
Waist circumference (cm) ^b	91 (84–99)
Metabolic syndrome ^a	154 (35)
HOMA-IR ^b	2.48 (1.68–3.94)
Biochemistry	
ALT (IU/L) ^b	30 (23–43)
AST (IU/L) ^b	25 (20–33)
GGT (IU/L) ^b	46 (32–75)
Fasting glucose (mg/dL) ^b	94 (88–101)
Fasting insulin (mmol/L) ^b	10.7 (7.6–16.1)
Triglycerides (mg/dL) ^b	124 (84–178)
HIV infection	
Combined ART ^a	420 (96)
Duration of combined ART (years) ^b	7.2 (3.8–13.8)
CD4 count (cells/ μ L) ^b	620 (427–901)
HIV viral load > 40 copies/ μ L ^a	80 (18)
Nadir CD4 (cells/ μ L) ^b	197 (84–323)
Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)	
CAP (dB/m) ^b	233 (204–269)
Prevalence of NAFLD (CAP \geq 248 dB/m) ^c	38.2 (33.8–42.9)
Predictive models for NAFLD	
Fatty Liver Index ^b	52 (29–79)
Hepatic Steatosis Index ^b	38 (34–44)
NAFLD-Liver Fat Score ^b	-0.463 (-1.477–0.908)
Steato-ELSA ^b	0.371 (0.243–0.586)
Liver advanced fibrosis	
Liver stiffness measurement (kPa) ^b	5.3 (4.6–6.5)
Prevalence of liver advanced fibrosis [LSM \geq 8.7 kPa (M probe) or \geq 7.2 kPa (XL probe)] ^c	10.5 (8.0–13.8)
Predictive models for liver advanced fibrosis	
APRI ^b	0.28 (0.22–0.39)
FIB-4 ^b	0.81 (0.57–1.13)
NAFLD Fibrosis Score ^b	-2.230 (-3.041 to -1.262)

ALT, alanine aminotransferase; AST; aspartate aminotransferase; APRI, Aspartate-to-Platelet Ratio Index; ART, antiretroviral therapy; BMI, body mass index; CAP, controlled attenuation parameter; FIB-4, Fibrosis-4 score; GGT, gammaglutamyl transpeptidase; LSM, liver stiffness measurement.

Data are expressed as *n* (%), median (interquartile range)^b or % (95% confidence interval)^c.

insulin in the formula was similar to that obtained with the standard Steato-ELSA formula [overall AUROC of 0.849 (0.813–0.886) *vs.* 0.854 (0.818–0.889), *P* = 0.344] (Table S1). In addition, there was no significant difference among AUROCs of these biomarkers according to sex at birth, presence of obesity and presence of advanced liver fibrosis by TE (Table 2). The optimal cut-offs, based on the maximum Youden Index, for detection of NAFLD were FLI \geq 49, HSI \geq 40, NAFLD-LFS \geq -0.116 and Steato-ELSA \geq 0.378.

Table 3 describes the accuracy of previously validated and optimal thresholds of serological biomarkers for

NAFLD. FLI \geq 60 yielded Se = 75% (95% CI: 68–82), Sp = 76% (70–81), PPV = 66% (58–72), NPV = 83% (78–88), LR+ = 3.09 and LR- = 0.33. In addition, Steato-ELSA \geq 0.386 yielded Se = 81% (75–87), Sp = 74% (69–80), PPV = 66% (59–73), NPV = 87% (82–91), LR+ = 3.19 and LR- = 0.25. Similar results were observed using the Steato-ELSA formula without fasting insulin [Se = 81% (75–87), Sp = 72% (67–78), PPV = 65% (58–71), NPV = 86% (81–91), LR+ = 2.93 and LR- = 0.26] (Table S1). HSI \geq 36 had higher Se [89% (83–93)] but lower Sp [52% (46–58)], compared with FLI and Steato-ELSA. In addition, NAFLD-LFS \geq -0.640 had similar Se [80% (73–86)] and lower Sp [57% (51–64)], compared with FLI and Steato-ELSA. Similar results were observed after stratifying our sample by sex at birth and presence/absence of advanced fibrosis (Table S2). However, all patients with obesity [*n* = 86, BMI \geq 30 kg/m²] had HSI \geq 36 and Steato-ELSA \geq 0.386. The optimal cut-offs yielded higher Se and lower Sp for FLI \geq 49 [Se = 85% (79–90), Sp = 68% (62–73)] and Steato-ELSA \geq 0.378 [Se = 84% (77–89), Sp = 74% (68–79)]. On the other hand, lower Se, but higher Sp were observed for HSI \geq 40 [Se = 68% (61–75), Sp = 81% (76–86)] and NAFLD-LFS \geq -0.116 [Se = 72% (64–79), Sp = 77% (71–82)].

Diagnostic accuracy of predictive models for diagnosis of advanced fibrosis

The median (IQR) values of APRI, FIB-4 and NFS for patients without and with advanced fibrosis were 0.28 (0.21–0.36) and 0.40 (0.27–0.59), 0.79 (0.55–1.05) and 1.21 (0.81–1.84), and -2.39 (-3.108 to -1.444) and -0.581 (-1.983 to -0.095) (*P* < 0.001 for all), respectively (Fig. S2). The AUROCs (95% CI) of APRI, FIB-4 and NFS for prediction of advanced fibrosis were 0.700 (0.614–0.785), 0.736 (0.659–0.814) and 0.795 (0.726–0.864) (*P* = 0.077), respectively (Fig. 2b). AUROC was significantly lower in obese patients (BMI \geq 30 kg/m²) than in non-obese patients [0.673 (95% CI: 0.540–0.806) *vs.* 0.831 (0.759–0.904)], but no difference was observed according to sex at birth or presence/absence of NAFLD (Table 2).

Considering previously described thresholds of biomarkers for advanced fibrosis, APRI \geq 1.00 or \geq 1.50, FIB-4 \geq 1.45 or \geq 3.25 and NFS \geq 0.676 yielded high specificities and high NPVs (90% for all). On the other hand, NFS \geq -1.455 had Se and Sp values (95% CI) of 67% (52–81) and 75% (70–79), respectively. Similar results were observed after stratifying our sample by sex at birth. However, no patient with obesity [*n* = 86, BMI \geq 30 kg/m²] had APRI \geq 1.00 or FIB-4 \geq 3.25 (Table S3). The optimal cut-offs based on the maximum Youden Index remained with high NPV and yielded the following Se and Sp (95% CI): (i) APRI \geq 0.35: Se = 67% (52–81)

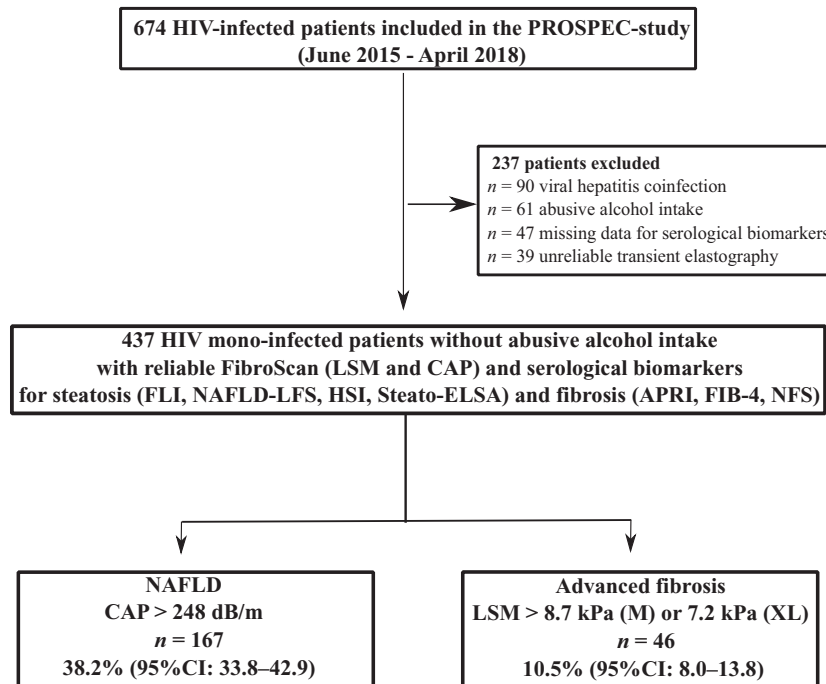


Fig. 1 Flowchart of patient recruitment in the study.

and Sp = 74% (69–78); FIB-4 \geq 1.03: Se = 70% (54–82) and Sp = 75% (70–79); NFS \geq -1.255: Se = 65% (50–79) and Sp = 81% (77–85) (Table 3).

All biomarkers had similar AUROCs for detection of advanced fibrosis in HIV mono-infected patients with NAFLD ($n = 167$; CAP \geq 248 dB/m); APRI = 0.698 (95% CI: 0.580–0.816); FIB-4 = 0.702 (0.598–0.807) and NFS = 0.749 (0.647–0.850); $P = 0.681$ (Table 2). In addition, we observed similar high specificities and NPVs with the previously validated cut-offs of these methods in this subgroup: (1) Sp = 99% (96–100), NPV = 83% (76–88) for APRI \geq 1.50; (2) Sp = 90% (84–94), NPV = 84% (78–90) for FIB-4 \geq 1.45; and (3) Sp = 99% (95–100), NPV = 85% (78–90) for NFS \geq 0.676 (Table 4). Severe steatosis (CAP \geq 280 dB/m) was present in 46% (95% CI: 32–61) of patients with advanced fibrosis defined by TE ($n = 46$). Moreover, the presence of severe steatosis was significantly associated with presence of advanced fibrosis adjusted for age and sex [odds ratio (OR) = 3.25 (95% CI: 1.67–6.33), $P = 0.001$]. Similar results were observed when replacing CAP by FLI (\geq 60) to define presence of steatosis [OR = 3.10 (95% CI 1.55–6.21), $P = 0.001$].

Discussion

This study highlighted the diagnostic value of predictive models for the detection of NAFLD and advanced fibrosis

in HIV-infected patients. Given the burden of NAFLD in PLWH [9,22], it is essential that we are able to identify those at highest risk for the presence of NAFLD and/or advanced fibrosis to prevent the development of liver-related complications [23]. The European guidelines for NAFLD management recommend the use of FLI and FIB-4/NFS as alternative methods for detecting of liver steatosis and advanced fibrosis, respectively [24]. In addition, international guidelines from USA and Asia-Pacific region recommend FIB-4, NFS [23] or APRI [25] for detecting advanced fibrosis. In resource-limited settings, the use of biomarkers based on anthropometric measures and simple blood samples may be an effective alternative to TE.

Several studies have described the diagnostic value of predictive models for detection of liver steatosis in the general population. The diagnostic value of FLI was extensively validated worldwide, including studies performed in the USA [26], Europe [27], Latin America [17] and Asia [28]. HSI and NAFLD-LFS were validated in large-scale studies performed in Brazil [17] and Thailand [29]. Steato-ELSA was recently developed and validated in a Brazilian cohort of over 10 000 uninfected subjects [17]. These studies used either ultrasound or magnetic resonance spectroscopy (MRS) as the reference for liver steatosis. Using liver biopsy as the reference, FLI, HSI and NAFLD-LFS yielded AUROCs of 0.83 (0.72–0.91), 0.81 (0.71–0.88) and 0.80 (0.69–0.88), respectively, for

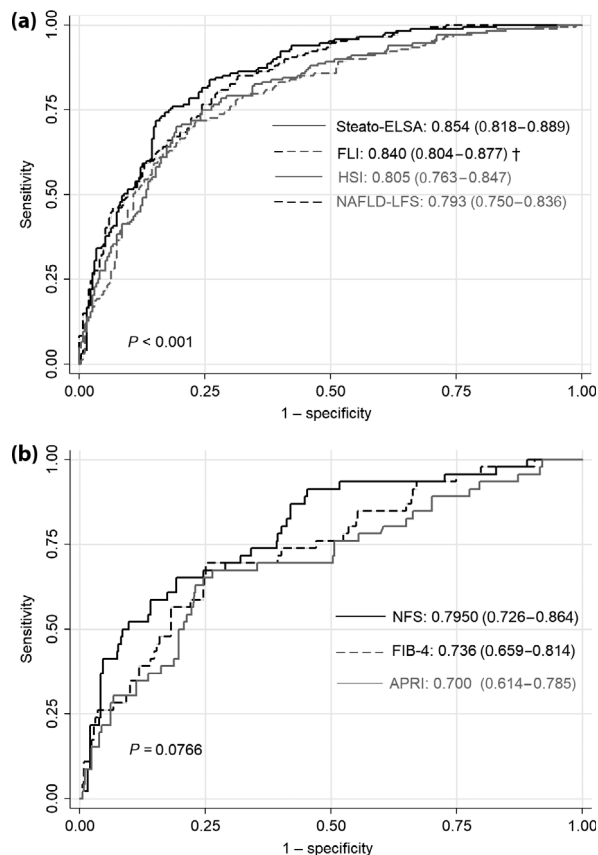


Fig. 2 (a) Area under the receiver operator characteristic (AUROC) of Fatty Liver Index (FLI), Hepatic Steatosis Index (HSI), non-alcoholic fatty liver disease-liver fat score (NAFLD-LFS) and Steato-ELSA for NAFLD; (b) AUROCs of Aspartate-to-Platelet Ratio Index (APRI), Fibrosis-4 score (FIB-4) and NAFLD Fibrosis Score (NFS) for detection of advanced fibrosis ($F \geq 3$ METAVIR).

steatosis detection (> 5% hepatocytes) [30]. More recently, machine learning models with different combinations of clinical and multi-omics (genetic, transcriptomic, proteomic and metabolomic) data have been proposed to identify individuals at high risk of NAFLD [31]. However, the use of these algorithms in clinical practice might not be feasible and need further validation.

Similar to the studies conducted in the general population using CAP, the diagnostic value of the predictive models for the detection of liver steatosis in PLWH reported in the present study were comparable with those previously described in uninfected individuals. These results further reinforced the utility of these simple tests in HIV-infected patients. NAFLD prevalence reported in the present study [38.2% (95% CI: 33.8–42.9)] might be overestimated due to relatively low CAP cut-off to define grade I steatosis. However, this prevalence was similar to

previous studies from Europe and North America that used CAP [≥ 238 –248 dB/m] as the reference to define NAFLD [32–35]. In the present study, FLI and Steato-ELSA performed significantly better than other models for the diagnosis of steatosis in PLWH. Additionally, we did not observe significant differences in AUROCs of these tests for NAFLD according to demographic or clinical conditions, such as sex at birth and presence of advanced fibrosis. However, the thresholds of these biomarkers might be inadequate in those who are obese, as all patients with a BMI ≥ 30 kg/m² had Steato-ELSA and HSI higher than the validated thresholds. Biomarkers such as the NAFLD-LFS and Steato-ELSA require a fasting insulin result to complete the calculation, which may pose a challenge in resource-limited settings. Fortunately, the accuracy of the Steato-ELSA calculated without insulin was similar when compared with the standard formula (Table S1). Therefore, the Steato-ELSA's formula without fasting insulin can be used in resource-limited countries.

Predictive models for advanced fibrosis detection were extensively validated in several studies using liver biopsy as the reference [36]. The diagnostic values of APRI and FIB-4 were validated in patients with chronic viral hepatitis [37]. Among these non-invasive simple tests, NFS and FIB-4 yielded the best diagnostic performance for advanced fibrosis detection in uninfected subjects with NAFLD [38]. However, the SHIVER group has reported poor diagnostic accuracy of serological markers to detect advanced fibrosis using liver biopsies of 116 patients with HIV mono-infection from an international cohort [FIB-4 and NFS AUROCs of 0.663 and 0.662 (all subjects), 0.670 and 0.664 (NAFLD subjects only), and 0.722 and 0.679 (non-NAFLD subjects only), respectively]. Despite the relatively low accuracy, these biomarkers had high NPV in the SHIVER study [39]. Considering the previously validated thresholds for APRI (≥ 1.00 or ≥ 1.50), FIB-4 (≥ 1.45 or ≥ 3.25) and NFS (≥ 0.676), the present study reported similar high specificities and high negative predictive values for advanced fibrosis detection of these serological markers in HIV-infected patients compared with data previously described in systematic reviews/meta-analysis that included uninfected individuals [37,38]. Our study findings reinforce the concept that these predictive models might be better to exclude than to detect advanced fibrosis in PLWH [40]. Similar to the recommendation for the general population, NFS can be used to rule out (values < -1.455) and/or to rule in (values ≥ 0.676) advanced fibrosis in HIV-infected patients with NAFLD. On the other hand, the optimal cut-offs proposed in the present study yielded higher sensitivity rates maintaining high NPV. There was no significant difference in the overall AUROCs for the three advanced fibrosis detecting models in PLWH.

Table 2 Area under the receiver operator curves [AUROC (95% confidence interval)] of serological biomarkers/predictive models for detection of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) (defined by CAP \geq 248 dB/m) or advanced fibrosis [defined by LSM \geq 8.7 kPa (M probe) or \geq 7.2 kPa (XL probe)]

Predictive model	According to sex at birth						According to obesity				According to liver disease				
	Overall		Female (n = 249)		Male (n = 188)		Non-obese (n = 351)		Obese (n = 86)		Minimal fibrosis (n = 391)		Advanced fibrosis (n = 46)		P-value
	All (n = 437)														
For NAFLD															
FLI	0.840 [0.804–0.876]	0.832 [0.782–0.882]	0.849 [0.796–0.903]	0.648	0.813 [0.768–0.858]	0.763 [0.651–0.874]	0.413	0.825 [0.784–0.865]	0.901 [0.804–0.997]	0.156					
HSI	0.805 [0.763–0.847]	0.795 [0.738–0.852]	0.824 [0.763–0.886]	0.499	0.766 [0.712–0.821]	0.633 [0.498–0.768]	0.071	0.789 [0.742–0.836]	0.846 [0.710–0.982]	0.437					
NAFLD-LFS	0.793 [0.750–0.836]	0.756 [0.694–0.818]	0.835 [0.775–0.895]	0.073	0.766 [0.713–0.820]	0.752 [0.634–0.871]	0.830	0.775 [0.726–0.823]	0.824 [0.684–0.963]	0.516					
Steato-ELSA	0.854 [0.818–0.889]	0.842 [0.794–0.891]	0.860 [0.806–0.914]	0.635	0.835 [0.791–0.879]	0.799 [0.693–0.905]	0.542	0.843 [0.804–0.882]	0.858 [0.732–0.984]	0.823					
P value	< 0.001	< 0.001	0.183		< 0.001	0.097		< 0.001	0.167						
Predictive model	Overall (n = 437)	Female (n = 249)	Male (n = 188)	P-value	Non-obese (n = 351)	Obese (n = 86)	P-value	Non-NAFLD (n = 270)	NAFLD (n = 167)	P-value					
For advanced fibrosis (F3F4)															
APRI	0.700 (0.614–0.785)	0.723 (0.621–0.825)	0.708 (0.560–0.856)	0.867	0.766 (0.674–0.858)	0.643 (0.490–0.797)	0.180	0.691 (0.556–0.825)	0.698 (0.580–0.816)	0.939					
FIB-4	0.736 (0.659–0.814)	0.734 (0.630–0.839)	0.743 (0.625–0.860)	0.919	0.831 (0.759–0.904)	0.673 (0.540–0.806)	0.041	0.766 (0.637–0.894)	0.702 (0.598–0.807)	0.454					
NFS	0.795 (0.726–0.864)	0.778 (0.688–0.867)	0.827 (0.718–0.937)	0.491	0.788 (0.694–0.883)	0.693 (0.559–0.827)	0.254	0.773 (0.640–0.907)	0.749 (0.647–0.850)	0.773					
P-value	0.077	0.637	0.260		0.062	0.754		0.016	0.681						

APRI, Aspartate-to-Platelet Ratio Index AUROC, area under the receiver operator curve; CI, confidence interval; FIB-4, Fibrosis-4 score; FLI, Fatty Liver Index; HSI, Hepatic Steatosis Index; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD-LFS, NAFLD-Liver Fat Score; NFS, NAFLD Fibrosis Score. Obesity was defined as body mass index \geq 30 kg/m²; presence of advanced fibrosis (F3F4 METAVIR) was defined as liver stiffness measurement (LSM) \geq 8.7 kPa (M probe) or \geq 7.2 kPa (XL probe) and presence of NAFLD as controlled attenuation parameter (CAP) \geq 248 dB/m. In two-by-two comparison of predictive models for NAFLD: (1) overall: FLI higher than HSI ($P = 0.035$) and NAFLD-LFS ($P = 0.019$); Steato-ELSA higher than HSI ($P < 0.0001$) and NAFLD-LFS ($P = 0.0001$); (2) female sex: FLI higher than NAFLD-LFS ($P = 0.014$); Steato-ELSA higher than HSI ($P = 0.01$) and NAFLD-LFS ($P = 0.004$); (3) non-obese: Steato-ELSA higher than HSI ($P = 0.001$) and NAFLD-LFS ($P = 0.003$); (4) obese: Steato-ELSA higher than HSI ($P = 0.005$); (5) FOF1F2: FLI higher than NAFLD-LFS ($P = 0.027$); Steato-ELSA higher than HSI ($P = 0.001$) and NAFLD-LFS ($P = 0.001$). In two-by-two comparison of predictive models for advanced fibrosis: (1) non-obese: FIB-4 higher than APRI ($P = 0.047$); (2) non-NAFLD: FIB-4 higher than APRI ($P = 0.004$).

Table 3 Accuracy of serological biomarkers/predictive models for detection of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) (CAP \geq 248 dB/m) or advanced fibrosis [LSM \geq 8.7 kPa (M probe) or \geq 7.2 kPa (XL probe)] according to previous validated and maximum Younden Index thresholds

	ROC area (95% CI)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	PPV (95% CI)	NPV (95% CI)	LR+	LR-
<i>Serological biomarkers/predictive models for diagnosis of NAFLD</i>							
Fatty Liver Index							
$\geq 60^\dagger$	0.755 (0.713–0.797)	75% (68–82)	76% (70–81)	66% (58–72)	83% (78–88)	3.09	0.33
$\geq 49^\S$	0.764 (0.725–0.803)	85% (79–90)	68% (62–73)	62% (55–68)	88% (83–92)	3.17	0.32
Hepatic Steatosis Index							
$\geq 36^\dagger$	0.702 (0.664–0.741)	89% (83–93)	52% (46–58)	53% (47–59)	88% (82–93)	1.84	0.34
$\geq 40^\S$	0.747 (0.704–0.789)	68% (61–75)	81% (76–86)	69% (61–76)	81% (75–85)	3.61	0.22
NAFLD-Liver Fat Score							
$\geq -0.640^\dagger$	0.716 (0.674–0.758)	80% (73–86)	63% (57–69)	57% (51–64)	84% (78–89)	2.17	0.31
$\geq -0.116^\S$	0.743 (0.700–0.785)	72% (64–79)	77% (71–82)	66% (58–72)	82% (76–86)	3.08	0.37
Steato-ELSA							
$\geq 0.386^\dagger$	0.779 (0.740–0.819)	81% (75–87)	74% (69–80)	66% (59–73)	87% (82–91)	3.19	0.25
$\geq 0.378^\S$	0.788 (0.749–0.826)	84% (77–89)	74% (68–79)	66% (60–73)	88% (83–92)	3.19	0.22
<i>Serological biomarkers/predictive models for diagnosis of advanced liver fibrosis</i>							
APRI							
$\geq 1.00^\dagger$	0.517 (0.486–0.547)	4% (1–15)	99% (97–100)	33% (4–78)	90% (87–93)	4.25	0.97
$\geq 1.50^\dagger$	0.507 (0.485–0.529)	2% (1–12)	99% (98–100)	25% (1–81)	90% (86–92)	2.83	0.99
$\geq 0.35^\S$	0.705 (0.633–0.777)	67% (52–81)	74% (69–78)	23% (16–31)	95% (92–97)	2.56	0.44
FIB-4							
$\geq 1.45^\dagger$	0.597 (0.529–0.664)	28% (16–44)	91% (88–94)	27% (15–42)	92% (88–94)	3.16	0.79
$\geq 3.25^\dagger$	0.519 (0.489–0.549)	4% (1–15)	99% (98–100)	50% (7–93)	90% (87–93)	8.50	0.96
$\geq 1.03^\S$	0.721 (0.651–0.792)	70% (54–82)	75% (70–79)	24% (17–33)	95% (92–98)	2.75	0.41
NAFLD Fibrosis Score							
$\geq -1.455^\dagger$	0.710 (0.639–0.782)	67% (52–81)	75% (70–79)	24% (17–32)	95% (92–97)	2.66	0.44
$\geq 0.676^\dagger$	0.544 (0.498–0.590)	11% (4–24)	98% (96–99)	39% (14–68)	90% (87–93)	5.31	0.91
$\geq -1.255^\S$	0.730 (0.658–0.802)	65% (50–79)	81% (77–85)	29% (20–38)	95% (92–97)	3.40	0.43

APRI, Aspartate-to-Platelet Ratio Index; CI, confidence interval; FIB-4, Fibrosis-4 score; LR, likelihood ratio; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value; ROC, receiver operator curve.

Predictive models for detection of NAFLD or advanced liver fibrosis: † previous validated thresholds; § maximum Younden Index thresholds in this study.

Table 4 Accuracy of serological biomarkers/predictive models for detection of advanced fibrosis [LSM \geq 8.7 kPa (M probe) or \geq 7.2 kPa (XL probe)] in HIV mono-infected patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [$n = 167$; prevalence of 38.2% (95% CI: 33.8–42.9)] based on controlled attenuation parameter (CAP \geq 248 dB/m)

Biomarker	ROC area (95% CI)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	PPV (95% CI)	NPV (95% CI)	LR+	LR-
APRI							
$\geq 1.00^\dagger$	0.496 (0.489–0.503)	0% (0–12)	99% (96–100)	0% (0–98)	83% (76–88)	0.00	1.00
$\geq 1.50^\dagger$	0.496 (0.489–0.503)	0% (0–12)	99% (96–100)	0% (0–98)	83% (76–88)	0.00	1.00
$\geq 0.35^\S$	0.700 (0.606–0.794)	69% (49–85)	71% (63–78)	33% (22–47)	92% (85–96)	2.38	0.44
FIB-4							
$\geq 1.45^\dagger$	0.553 (0.474–0.632)	21% (8–40)	90% (84–94)	30% (12–54)	84% (78–90)	2.04	0.88
$\geq 1.03^\S$	0.714 (0.621–0.808)	69% (49–85)	74% (66–81)	36% (23–50)	92% (85–96)	2.64	0.42
NAFLD Fibrosis Score							
$\geq -1.455^\dagger$	0.659 (0.567–0.752)	72% (53–87)	59% (51–68)	27% (18–39)	91% (83–96)	1.78	0.46
$\geq 0.676^\dagger$	0.562 (0.497–0.626)	14% (4–32)	99% (95–100)	67% (22–96)	85% (78–90)	9.52	0.88
$\geq -1.255^\S$	0.682 (0.588–0.776)	69% (49–85)	67% (59–75)	31% (20–43)	91% (84–96)	2.11	0.46

All patients with NAFLD had FIB-4 < 3.25. APRI, Aspartate-to-Platelet Ratio Index; CI, confidence interval; FIB-4, Fibrosis-4 score; LR, likelihood ratio; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value; ROC, receiver operator curve.

† Previous validated thresholds and § Maximum Younden Index thresholds in this study.

However, FIB-4 performed significantly worse in obese than in non-obese individuals [AUROC (95% CI) = 0.673 (95.0540–0.806) *vs.* 0.831 (0.759–0.904); $P = 0.041$]. We acknowledge that biomarkers that use transaminases in their formula to predict advanced fibrosis may be impacted by necro-inflammatory activity, leading to an overestimation of the fibrosis stage. Recently, a new non-

invasive blood-based test (NIS4 algorithm) that did not require adjustment for age, sex, BMI or aminotransferase levels was proposed and validated for detection of NASH. However, the derived NIS4 algorithm comprises parameters that are complex and not available worldwide, such as miR-34a-5p, alpha-2 macroglobulin, YKL-40 and glycated haemoglobin [41].

The major limitation of this study was the absence of MRS or liver biopsy to assess the diagnostic performance of predictive models for NAFLD and advanced fibrosis, respectively. MRS is costly and not widely available in low- and middle-income countries. Additionally, the performance of a liver biopsy in the absence of suspected liver disease in PLWH would pose an unnecessary risk to the participant. In addition, we used validated tools for the detection of steatosis and the staging of liver fibrosis in uninfected subjects. CAP has been validated for diagnosing liver steatosis in uninfected individuals [42]. We are aware that data on the diagnostic accuracy of CAP in PLWH are scarce. The ANRS-ECHAM study reported good performance of CAP [AUROC = 0.87 (95% CI: 0.76–0.99)] and optimal cut-off > 280 dB/m to detect moderate to severe steatosis (> 30% of hepatocytes) using liver biopsy as the reference [43]. The CAP threshold used to define NAFLD (grade I; > 5% of steatosis without abusive alcohol intake) in the present study was established through an individual patient data meta-analysis that included 2735 uninfected individuals using liver biopsy as the reference [12]. Several studies have been using similar CAP cut-off values to define presence of steatosis in individuals with HIV infection [32,33,35]. In addition, LSM was extensively validated to stage liver fibrosis in different scenarios [38,44] and this method has been proposed by experts [45] and recommended by international guidelines for detecting advanced fibrosis/cirrhosis in people with chronic liver diseases [23–25]. However, we acknowledge that there is no consensus on the LSM cut-off that should be used to stage liver fibrosis in HIV mono-infected patients. Morse *et al.* [46] reported LSM ≥ 7.1 kPa as the optimal cut-off to detect significant fibrosis in a limited sample size of HIV mono-infected individuals with elevated liver enzymes. In addition, the ANRS-ECHAM group used this same LSM threshold to propose liver biopsy in a large European cohort of HIV mono-infected with persistently elevated transaminases and/or metabolic syndrome [43]. Therefore, the presence of NAFLD and/or advanced fibrosis were defined in the present study using cut-offs indicative of clinically relevant steatosis/fibrosis. We acknowledge a relatively low prevalence of advanced fibrosis in our study that might lead to a potential spectrum bias. This might be explained by the exclusion of patients with abusive alcohol intake (AUDIT < 8). The main strengths of our study include a relatively large sample size of patients with HIV mono-infection with high prevalence of NAFLD, the evaluation of alcohol intake by AUDIT score, the use of a centralized laboratory for blood tests to calculate predictive models for liver diseases and the fact that all TE exams were performed by a

single experienced operator to determine NAFLD and advanced fibrosis. In addition, anthropometric measures, blood sample and liver elastography were performed on the same day.

In conclusion, predictive models using serological parameters and anthropometric measures are accurate and inexpensive tools for identifying people with HIV infection at high risk of NAFLD and/or advanced fibrosis. These predictive models can be an alternative for screening liver diseases in PLWH in resource-limited settings. Subjects presenting high values of these tests might be referred to tertiary centres for diagnosis confirmation and/or clinical management. The integration of simple non-invasive tests into HIV care can be useful to decrease the burden of liver-related complications in HIV-infected individuals.

Acknowledgements

All data from the current study were reported in the manuscript, tables and supplementary material. In addition, data are available upon request from HP, the corresponding author, from The National Institute of Infectious Disease Evandro Chagas – Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro (RJ), Brazil.

Conflict of interest: The authors declare that there are no conflicts of interest regarding to this topic.

Financial disclosure: This study was supported by the International Society for Infectious Diseases (ISID Research Grant 2016 to HP); Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (E-26/110.268/2014 to VGV; E26/203.172/2017 to AGP); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Universal 2016 (405.211/2016-3 to HP) and Programa Ciências Sem Fronteiras – Bolsa Jovens Talentos/CNPq (407.410/2013-9 to BG and 301.520/2014-3 to HP); Programa INOVA-FIOCRUZ (Ideias Inovadoras – VPPIS-001-FIO-18-35 to HP). The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author contributions

CY: data collection, interpretation of data, drafting and critical revision of the manuscript. AGP: study concept and design, interpretation of data, critical revision of the manuscript. SWC and EP: interpretation of data and critical revision of the manuscript. UBC, GF, RS and MM: data collection, interpretation of data and critical revision of the manuscript. VGV and BG: study concept and design, study supervision, interpretation of data and critical revision of the manuscript. HP: study concept and

design, study supervision, data collection, drafting, interpretation of data and critical revision of the manuscript.

References

- 1 Maurice JB, Patel A, Scott AJ, Patel K, Thursz M, Lemoine M. Prevalence and risk factors of nonalcoholic fatty liver disease in HIV-monoinfection. *AIDS* 2017; 31: 1621–1632.
- 2 Diehl AM, Day C. Cause, Pathogenesis, and Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis. *N Engl J Med.* 2017; 377: 2063–2072.
- 3 Perazzo H, Poynard T, Dufour JF. The interactions of nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular diseases. *Clin Liver Dis* 2014; 18: 233–248.
- 4 Pais R, Giral P, Khan JF *et al.* Fatty liver is an independent predictor of early carotid atherosclerosis. *J Hepatol* 2016; 65: 95–102.
- 5 Hagstrom H, Nasr P, Ekstedt M *et al.* Fibrosis stage but not NASH predicts mortality and time to development of severe liver disease in biopsy-proven NAFLD. *J Hepatol* 2017; 67: 1265–1273.
- 6 Bedossa P, Dargere D, Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 1449–1457.
- 7 Tsai E, Lee TP. Diagnosis and evaluation of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis, including noninvasive biomarkers and transient elastography. *Clin Liver Dis* 2018; 22: 73–92.
- 8 Chou R, Wasson N. Blood tests to diagnose fibrosis or cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Ann Intern Med* 2013; 159: 372.
- 9 Perazzo H, Cardoso SW, Yanavich C *et al.* Predictive factors associated with liver fibrosis and steatosis by transient elastography in patients with HIV mono-infection under long-term combined antiretroviral therapy. *J Int AIDS Soc* 2018; 21: e25201.
- 10 Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome—a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med* 2006; 23: 469–480.
- 11 de Ledingham V, Vergniol J. Transient elastography (FibroScan). *Gastroenterol Clin Biol* 2008; 32: 58–67.
- 12 Karlas T, Petroff D, Sasso M *et al.* Individual patient data meta-analysis of controlled attenuation parameter (CAP) technology for assessing steatosis. *J Hepatol* 2017; 66: 1022–1030.
- 13 Wong VW, Vergniol J, Wong GL *et al.* Liver stiffness measurement using XL probe in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol* 2012; 107: 1862–1871.
- 14 Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L *et al.* The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol* 2006; 6: 33.
- 15 Lee JH, Kim D, Kim HJ *et al.* Hepatic steatosis index: a simple screening tool reflecting nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis* 2010; 42: 503–508.
- 16 Kotronen A, Peltonen M, Hakkarainen A *et al.* Prediction of non-alcoholic fatty liver disease and liver fat using metabolic and genetic factors. *Gastroenterology* 2009; 137: 865–872.
- 17 Perazzo H, Bensenor I, Mill JG *et al.* Prediction of liver steatosis applying a new score in subjects from the Brazilian longitudinal study of adult health. *J Clin Gastroenterol* 2020; 54: e1–e10.
- 18 Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ *et al.* A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 518–526.
- 19 Vallet-Pichard A, Mallet V, Nalpas B *et al.* FIB-4: an inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. comparison with liver biopsy and fibrotest. *Hepatology* 2007; 46: 32–36.
- 20 Angulo P, Hui JM, Marchesini G *et al.* The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology* 2007; 45: 846–854.
- 21 DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 1988; 44: 837–845.
- 22 Lombardi R, Sambatakou H, Mariolis I, Cokkinos D, Papatheodoridis GV, Tsochatzis EA. Prevalence and predictors of liver steatosis and fibrosis in unselected patients with HIV mono-infection. *Dig Liver Dis* 2016; 48: 1471–1477.
- 23 Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE *et al.* The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 2017; 67: 328–357.
- 24 European Association for Study of Liver; Asociacion Latinoamericana para el Estudio del Hígado. European Association for Study of L and Asociacion Latinoamericana para el Estudio del H. EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *J Hepatol* 2015; 63: 237–264.
- 25 Shiha G, Ibrahim A, Helmy A *et al.* Asian-Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) consensus guidelines on invasive and non-invasive assessment of hepatic fibrosis: a 2016 update. *Hepatol Int* 2017; 11: 1–30.
- 26 Ruhl CE, Everhart JE. Fatty liver indices in the multiethnic United States National Health and Nutrition Examination Survey. *Aliment Pharmacol Ther* 2015; 41: 65–76.
- 27 Koehler EM, Schouten JN, Hansen BE, Hofman A, Stricker BH, Janssen HL. External validation of the fatty liver index

- for identifying nonalcoholic fatty liver disease in a population-based study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013; 11: 1201–1204.
- 28 Xia MF, Yki-Jarvinen H, Bian H *et al*. Influence of ethnicity on the accuracy of non-invasive scores predicting non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One* 2016; 11: e0160526.
 - 29 Yang BL, Wu WC, Fang KC *et al*. External validation of fatty liver index for identifying ultrasonographic fatty liver in a large-scale cross-sectional study in Taiwan. *PLoS One* 2015; 10: e0120443.
 - 30 Fedchuk L, Nascimbeni F, Pais R, Charlotte F, Housset C, Ratziu V. Performance and limitations of steatosis biomarkers in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2014; 40: 1209–1222.
 - 31 Atabaki-Pasdar N, Ohlsson M, Vinuela A *et al*. Predicting and elucidating the etiology of fatty liver disease: a machine learning modeling and validation study in the IMI DIRECT cohorts. *PLoS Med* 2020; 17: e1003149.
 - 32 Macias J, Gonzalez J, Tural C *et al*. Prevalence and factors associated with liver steatosis as measured by transient elastography with controlled attenuation parameter in HIV-infected patients. *AIDS* 2014; 28: 1279–1287.
 - 33 Vuille-Lessard E, Lebouche B, Lennox L *et al*. Nonalcoholic fatty liver disease diagnosed by transient elastography with controlled attenuation parameter in unselected HIV monoinfected patients. *AIDS* 2016; 30: 2635–2643.
 - 34 Mohr R, Boesecke C, Dold L *et al*. Return-to-health effect of modern combined antiretroviral therapy potentially predisposes HIV patients to hepatic steatosis. *Medicine (Baltimore)* 2018; 97: e0462.
 - 35 Aepfelbacher JA, Balmaceda J, Purdy J *et al*. Increased prevalence of hepatic steatosis in young adults with lifelong HIV. *J Infect Dis* 2019; 220: 266–269.
 - 36 Balakrishnan M, Seth A, Cortes-Santiago N *et al*. External validation of four point-of-care noninvasive scores for predicting advanced hepatic fibrosis in a predominantly hispanic NAFLD population. *Dig Dis Sci* 2020. <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06501-1>. Online ahead of print.
 - 37 Houot M, Ngo Y, Munteanu M, Marque S, Poynard T. Systematic review with meta-analysis: direct comparisons of biomarkers for the diagnosis of fibrosis in chronic hepatitis C and B. *Aliment Pharmacol Ther* 2016; 43: 16–29.
 - 38 Xiao G, Zhu S, Xiao X, Yan L, Yang J, Wu G. Comparison of laboratory tests, ultrasound, or magnetic resonance elastography to detect fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis. *Hepatology* 2017; 66: 1486–1501.
 - 39 Maurice JB, Goldin R, Hall A *et al*. Increased BMI and Type 2 diabetes are the main predictors of NAFLD and advanced fibrosis in liver biopsies of patients with HIV mono-infection. *Clin Infect Dis* 2020. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1302>. Online ahead of print.
 - 40 Iogna Prat L, Roccarina D, Lever R *et al*. Etiology and severity of liver disease in HIV-positive patients with suspected NAFLD: lessons from a cohort with available liver biopsies. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2019; 80: 474–480.
 - 41 Harrison SA, Ratziu V, Boursier J *et al*. A blood-based biomarker panel (NIS4) for non-invasive diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis and liver fibrosis: a prospective derivation and global validation study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2020; 5: 970–985.
 - 42 Stern C, Castera L. Non-invasive diagnosis of hepatic steatosis. *Hepatol Int* 2017; 11: 70–78.
 - 43 Lemoine M, Assoumou L, De Wit S *et al*. Diagnostic accuracy of noninvasive markers of steatosis, NASH, and liver fibrosis in HIV-monoinfected individuals at risk of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): results from the ECHAM study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2019; 80: e86–e94.
 - 44 Bota S, Herkner H, Sporea I *et al*. Meta-analysis: ARFI elastography versus transient elastography for the evaluation of liver fibrosis. *Liver Int* 2013; 33: 1138–1147.
 - 45 Castera L, Vilgrain V, Angulo P. Noninvasive evaluation of NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; 10: 666–675.
 - 46 Morse CG, McLaughlin M, Proschan M *et al*. Transient elastography for the detection of hepatic fibrosis in HIV-monoinfected adults with elevated aminotransferases on antiretroviral therapy. *AIDS* 2015; 29: 2297–2302.

Supporting Information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Table S1. Accuracy of Steato-ELSA calculated without fasting insulin compared to Steato-ELSA with fasting insulin in its formula for detection of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [CAP \geq 248 dB/m]

Table S2. Accuracy of serological biomarkers/predictive models for detection of NAFLD [CAP \geq 248 dB/m] according to previous validated thresholds

Table S3. Accuracy of serological biomarkers/predictive models for detection of advanced fibrosis [defined by LSM \geq 8.7 kPa (M probe) or \geq 7.2 kPa (XL probe)] according to previous validated thresholds

Fig. S1. Box plots representing the relationship between [A] Fatty Liver Index (FLI), [B] Hepatic Steatosis Index (HSI), [C] NAFLD Liver Fat Score (NAFLD-LFS) and [D] Steato-ELSA and the presence of NAFLD defined by

Controlled Attenuation Parameter (CAP \geq 248 dB/m) of transient elastography

Fig. S2. Box plots representing the relationship between [A] Aspartate-to-Platelet Ratio Index (APRI), [B] Fibrosis-4 score (FIB-4) and [C] NAFLD Fibrosis Score

(NFS) the presence of advanced fibrosis ($F \geq 3$ METAVIR) defined by liver stiffness measurement (LSM \geq 8.7 kPa by M probe or \geq 7.2 kPa by XL probe of transient elastography

6. SEGUNDO ARTIGO

Autores:

Carolyn Yanavich^{1,2}, Hugo Perazzo¹, Fan Li², Nicole Tobin², David Lee², Sara Zabih², Michelle Morata¹, Cristiane Almeida¹, Valdilea G. Veloso¹, Beatriz Grinsztejn¹ and Grace M. Aldrovandi²

¹ *Laboratory of clinical research in STD/AIDS (LAPCLIN-AIDS), National Institute of Infectious Diseases Evandro Chagas-Oswaldo Cruz Foundation (INI/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil;* ² *University of California Los Angeles (UCLA)*

Publicado em revista de AIDS

A pilot study of microbial signatures of liver disease in those with HIV mono-infection in Rio de Janeiro, Brazil

Carolyn Yanavich^{a,b}, Hugo Perazzo^a, Fan Li^b, Nicole Tobin^b, David Lee^b, Sara Zabih^b, Michelle Morata^a, Cristiane Almeida^a, Valdilea G. Veloso^a, Beatriz Grinsztejn^a and Grace M. Aldrovandi^b

Objective: The rectal microbiome was examined to assess the relationship between the microbiome and liver disease in HIV-infection.

Design: Eighty-two HIV-1 mono-infected individuals from the PROSPEC-HIV-study (NCT02542020) were grouped into three liver health categories based on results of controlled attenuation parameter (CAP) and liver stiffness measurement (LSM) of transient elastography: normal ($n = 30$), steatosis ($n = 30$), or fibrosis ($n = 22$).

Methods: Liver steatosis and fibrosis were defined by CAP at least 248 dB/m and LSM at least 8.0 kPa, respectively. 16S rRNA gene and whole genome shotgun metagenomic sequencing were performed on rectal swabs. Bacterial differences were assessed using zero-inflated negative binomial regression and random forests modeling; taxonomic drivers of functional shifts were identified using FishTaco.

Results: Liver health status explained four percentage of the overall variation ($r^2 = 0.04$, $P = 0.003$) in bacterial composition. Participants with steatosis had depletions of *Akkermansia muciniphila* and *Bacteroides dorei* and enrichment of *Prevotella copri*, *Fingoldia magna*, and *Ruminococcus bromii*. Participants with fibrosis had depletions of *Bacteroides stercoris* and *Parabacteroides distasonis* and enrichment of *Sneathia sanguinegens*. In steatosis, functional analysis revealed increases in primary and secondary bile acid synthesis encoded by increased *Eubacterium rectale*, *F. magna*, and *Faecalibacterium prausnitzii* and decreased *A. muciniphila*, *Bacteroides fragilis* and *B. dorei*. Decreased folate biosynthesis was driven by similar changes in microbial composition.

Conclusion: HIV mono-infection with steatosis or fibrosis had distinct microbial profiles. Some taxa are similar to those associated with non-alcoholic fatty liver disease in HIV-negative populations. Further studies are needed to define the role of the gut microbiota in the pathogenesis of liver disease in HIV-infected persons.

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

AIDS 2022, **36**:49–58

Keywords: 16S sequencing, fatty liver, HIV infection, liver disease, microbiome, shotgun sequencing

^aLaboratory of Clinical Research in STD/AIDS (LAPCLIN-AIDS), Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases-Oswaldo Cruz Foundation (INI/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil, and ^bDepartment of Pediatrics, University of California, Los Angeles (UCLA), Los Angeles, California, USA.

Correspondence to Grace M. Aldrovandi, MD, Department of Pediatrics, University of California, Los Angeles, MacDonal Research Laboratory, 675 Charles E Young Dr S, Room 4780 (MRL 4-780), Los Angeles, CA 90095, USA.

E-mail: galdrovandi@mednet.ucla.edu, gracea@mac.com

Received: 16 February 2021; revised: 25 July 2021; accepted: 28 July 2021.

DOI:10.1097/QAD.0000000000003084

Background

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), one of the leading causes of chronic liver disease, is characterized by fat accumulation and might affect up to 30% of the general population worldwide [1]. The presence of metabolic features, including obesity and type-2 diabetes, are likely contributors to the current worldwide NAFLD epidemic [1]. The clinical presentation may range from simple steatosis to non-alcoholic steatohepatitis (NASH) that can progress to cirrhosis and its complications [2]. Liver fat accumulation without lobular inflammation seems to be a benign condition, but certain patients with hepatic steatosis progress to NASH-associated cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Liver biopsy remains the gold-standard for the diagnosis of NAFLD/NASH. Still, additional, non-invasive methods such as transient elastography have been validated for diagnosing NAFLD and advanced fibrosis/cirrhosis [3]. Advanced fibrosis stages, rather than the presence of NASH, predicts mortality and liver-related complications in patients with NAFLD [4].

The pathogenesis of NAFLD and progression to severe forms might be attributed to a combination of factors, including lifestyle, environment, diet, genetic susceptibility, and metabolic syndrome [5]. More recently, several studies have described gut microbial dysbiosis as a key driver in the pathogenesis of fat accumulation and progression to advanced fibrosis/cirrhosis. Gut dysbiosis can result in changes to insulin sensitivity and intestinal barrier disruptions leading to increased inflammatory response, bacterial translocation, and subsequent liver inflammation. In the last decade, several studies reported the burden of NAFLD and the presence of fibrosis in people living with HIV/AIDS (PWH), suggesting that HIV infection might be an important factor for fatty liver [6,7]. However, available data on the relationship of the gut microbiome and liver disease are scarce in resource-limited settings, particularly in PWH. The current study aimed to characterize the gut microbiome in HIV mono-infected patients with liver steatosis and fibrosis compared with HIV individuals without liver disease in Rio de Janeiro, Brazil.

Methods

Study population

The current cross-sectional study analyzed data of HIV mono-infected adults who were prospectively enrolled between June 2015 and May 2017 in the PROSPEC-HIV study (NCT02542020) conducted at the National Institute of Infectious Disease (INI/FIOCRUZ) in Rio de Janeiro, Brazil [7]. As participants were enrolled in conjunction with the parent PROSPEC-HIV study, they were first selected for the parent study and then offered

enrollment into the sub-study. The sub-study enrolled opportunistically into three categories based on results of transient elastography by FibroScan (EchoSens, Paris, France): normal group (patients without liver steatosis or fibrosis); steatosis group (patients with liver steatosis and without fibrosis) and fibrosis group (patients with liver fibrosis independently of presence of steatosis). Patients fulfilled the groups as 'first come, first served' in the slot categories, with the normal group completing enrollment first followed by the steatosis group. Individuals with a history of antibiotic use within the past three months or those with viral hepatitis co-infection were excluded. The alcohol usage assessment was performed using the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT) score and drinking patterns. For this sub-study, a single collection of rectal swabs for microbial sequencing was performed. Rectal swabs were collected instead of stool samples to ensure that the sample was able to be collected on the same day as other study procedures. Prior studies have demonstrated that there are minimal differences in bacterial community composition of rectal swab samples versus that of freshly passed stool samples [8,9].

This protocol was approved by the Ethical Committee of INI/FIOCRUZ (IRB number 32889514.4.0000.5262), and all patients signed an informed consent form before study enrollment.

Data collection and definitions

The presence of liver disease was defined by transient elastography (EchoSens, Paris, France) performed by a single experienced operator (H.P.). In brief, transient elastography was performed with the M probe and was considered reliable when the following criteria had been met: 10 successful measurements; an interquartile range (IQR) lower than 30% of the median value of liver stiffness measurement (LSM) for fibrosis and controlled attenuation parameter (CAP) for steatosis; and a success rate of more than 60% [10]. At enrollment, study participants were stratified into three categories ('normal', 'steatosis', or 'fibrosis' groups) according to overall liver health as determined by CAP and LSM from transient elastography. Liver steatosis and fibrosis were defined as having a CAP at least 248 dB/m and an LSM at least 8.0 kPa [11], respectively. Rectal swabs (FLOQSwabs, Copan Diagnostics, Murrieta, California, USA) were collected and cryopreserved in Allprotect tissue reagent (Qiagen, Hilden, Germany) media and stored at -80°C within 6 h of collection.

Demographic, clinical, and laboratory data was collected as part of the parent PROSPEC-HIV study, in which the methodology was described elsewhere [7]. Rectal swab collection was performed on the same day of data collection and transient elastography. Briefly, data included demographic characteristics, anthropometric measures, serum chemistry testing, including alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase

(AST), gamma-glutamyl transferase (GGT), and lipid analysis, and comorbidities, comedications, alcohol and tobacco patterns, and nutritional assessment [7]. The International Diabetes Foundation standards [12] were used to assess central obesity, hypertension, type 2 diabetes, metabolic syndrome, and dyslipidemia. The dietary assessment was an average of three collection time points and was performed according to the Automated Multiple Pass Method [13] where each participant was asked to recall a detailed description of all food and drink consumed during the past 24 h. Caloric consumption and quantification of macronutrients were calculated using the Diet Win Professional Plus program. As described in the primary PROSPEC-HIV study, current and cumulative antiretroviral regimens were classified as backbone drug [tenofovir (TDF) versus zidovudine (ZDV)] and core drug classes [non-nucleoside reverse-transcriptase inhibitors (NNRTIs) versus protease inhibitor or integrase strand transfer inhibitors (INSTIs)]. The use of TDF, abacavir, emtricitabine, or tenofovir alafenamide was considered as a TDF-backbone [7]. Similarly, the use of ZDV, didanosine (ddI), stavudine (d4T), or zalcitabine (ddC) were considered as an ZDV-backbone. Treatment by any NNRTI or protease inhibitor/INSTI defined these core drug classes.

16S rRNA microbial profiling

Targeted sequencing of the V4 region of the 16S rRNA gene was performed according to methods previously described by Bender *et al.* [14]. The DADA2 software was used for error correction, sequence interference, and chimera removal [15]. The ribosomal database project naïve Bayesian classifier within the 'dada2' R package was used to perform taxonomic classification. Additional statistical analyses were performed using the 'phyloseq', 'pscl', 'vegan', and 'randomForest' R packages. Sample rarefaction at 27 402 reads was used for calculation of alpha diversity metrics. Random forests classification models were trained using genus-level relative abundances and other covariates, including age, sex, BMI, nadir and current CD4⁺ cell counts, diabetes, hypertension, dyslipidemia, antiretroviral therapy (ART) use and cumulative ART regimens. Only taxa present with at least 1% relative abundance in more than 10% of the samples were used to reduce the size of the feature set. Mean importance scores were computed for each covariate using 100 permutations and 10 000 trees per forest. A sparse model was constructed by including all covariates with a mean importance greater than 0.001, up to a maximum of 30. Zero-inflated negative binomial (ZINB) regression was also utilized to identify differentially abundant taxa. All *P* values were corrected for multiple testing using the Benjamini–Hochberg false discovery rate method. An adjusted *P* value of less than 0.1 was considered significant.

Shotgun metagenomics

Whole-genome shotgun sequencing was performed from rectal swabs in participants with normal liver status (*N* = 30), steatosis (*N* = 30), and fibrosis (*N* = 22) to an

average depth of 38 984 068 ± 12 462 099 reads per sample. Adapter trimming and quality filtering were performed using trim_galore, host sequences were removed using kneadData, and taxonomic classification was performed with Kraken (v0.15-beta). Functional profiling was performed using HUMAnN2, and differentially abundant pathways were identified using the 'DESeq2' R package (version 1.16.1). FishTaco (version 1.1.1) was used to identify taxonomic drivers of functional shifts in the microbiome of those with steatosis and fibrosis [16].

Statistical considerations

Multiple-group comparisons were performed using Kruskal–Wallis tests for numeric data. The *P* values for the baseline characteristics for the 82 participants were calculated using Fisher's exact test for categorical data. *P* values less than 0.05 were considered significant.

Results

Demographics and clinical data

A total of 82 HIV-infected participants [66% women, median (IQR) age of 46 (41–52) years, nadir CD4⁺ cell count of 191 (86–299) cells/μl and ALT levels = 34 (23–46) UI/l] were enrolled. The stages of liver health of the 82 participants varied according to transient elastography: 30 have no steatosis or fibrosis (normal), 30 presented with steatosis, and 22 had fibrosis.

The normal and steatosis groups had median ages of 46 and 44 years, respectively, while the fibrosis group had a higher median age of 53 years (Wilcoxon *P* = 0.001 for both comparisons). The median BMI was significantly increased in patients with liver steatosis (*P* = 0.001) or fibrosis (*P* = 0.002) compared with those in the normal group (see Table 1). Patients with liver fibrosis were more likely to have type 2 diabetes [36.4 versus 16.6% (steatosis, *P* = 0.195) and none (normal, *P* = 0.001)], and hypertension [50 versus 16.6% (steatosis and normal); *P* = 0.023 for both]. Patients with steatosis had a higher proportion of AZT backbone cumulative [63.3 versus 45.5% (fibrosis, *P* = 0.317) and 26.7% (normal, *P* = 0.009)] and current use [43.3 versus 13.6% (fibrosis, *P* = 0.047) and 13.3% (normal, *P* = 0.022)]. An analysis of serological biomarkers for the detection of NAFLD and/or the presence of advanced fibrosis was previously summarized for the parent PROSPEC study [17]. The following serological biomarkers were used in the PROSPEC analysis for the detection of steatosis [Steato-ELSA, Fatty Liver Index, Hepatic Steatosis Index, NAFLD Liver Fat Score (NAFLD-LFS)] and fibrosis (FIB-4, APRI and NAFLD Fibrosis Score) and indicated that biomarkers for steatosis were accurate and those for fibrosis showed high specificity and negative predictive value.

Table 1. Baseline characteristics for the 82 participants.

Total, n = 82	Normal, n = 30	Steatosis, n = 30	Fibrosis, n = 22	P value
Age, median	45.8 (IQR 40.0–50.4)	43.9 (IQR 40.3–48.3)	52.5 (IQR 50.5–63.3)	0.0005
BMI, median	26.6 (IQR 23.5–27.4)	29.4 (IQR 27.1–32.0)	29.9 (IQR 27.5–32.6)	0.003
Sex (men/women)	4 (13%)/26 (86%)	14 (46%)/16 (53%)	10 (45%)/12 (55%)	0.01
Hypertension, n	5 (16.6%)	5 (16.6%)	11 (50%)	0.009
Diabetes, n	0 (0%)	5 (16.6%)	8 (36.4%)	0.001
Dyslipidemia, n	5 (16.6%)	7 (23.3%)	8 (36.4%)	0.26
ART (years), median	7.6 (IQR 4.8–14.5)	8.2 (IQR 5.6–13.7)	10.2 (IQR 4.1–17.7)	0.72
Cumulative ART backbone (ZDV/TDF)	8 (26.7%)/22 (73.3%)	19 (63.3%)/11 (36.7%)	10 (45.5%)/12 (54.5%)	0.02
Current ART backbone (ZDV/TDF)	4 (13.3%)/26 (86.7%)	13 (43.3%)/17 (56.7%)	3 (13.6%)/19 (86.4%)	0.01
Nadir CD4 ⁺ (cells/ μ l), median	177.5 (IQR 98–262.5)	187 (IQR 103–276.5)	204 (77.8–322.5)	0.99
Current CD4 ⁺ (cells/ μ l), median	678 (IQR 457.25–912.75)	711 (IQR 385.5–939.5)	615.5 (IQR 398.3–871.5)	0.97
ALT (IU/l)	31 (IQR 21–36)	36.5 (IQR 25.5–56.8)	38 (IQR 28–46.8)	0.04
AST (IU/l)	22 (IQR 19–28)	24.5 (IQR 18.3–37.5)	29.5 (IQR 21.3–40.8)	0.07
ALP (IU/l)	98.3 (IQR 93.6–107.1)	105.3 (IQR 95.1–111)	92.1 (IQR 85–101.3)	0.02
GGT (IU/l)	33 (IQR 24.5–48.8)	50 (IQR 38–69)	53.5 (IQR 47.5–82.5)	0.0008
Albumin (mg/dl)	3.9 (IQR 3.7–4.2)	3.9 (IQR 3.8–4.2)	3.9 (IQR 3.8–4.0)	0.52
Fasting glucose (mg/dl)	91 (IQR 87.3–96.5)	96 (IQR 92–106.3)	96 (IQR 91.5–109.8)	0.007
Total cholesterol (mg/dl)	201.5 (IQR 157–212.5)	205 (IQR 180.5–222)	175.5 (IQR 165–199.8)	0.04
LDL (mg/dl)	118 (IQR 86.5–138.8)	116 (IQR 105–139.5)	99 (IQR 84–116)	0.06
HDL (mg/dl)	46.5 (IQR 40–65)	40 (IQR 32–55)	45 (IQR 35.5–56.8)	0.06
Triglycerides (mg/dl)	110.5 (IQR 67.3–133)	170 (IQR 110–264)	142 (IQR 96–204)	0.002
Statin use, n	4 (13.3%)	4 (13.3%)	9 (40.9%)	0.04
Triglyceride medication, n	2 (6.7%)	8 (26.7%)	1 (4.5%)	0.04

ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ART, antiretroviral therapy; GGT, gamma-glutamyl transferase; IQR, interquartile range; ZDV, zidovudine. P values were calculated using Fisher's exact test for categorical data and Kruskal–Wallis test for numeric data.

Microbial signatures in HIV-infected patients with liver disease

Overall bacterial compositions across the normal, steatosis, and fibrosis groups were similar (Fig. 1a), with a small but significant effect observed via principal coordinates analysis (PCoA) (Fig. 1b, PERMANOVA $r^2 = 0.04$, $P = 0.03$). No significant differences in bacterial diversity or *Bacteroides/Firmicutes* ratio were observed with advancing liver disease (Kruskal–Wallis rank sum test $P = 0.616$) (Fig. 1c).

Binary random forests modeling and ZINB regression revealed significant differences among key bacterial taxa in the steatosis and fibrosis cohorts versus those with normal liver assessments after adjusting for age, sex, and BMI (Fig. 2a).

Steatosis and fibrosis are associated with alterations in key microbes

The relative abundance of *Akkermansia* was significantly decreased ($Z = -3.02$; $\text{padj} = 0.012$) in the steatosis group relative to those with normal liver status, while the relative abundance of *Finegoldia* was increased ($Z = 1.031$; $\text{padj} = 0.085$). The accuracy of the steatosis versus normal liver model at the genus level was 66.67% [Matthew's correlation coefficient (MCC) = 0.3333, area under the curve (AUC) = 0.7511].

Analysis at the species level showed a slightly better predictive accuracy of 75.00% (MCC = 0.5003, AUC = 0.8189). In comparison with the normal group,

those with steatosis had decreased abundances of *Bacteroides dorei* ($Z = -3.268$; $\text{padj} = 0.024$) and *Akkermansia muciniphila* ($Z = -4.125$; $\text{padj} = 0.003$) and increased abundances of *Prevotella copri* ($Z = 1.559$; $\text{padj} = 0.019$), *Finegoldia magna* ($Z = 1.060$; $\text{padj} = 0.038$), and *Ruminococcus bromii* ($Z = 1.278$; $\text{padj} = 0.052$).

The relative abundances of *Parabacteroides* ($Z = -1.416$; $\text{padj} = 0.074$) and *Bacteroides* were significantly decreased ($Z = -1.166$; $\text{padj} = 0.097$) in the fibrosis group as compared with those with normal liver status; there were no significant increases in relative abundances in the fibrosis group. The accuracy of the fibrosis versus normal liver model at the genus level was 82.69% (MCC = 0.6438, AUC = 0.9061).

At the species level, the accuracy of the random forests model increased to 84.62%, (MCC = 0.6860, AUC = 0.9091) for the fibrosis group in comparison with the normal group. Participants with fibrosis had decreased abundances of *Bacteroides stercoris* ($Z = -2.535$, $\text{padj} = 0.0001$) and *Parabacteroides distasonis* ($Z = -1.060$; $\text{padj} = 0.040$) and an increased abundance of *Sneathia sanguinegens* ($Z = 5.414$, $\text{padj} = 0.066$).

Multi-class classification models also yielded above-baseline predictive accuracies at both the genus (59.76%, MCC = 0.3872) and species (63.41%, MCC = 0.4429) levels. Similar bacterial taxa were also identified as important predictors of liver health status (Fig. 2b).

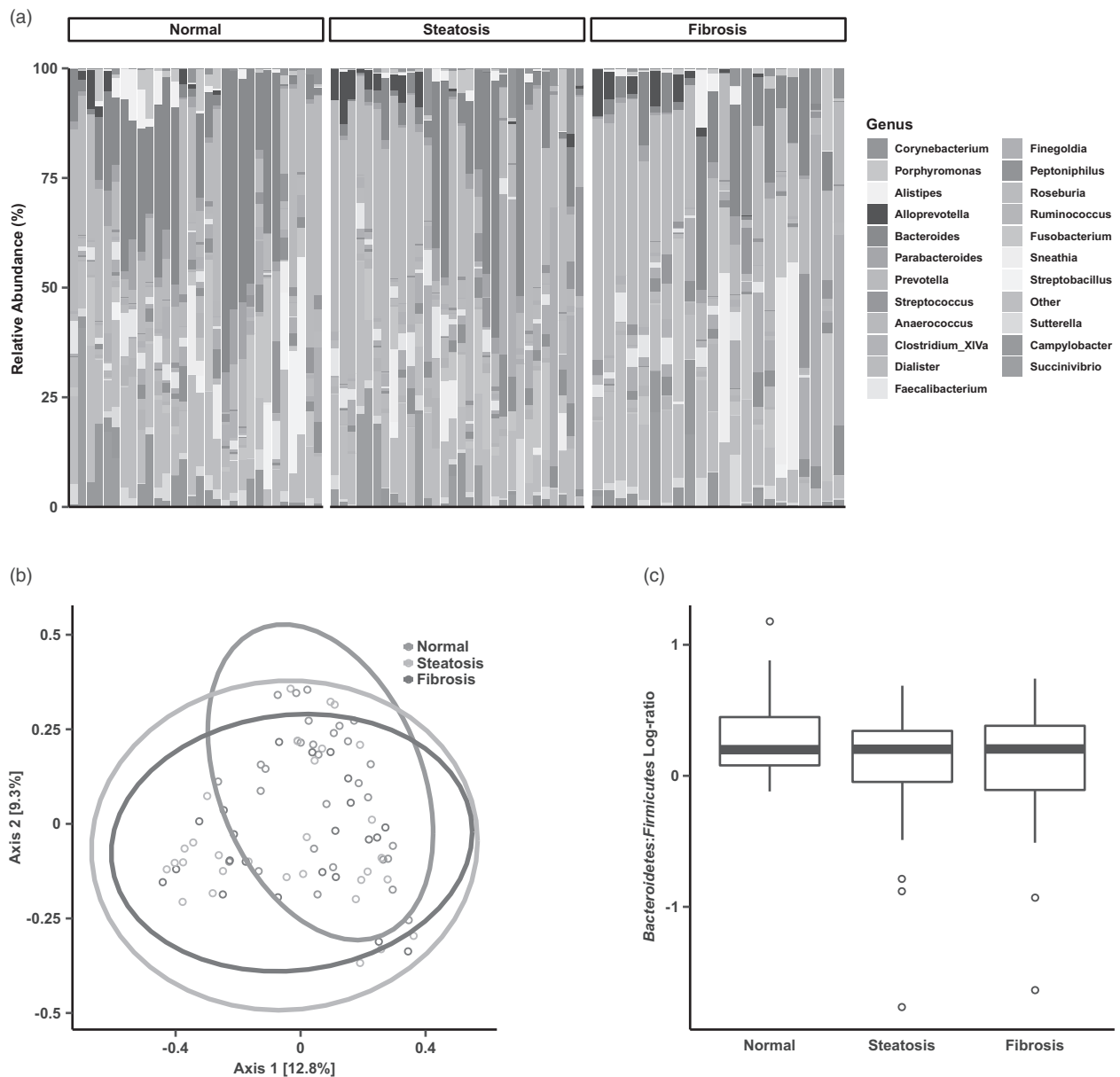


Fig. 1. (a) Genus-level taxonomic composition grouped by liver health status. (b) Principal coordinates analysis plot using Bray–Curtis distances. Ellipses show 95% confidence regions for each cohort. Percentages in brackets denote variation explained by each axis. (c) Boxplots of Bacteroidetes to Firmicutes ratio by liver health status (Kruskal–Wallis $P = 0.616$).

Microbially encoded functional changes in non-alcoholic fatty liver disease highlight contributions of key microbes

Shotgun metagenomic sequencing of the rectal swab specimens for the 82 participants was performed to characterize the functional differences of microbial communities in fatty liver disease.

An integrative analysis of bacterial drivers of functional shifts (FishTaco) revealed increases in primary and secondary bile

acid biosynthesis in the steatosis group relative to controls encoded primarily by increased abundances of *Eubacterium rectale*, *E. magna*, and *Faecalibacterium prausnitzii* (Fig. 3a) as well as decreased abundances of *A. muciniphila*, *Bacteroides fragilis* and *B. dorei* [18]. Decreased folate biosynthesis capacity was also observed in the steatosis group (Fig. 3b), primarily driven by similar changes in microbial composition and multiple species of *Prevotella*. Surprisingly, no significant differences in functional capacity were observed in the fibrosis group relative to controls.

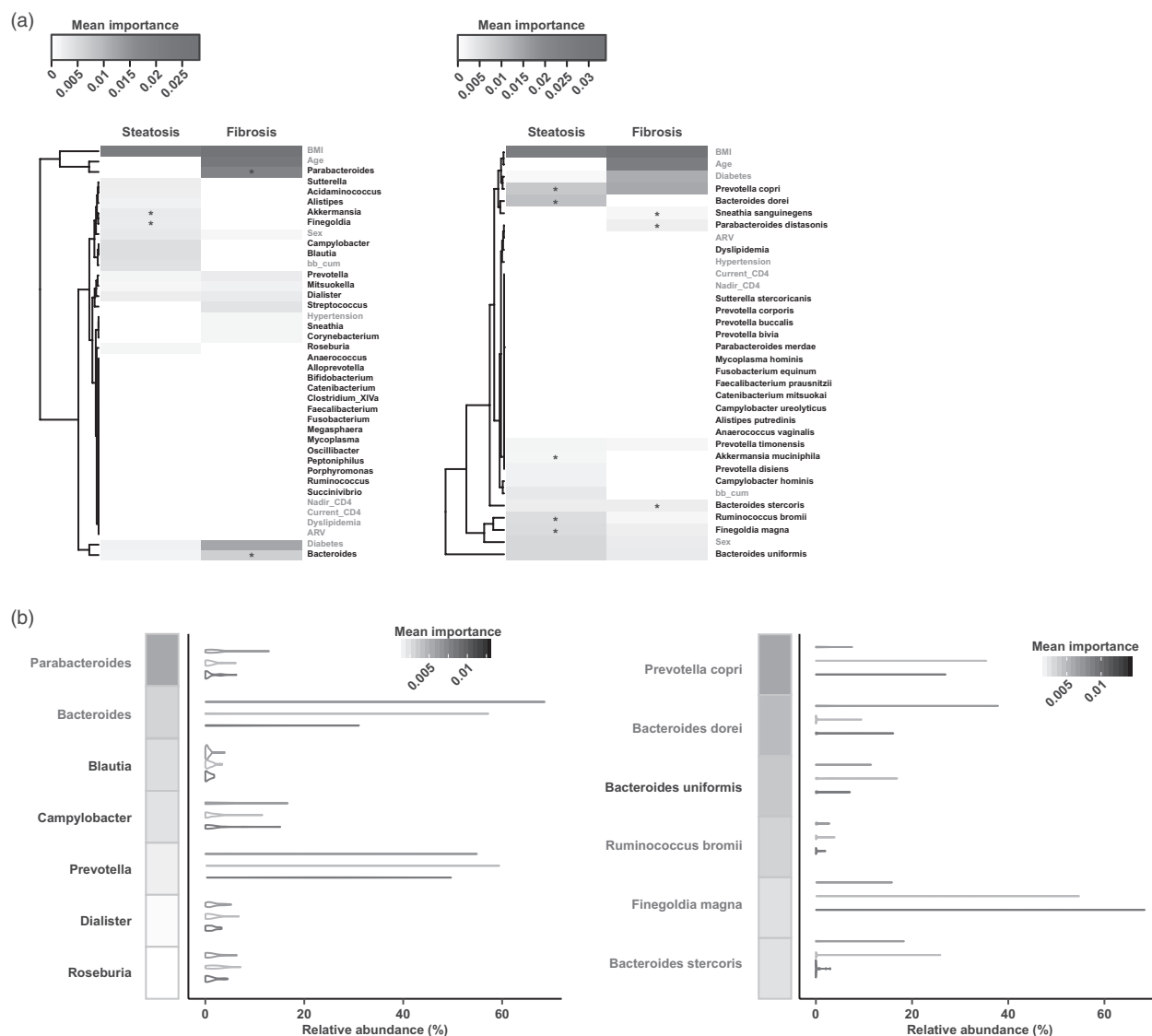


Fig. 2. Binary and multi-class classification models identify similar bacterial taxa as important predictors of liver health status.

(a) Predictive features for liver disease in binary random forests models. Random forests model importance values are shown as shaded with darker colors denoting higher mean importance. Asterisks (*) denote taxa identified as significantly altered in zero-inflated negative binomial regression models. (b) Distribution of taxa abundances for the features selected in the multi-class random forests models (violin plots). Random forests model importance values are shown as shaded boxes with darker colors denoting higher mean importance. Red text denotes taxa identified as significantly altered in zero-inflated negative binomial models. Panels (a) and (b) are separated as genus level (left) and species level (right).

Few effects of diet on microbial composition

There were no differences in overall microbiome composition by any dietary variable: total caloric intake ($P=0.68$), percentage carbohydrates ($P=0.94$), protein ($P=0.44$) or fat ($P=0.16$), cholesterol ($P=0.2$) or total fiber ($P=0.06$). In addition, there were no differences in bacterial diversity by any dietary variable. A few genera were differentially abundant by diet with *Clostridium sensu stricto* increased with percentage carbohydrates and total fiber and correspondingly decreased by the percentage fat in the diet. *Negativococcus* decreased with total fiber intake.

The relative abundance of *Dietzia* decreased with diets higher in protein and cholesterol.

Discussion

The current study highlighted the role of the gut microbiome in the development of liver steatosis and fibrosis in PWH. In our study of HIV mono-infected individuals, we found microbial perturbations, previously

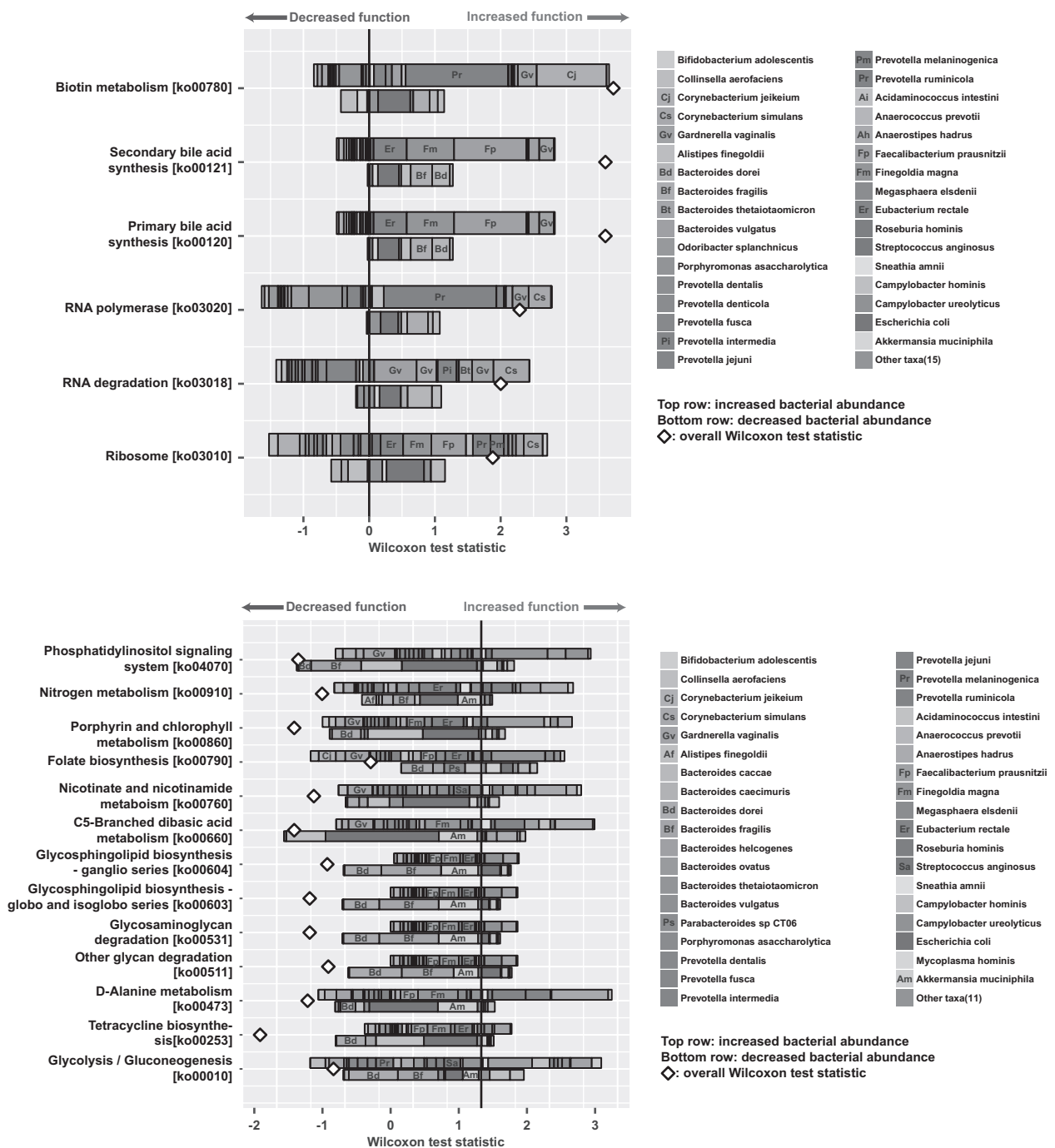


Fig. 3. Bacterial Composition by shotgun metagenomic sequencing and taxonomic drivers of functional shifts demonstrate the role of the bacteria in altering liver function in participants with steatosis. Functions significantly increased or decreased in participants with steatosis are shown in (a) and (b), respectively, with overall Wilcoxon test statistics shown as a diamond (\diamond). Taxa driving each functional shift are shown in the same direction as the diamond and taxa attenuating each shift are shown in the opposite direction as the diamond. Taxa enriched in steatosis are shown along the top row and taxa decreased in steatosis are shown along the bottom row for each pathway.

identified in other cohorts of NAFLD patients including increases in *P. copri*, as well as perturbations specific to our population, such as those associated with *E. rectale*, *F. magna*, *F. prausnitzii*, *A. muciniphila*, *B. fragilis*, *B. dorei* and various species of *Prevotella* that are associated with

functional shifts in bile acid and folate biosynthesis. There were no significant differences in macronutrient intake between the normal, steatosis, and fibrosis groups. This suggests that the dietary intake was not associated with the alterations in gut microbiota, as seen in the comparison

with overall liver health status. These results are similar to those observed in a lean, HIV-uninfected population in Brazil with evidence of liver disease [19]. Similarly, our observation of an elevated median BMI in patients with liver steatosis or fibrosis was consistent with prior data in HIV positive individuals. This may indicate that NAFLD may be associated with factors other than obesity such as HIV-infection and treatment [20]. Prior studies indicate that numerous non-antibiotic drugs, including antivirals, are capable of inhibiting the growth of one or more bacterial strain in the healthy human gut and possibly promoting antibiotic resistance [21]. This may also suggest that the use of antivirals has the potential to affect bacterial metabolism. Data from Villanueva-Millán *et al.* [22], suggested that NRTI and protease inhibitor-based regimens decreased bacterial diversity, while INSTI-based ARTs may not have a significant effect on the microbiome.

In our study, steatosis was associated with relative depletions of *A. muciniphila* and *B. dorei*, and fibrosis with depletions of *B. stercoris* and *P. distasonis*. The depletion of *Akkermansia* has been associated with thinning of the gut mucus layer, and the addition of *Akkermansia* has improved immune-mediated liver injury in mice [23,24]. In a cohort of Brazilian individuals with type 1 diabetes, lower levels of *B. dorei* and Parabacteroides were associated with loss of glycemic control [25]. Therefore, the species-specific loss of *B. dorei* may have an important role in multiple features of metabolic syndrome, including glycemic control and NAFLD.

P. copri, *F. magna*, and *R. bromii*, were increased in participants with steatosis and fibrosis (*P. copri*). Increases of *P. copri* have been associated with type 2 diabetes, insulin resistance, and glucose intolerance in humans and animals [26,27]. Similarly, in an earlier study by Zhu *et al.*, an increased abundance of Prevotella was also seen and associated with NAFLD [28]. Furthermore, at the genus level, *Prevotella* has been associated with increased LPS concentrations [26], which are implicated in the pathogenesis of the development of fibrosis in NAFLD [29]. *Ruminococci* are endogenous producers of alcohol, and increased abundances of this bacteria are associated with higher levels of branched-chain amino acids, hyperinsulinemia, and inflammatory cytokines [30]. Increased *Bacteroides* and *Ruminococcus* were associated with significant liver fibrosis ($F \geq 2$) [31] in a biopsy-proven NAFLD cohort [30].

The depletion of *A. muciniphila* and *B. dorei*, as well as the enrichment of *F. magna* and *E. rectale* in our HIV-infected participants with steatosis, may be associated with upregulation of genes encoding primary and secondary bile acid synthesis and downregulation in the genes encoding folate biosynthesis. Primary and secondary bile acid synthesis have both been implicated in NAFLD pathogenesis [29]. Folate biosynthesis also likely plays a

role in NAFLD pathogenesis and metabolic syndrome. In humans, low-serum folate levels are associated with obesity and diabetes. In rodent models, low levels of endogenous folate are associated with decreased one-carbon metabolism and may be linked to the development of metabolic diseases, including NAFLD [32].

Through this study, we identified potential microbial contributions to altered functional pathways of bile acid and folate biosynthesis that are likely contributors to fatty liver disease pathogenesis through oxidative stress. Significantly, decreases in *Bacteroides* and increases in *Prevotella* were associated with steatosis and fibrosis in our cohort, which is opposite to that observed in other NAFLD/NASH cohorts [28,30,33,34]. Whether these differences are due to the increases of *Bacteroides* in obesity [35,36], as our cohort is leaner, or perhaps due to a higher plant-based diet than a traditional Western diet, or are associated with HIV-infection is unclear.

Bacteroides are mostly decreased in cohorts of HIV-infected individuals [37–40]. In HIV-infected individuals, the gut microbiome composition shifts towards one that has a greater proportion of Gram-negative bacteria. This shift increases the potential for inducing systemic inflammation [41,42]. The data from this PROSPEC-HIV study support prior findings noting that alterations in both stool and mucosal microbial communities include increases in *Prevotella* family members and *Proteobacteria* and decreases in *Bacteroides* family members and *Firmicutes* [43]. These changes, especially of mucosa-associated bacteria, have been associated with markers of microbial translocation, inflammation, and immune activation [40,44].

The main limitation of this study is the lack of prospective, longitudinal data of this population. Additional limitations include the relatively small sample size, the lack of a robust gold standard to define steatosis and/or fibrosis, such as MRI or liver biopsy, and the absence of an uninfected control group. Liver biopsy is an invasive method, and the use of MRI is costly and not readily available globally. In addition, there may be ethical concerns about the risk of performing a liver biopsy in HIV-infected participants without suspicion of liver disease. Other potential limitations might be the fact that our cohort was predominantly women with a BMI lower than 30 kg/m² limiting the ability to determine if any microbial differences were driven by sex and obesity. Of note, in contrast to participants in other studies, participants in this study had a relatively lower BMI, with none having a BMI in the obese range. Despite the limited sample size, this pilot-study was helpful in generating a hypothesis on the relationship of gut microbiome dysbiosis and liver diseases in HIV-infected patients. However, larger, multi-center studies are needed to validate the effect of microbiome-derived signatures of fatty liver disease and progression to fibrosis in

HIV-infection. For data consistency, the gut microbiome was assessed on the same day of transient elastography, blood sample, and collection of dietary habits questionnaire in HIV mono-infected patients. In addition, patients with antibiotic use in the previous three months were excluded due to the risk of changes in the gut microbiome induced by drugs.

In summary, we describe microbial alterations in a cohort of HIV-1 mono-infected individuals: specifically, decreased abundances of *Akkermansia*, *Bacteroides*, and *Parabacteroides* and increased abundances of *Prevotella*, *Finegoldia*, and *Ruminococcus*. We further show how these microbial alterations are associated with the upregulation of genes encoding primary and secondary bile acid synthesis and downregulation of folate biosynthesis. These results differ from other cohorts, though it is unclear if the perturbations are related to the sex, presence of obesity, or HIV-infection. Perturbations in the microbiome and its metabolites play a role in inflammation and immune response. Additional studies to normalize the microbiome in those with HIV infection are needed to determine changes in clinical outcome of steatosis and fibrosis can be achieved. In addition, whether the alterations of *Bacteroides* and *Prevotella* have a role in the more rapid progression of fibrosis in HIV-infected individuals is an area that warrants further investigation.

Acknowledgements

The authors thank the investigators and contributors of LAPCLIN-AIDS (Laboratorio de Pesquisa Clinica em IST/AIDS) from INI/FIOCRUZ (Instituto Nacional de Infectologica Evandro Chagas Fundacao Oswaldo Cruz) and the University of California Los Angeles (UCLA) for their dedication and support of the PROSPEC-HIV study design, conduct, and analysis. In addition, we express our sincere appreciation to the participants for volunteering to participate in the PROSPEC-HIV study.

Author contributions: C.Y., H.P., and G.A. conceptualized and designed the study, collected, statistically analyzed and interpreted the data, and drafted and critically reviewed the article. G.A., F.L., N.T., D.L., and S.Z. prepared and analyzed laboratory data. G.A., F.L., N.T., and D.L. interpreted the data and critically reviewed the article. M.M. and C.A. collected and interpreted the data and critically reviewed the article. V.G.V. and B.G. conceptualized, and designed the study, supervised the study, interpreted the data, and critically reviewed the article.

The current study was supported by the UCLA Center for AIDS Research (CFAR) NIH/NIAID AI028697, the International Society for Infectious Diseases (ISID Research Grant 2016 to Hugo Perazzo); Fundação

Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (E-26/110.268/2014 to Valdilea G Veloso); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Universal 2016 (405.211/2016-3 to Hugo Perazzo) and Programa Ciências Sem Fronteiras – Bolsa Jovens Talentos/CNPq (407.410/2013-9 to Beatriz Grinsztejn and 301.520/2014-3 to Hugo Perazzo). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the article.

Conflicts of interest

The authors have no conflicts of interest to disclose.

References

1. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. **Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes.** *Hepatology* 2016; **64**:73–84.
2. Diehl AM, Day C. **Cause, pathogenesis, and treatment of nonalcoholic steatohepatitis.** *N Engl J Med* 2017; **377**:2063–2072.
3. Wong VW, Vergniol J, Wong GL, Foucher J, Chan HL, Le Bail B, *et al.* **Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease.** *Hepatology* 2010; **51**:454–462.
4. Hagstrom H, Nasr P, Ekstedt M, Hammar U, Stål P, Hultcrantz R, Kechagias S. **Fibrosis stage but not NASH predicts mortality and time to development of severe liver disease in biopsy-proven NAFLD.** *J Hepatol* 2017; **67**:1265–1273.
5. Day CP, James OF. **Steatohepatitis: a tale of two ‘hits’?** *Gastroenterology* 1998; **114**:842–845.
6. Mohr R, Boesecke C, Dold L, Schierwagen R, Schwarze-Zander C, Wasmuth JC, *et al.* **Return-to-health effect of modern combined antiretroviral therapy potentially predisposes HIV patients to hepatic steatosis.** *Medicine (Baltimore)* 2018; **97**:e0462.
7. Perazzo H, Cardoso SW, Yanavich C, Nunes EP, Morata M, Gorni N, *et al.* **Predictive factors associated with liver fibrosis and steatosis by transient elastography in patients with HIV mono-infection under long-term combined antiretroviral therapy.** *J Int AIDS Soc* 2018; **21**:e25201.
8. Bassis CM, Moore NM, Lolans K, Seekatz AM, Weinstein RA, Young VB, Hayden MK. **Comparison of stool versus rectal swab samples and storage conditions on bacterial community profiles.** *BMC Microbiol* 2017; **17**:78.
9. Biehl LM, Garzetti D, Farowski F, Ring D, Koeppl MB, Rohde H, *et al.* **Usability of rectal swabs for microbiome sampling in a cohort study of hematological and oncological patients.** *PLoS One* 2019; **14**:e0215428.
10. Poynard T, Ingiliz P, Elkrif L, Munteanu M, Lebray P, Morra R, *et al.* **Concordance in a world without a gold standard: a new non-invasive methodology for improving accuracy of fibrosis markers.** *PLoS One* 2008; **3**:e3857.
11. Koehler EM, Plompen EP, Schouten JN, Hansen BE, Darwish Murad S, Taimr P, *et al.* **Presence of diabetes mellitus and steatosis is associated with liver stiffness in a general population: the Rotterdam study.** *Hepatology* 2016; **63**:138–147.
12. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. **Metabolic syndrome—a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation.** *Diabet Med* 2006; **23**:469–480.
13. Moshfegh AJ, Rhodes DG, Baer DJ, Murayi T, Clemens JC, Rumpler WV, *et al.* **The US Department of Agriculture Automated Multiple-Pass Method reduces bias in the collection of energy intakes.** *Am J Clin Nutr* 2008; **88**:324–332.
14. Bender JM, Li F, Martelly S, Byrt E, Rouzier V, Leo M, *et al.* **Maternal HIV infection influences the microbiome of HIV-uninfected infants.** *Sci Transl Med* 2016; **8**:349ra100.

15. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ, Holmes SP. **DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data.** *Nat Methods* 2016; **13**:581–583.
16. Manor O, Borenstein E. **Systematic characterization and analysis of the taxonomic drivers of functional shifts in the human microbiome.** *Cell Host Microbe* 2017; **21**:254–267.
17. Yanavich C, Pacheco AG, Cardoso SW, Nunes EP, Chaves U, Freitas G, et al. **Diagnostic value of serological biomarkers for detection of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and/or advanced liver fibrosis in people living with HIV.** *HIV Med* 2021; **22**:445–456.
18. Schiøth HB, Boström A, Murphy SK, Erhart W, Hampe J, Moylan C, Mwynyi J. **A targeted analysis reveals relevant shifts in the methylation and transcription of genes responsible for bile acid homeostasis and drug metabolism in non-alcoholic fatty liver disease.** *BMC Genomics* 2016; **17**:462.
19. Duarte SMB, Stefano JT, Miele L, Ponziani FR, Souza-Basqueira M, Okada LSRR, et al. **Gut microbiome composition in lean patients with NASH is associated with liver damage independent of caloric intake: A prospective pilot study.** *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2018; **28**:369–384.
20. Mohammed SS, Aghdassi E, Salit IE, Avand G, Sherman M, Guindi M, et al. **HIV-positive patients with nonalcoholic fatty liver disease have a lower body mass index and are more physically active than HIV-negative patients.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007; **45**:432–438.
21. Maier L, Pruteanu M, Kuhn M, Zeller G, Telzerow A, Anderson EE, et al. **Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria.** *Nature* 2018; **555**:623–628.
22. Villanueva-Millán MJ, Pérez-Matute P, Recio-Fernández E, Lezana Rosales JM, Oteo JA. **Differential effects of antiretrovirals on microbial translocation and gut microbiota composition of HIV-infected patients.** *J Int AIDS Soc* 2017; **20**:21526.
23. Wu W, Lv L, Shi D, Ye J, Fang D, Guo F, et al. **Protective effect of *Akkermansia muciniphila* against immune-mediated liver injury in a mouse model.** *Front Microbiol* 2017; **8**:1804.
24. Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, et al. **Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; **110**:9066–9071.
25. Higuchi BS, Rodrigues N, Gonzaga MI, Paiolo JCC, Stefanutto N, Omori WP, et al. **Intestinal dysbiosis in autoimmune diabetes is correlated with poor glycemic control and increased interleukin-6: a pilot study.** *Front Immunol* 2018; **9**:1689.
26. Leite AZ, de Campos RN, Gonzaga MI, Paiolo JCC, de Souza CA, Stefanutto NAV, et al. **Detection of increased plasma interleukin-6 levels and prevalence of *Prevotella copri* and *Bacteroides vulgatus* in the feces of type 2 diabetes patients.** *Front Immunol* 2017; **8**:1107.
27. Pedersen HK, Gudmundsdottir V, Nielsen HB, Hyötyläinen T, Nielsen T, Jensen BA, et al. **Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity.** *Nature* 2016; **535**:376–381.
28. Zhu L, Baker SS, Gill C, Liu W, Alkhoury R, Baker RD, Gill SR. **Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH.** *Hepatology* 2013; **57**:601–609.
29. Leung C, Rivera L, Furness JB, Angus PW. **The role of the gut microbiota in NAFLD.** *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016; **13**:412–425.
30. Boursier J, Mueller O, Barret M, Machado M, Fizanne L, Araujo-Perez F, et al. **The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota.** *Hepatology* 2016; **63**:764–775.
31. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. **Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease.** *Hepatology* 2005; **41**:1313–1321.
32. Sid V, Siow YL, K O. **Role of folate in nonalcoholic fatty liver disease.** *Can J Physiol Pharmacol* 2017; **95**:1141–1148.
33. Loomba R, Seguritan V, Li W, Long T, Klitgord N, Bhatt A, et al. **Gut microbiome-based metagenomic signature for noninvasive detection of advanced fibrosis in human nonalcoholic fatty liver disease.** *Cell Metab* 2019; **30**:607.
34. Jiang W, Wu N, Wang X, Chi Y, Zhang Y, Qiu X, et al. **Dysbiosis gut microbiota associated with inflammation and impaired mucosal immune function in intestine of humans with non-alcoholic fatty liver disease.** *Sci Rep* 2015; **5**:8096.
35. Castaner O, Goday A, Park YM, Lee SH, Magkos F, Shiove STE, Schröder H. **The gut microbiome profile in obesity: a systematic review.** *Int J Endocrinol* 2018; **2018**:4095789.
36. Meijnikman AS, Gerdes VE, Nieuwdorp M, Herrema H. **Evaluating causality of gut microbiota in obesity and diabetes in humans.** *Endocr Rev* 2018; **39**:133–153.
37. Cook RR, Fulcher JA, Tobin NH, Li F, Lee D, Javanbakht M, et al. **Effects of HIV viremia on the gastrointestinal microbiome of young MSM.** *AIDS* 2019; **33**:793–804.
38. Lozupone CA, Li M, Campbell TB, Flores SC, Linderman D, Gebert MJ, et al. **Alterations in the gut microbiota associated with HIV-1 infection.** *Cell Host Microbe* 2013; **14**:329–339.
39. Vazquez-Castellanos JF, Serrano-Villar S, Latorre A, Artacho A, Ferrús ML, Madrid N, et al. **Altered metabolism of gut microbiota contributes to chronic immune activation in HIV-infected individuals.** *Mucosal Immunol* 2015; **8**:760–772.
40. Vujkovic-Cvijin I, Dunham RM, Iwai S, Maher MC, Albright RG, Broadhurst MJ, et al. **Dysbiosis of the gut microbiota is associated with HIV disease progression and tryptophan catabolism.** *Sci Transl Med* 2013; **5**:193ra91.
41. Gori A, Tincati C, Rizzardini G, Torti C, Quirino T, Haarman M, et al. **Early impairment of gut function and gut flora supporting a role for alteration of gastrointestinal mucosa in human immunodeficiency virus pathogenesis.** *J Clin Microbiol* 2008; **46**:757–758.
42. Ellis CL, Ma ZM, Mann SK, Li CS, Wu J, Knight TH, et al. **Molecular characterization of stool microbiota in HIV-infected subjects by panbacterial and order-level 16S ribosomal DNA (rDNA) quantification and correlations with immune activation.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2011; **57**:363–370.
43. Boursier J, Diehl AM. **Implication of gut microbiota in non-alcoholic fatty liver disease.** *PLoS Pathog* 2015; **11**:e1004559.
44. Paquin-Proulx D, Ching C, Vujkovic-Cvijin I, Fadrosch D, Loh L, Huang Y, et al. ***Bacteroides* are associated with GALT iNKT cell function and reduction of microbial translocation in HIV-1 infection.** *Mucosal Immunol* 2017; **10**:69–78.

7. CONCLUSÕES

- -Os modelos preditivos que utilizam parâmetros serológicos e medidas antropométricas são instrumentos precisos e baratos para identificar o risco elevado de NAFLD e/ou fibrose avançada em doentes infectados com VIH.
- Os nossos dados apoiam o conceito de que o eixo intestinal-fígado desempenha um papel importante na patogénese NAFLD em doentes infectados com VIH.
- A avaliação do microbioma intestinal permitiu a identificação de potenciais contribuições microbianas para vias funcionais alteradas de biossíntese do ácido biliar e do folato que são susceptíveis de contribuir para a patogénese da doença hepática gorda.
- Os nossos resultados destacaram o papel do microbioma intestinal no desenvolvimento da esteatose e fibrose hepática em PLWH.
- Descrevemos a diminuição das abundâncias de Akkermansia, Bacteroides, e Parabacteroides e o aumento das abundâncias de Prevotella, Finegoldia, e Ruminococcus numa coorte de HIV-1 mono-infectado individualisticamente. Estas alterações microbianas estão associadas à upregulação de genes que codificam a síntese de ácidos biliares primários e secundários e à desregulamentação da biossíntese do folato.
- Na nossa população, a esteatose foi associada a depleções relativas de Akkermansia muciniphilia e Bacteroides dorei, e fibrose com depleções de Bacteroides stercoris e Parabacteroides distasonis.
- Identificámos potenciais contribuições microbianas para vias funcionais alteradas de biossíntese do ácido biliar e do folato que provavelmente contribuem para a patogénese de doenças hepáticas gordurosas através do stress oxidativo.
- Na nossa população, Prevotella copri, Finegoldia magna, e Ruminococcus bromii, foram aumentados em indivíduos com esteatose e fibrose (Prevotella copri)

8. RECOMENDAÇÕES E DESDOBRAMENTOS

- Os nossos resultados reforçam o conceito de que os modelos que utilizam parâmetros serológicos e medidas antropométricas podem ser melhores para excluir do que para detectar fibrose avançada. Estes modelos preditivos podem ser uma alternativa não invasiva para o rastreio de doenças hepáticas em PLWH em cenários de recursos limitados. A integração destes testes simples não-invasivos aos cuidados de VIH pode ser útil para diminuir a carga de complicações relacionadas com o fígado em indivíduos infectados com VIH.
- Os nossos resultados fornecem informações sobre estratégias para um melhor diagnóstico e mais informações sobre os possíveis efeitos da disbiose microbiana e a progressão da NAFLD.
- São necessários mais estudos para definir o papel da microbiota intestinal na patogénese da doença hepática em pessoas infectadas pelo VIH.
- O papel das alterações de Bacteroides e Prevotella na progressão mais rápida da fibrose em indivíduos infectados com VIH é uma área que merece uma investigação mais aprofundada.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, et al. Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis Among a Largely Middle-Aged Population Utilizing Ultrasound and Liver Biopsy: A Prospective Study. *Gastroenterology*. 2011 Jan;140(1):124–31.
2. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcome. *Hepatology*. 2016 Jul;64(1):73–84.
3. EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2016 Jun;64(6):1388–402.
4. Rafiq N, Bai C, Fang Y, Srishord M, McCullough A, Gramlich T, et al. Long-Term Follow-Up of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009 Feb;7(2):234–8.
5. Estes C, Razavi H, Loomba R, Younossi Z, Sanyal AJ. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease: Estes et al. *Hepatology*. 2018 Jan;67(1):123–33.
6. Day CP, James OFW. Steatohepatitis: A tale of two “hits”? *Gastroenterology*. 1998 Apr;114(4):842–5.
7. Pais R, Giral P, Khan J-F, Rosenbaum D, Housset C, Poynard T, et al. Fatty liver is an independent predictor of early carotid atherosclerosis. *J Hepatol*. 2016 Jul;65(1):95–102.
8. Targher G, Byrne CD, Lonardo A, Zoppini G, Barbui C. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident cardiovascular disease: A meta-analysis. *J Hepatol*. 2016 Sep;65(3):589–600.
9. Elsheikh E, Younoszai Z, Otgonsuren M, Hunt S, Raybuck B, Younossi ZM. Markers of endothelial dysfunction in patients with non-alcoholic fatty liver disease and coronary artery disease: Endothelial dysfunction in non-alcoholic fatty liver. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014 Jul;29(7):1528–34.
10. Perazzo H, Poynard T, Dufour J-F. The Interactions of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Cardiovascular Diseases. *Clin Liver Dis*. 2014 Feb;18(1):233–48.
11. Hagström H, Nasr P, Ekstedt M, Hammar U, Stål P, Hultcrantz R, et al. Fibrosis stage but not NASH predicts mortality and time to development of severe liver disease in biopsy-proven NAFLD. *J Hepatol*. 2017 Dec;67(6):1265–73.
12. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases: *Hepatology*, Vol. XX, No. X, 2017. *Hepatology*. 2018 Jan;67(1):328–57.
13. Mittal S, Sada YH, El-Serag HB, Kanwal F, Duan Z, Temple S, et al. Temporal Trends of Nonalcoholic Fatty Liver Disease–Related Hepatocellular Carcinoma in the Veteran Affairs Population. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015 Mar;13(3):594–601.e1.

14. Goldberg D, Ditah IC, Saeian K, Lalehzari M, Aronsohn A, Gorospe EC, et al. Changes in the Prevalence of Hepatitis C Virus Infection, Nonalcoholic Steatohepatitis, and Alcoholic Liver Disease Among Patients With Cirrhosis or Liver Failure on the Waitlist for Liver Transplantation. *Gastroenterology*. 2017 Apr;152(5):1090-1099.e1.
15. Wong RJ, Aguilar M, Cheung R, Perumpail RB, Harrison SA, Younossi ZM, et al. Nonalcoholic Steatohepatitis Is the Second Leading Etiology of Liver Disease Among Adults Awaiting Liver Transplantation in the United States. *Gastroenterology*. 2015 Mar;148(3):547–55.
16. Castera L, Vilgrain V, Angulo P. Noninvasive evaluation of NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013 Nov;10(11):666–75.
17. Hernaez R, Lazo M, Bonekamp S, Kamel I, Brancati FL, Guallar E, et al. Diagnostic accuracy and reliability of ultrasonography for the detection of fatty liver: A meta-analysis. *Hepatology*. 2011 Sep 2;54(3):1082–90.
18. Venkatesh SK, Henedige T, Johnson GB, Hough DM, Fletcher JG. Imaging patterns and focal lesions in fatty liver: a pictorial review. *Abdom Radiol*. 2017 May;42(5):1374–92.
19. Loomba R. Role of imaging-based biomarkers in NAFLD: Recent advances in clinical application and future research directions. *J Hepatol*. 2018 Feb;68(2):296–304.
20. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005 Jun;41(6):1313–21.
21. Bedossa P, Dargere D, Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003 Dec;38(6):1449–57.
22. Bravo AA, Sheth SG, Chopra S. Liver Biopsy. *N Engl J Med*. 2001 Feb 15;344(7):495–500.
23. Karlas T, Petroff D, Sasso M, Fan J-G, Mi Y-Q, de Lédinghen V, et al. Individual patient data meta-analysis of controlled attenuation parameter (CAP) technology for assessing steatosis. *J Hepatol*. 2017 May;66(5):1022–30.
24. Castéra L, Foucher J, Bernard P-H, Carvalho F, Allaix D, Merrouche W, et al. Pitfalls of liver stiffness measurement: A 5-year prospective study of 13,369 examinations. *Hepatology*. 2010;NA-NA.
25. 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*. 2006 Dec;6(1):33.
26. Lee J-H, Kim D, Kim HJ, Lee C-H, Yang JI, Kim W, et al. Hepatic steatosis index: A simple screening tool reflecting nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis*. 2010 Jul;42(7):503–8.
27. Kotronen A, Peltonen M, Hakkarainen A, Sevastianova K, Bergholm R, Johansson LM, et al. Prediction of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Liver Fat Using Metabolic and Genetic Factors. *Gastroenterology*. 2009 Sep;137(3):865–72.

28. Perazzo H, Benseñor I, Mill JG, Pacheco AG, da Fonseca M de JM, Griep RH, et al. Prediction of Liver Steatosis Applying a New Score in Subjects from the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health: *J Clin Gastroenterol*. 2018 Mar;1.
29. Wai C. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003 Aug;38(2):518–26.
30. Vallet-Pichard A, Mallet V, Nalpas B, Verkarre V, Nalpas A, Dhalluin-Venier V, et al. FIB-4: An inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. comparison with liver biopsy and fibrotest. *Hepatology*. 2007 Jul;46(1):32–6.
31. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, Bugianesi E, George J, Farrell GC, et al. The NAFLD fibrosis score: A noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology*. 2007 Apr;45(4):846–54.
32. Palella FJ, Baker RK, Moorman AC, Chmiel JS, Wood KC, Brooks JT, et al. Mortality in the Highly Active Antiretroviral Therapy Era: Changing Causes of Death and Disease in the HIV Outpatient Study. *JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006 Sep;43(1):27–34.
33. Weber R, Sabin CA, Friis-Møller N, Reiss P, El-Sadr WM, Kirk O, et al. Liver-Related Deaths in Persons Infected With the Human Immunodeficiency Virus: The D:A:D Study. *Arch Intern Med*. 2006 Aug 14;166(15):1632.
34. Effros RB, Fletcher CV, Gebo K, Halter JB, Hazzard WR, Horne FM, et al. Aging and Infectious Diseases: Workshop on HIV Infection and Aging: What Is Known and Future Research Directions. *Clin Infect Dis*. 2008 Aug 15;47(4):542–53.
35. High KP, Brennan-Ing M, Clifford DB, Cohen MH, Currier J, Deeks SG, et al. HIV and Aging: State of Knowledge and Areas of Critical Need for Research. A Report to the NIH Office of AIDS Research by the HIV and Aging Working Group. *JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr*. 2012 Jul;60:S1–18.
36. Causes of Death in HIV-1–Infected Patients Treated with Antiretroviral Therapy, 1996–2006: Collaborative Analysis of 13 HIV Cohort Studies. *Clin Infect Dis*. 2010 May 15;50(10):1387–96.
37. Weber R, Ruppik M, Rickenbach M, Spoerri A, Furrer H, Battegay M, et al. Decreasing mortality and changing patterns of causes of death in the Swiss HIV Cohort Study: Causes of death and HIV infection. *HIV Med*. 2013 Apr;14(4):195–207.
38. Wada N, Jacobson LP, Cohen M, French A, Phair J, Muñoz A. Cause-specific life expectancies after 35 years of age for human immunodeficiency syndrome-infected and human immunodeficiency syndrome-negative individuals followed simultaneously in long-term cohort studies, 1984–2008. *Am J Epidemiol*. 2013 Jan 15;177(2):116–25.
39. Data Collection on Adverse Events of Anti-HIV drugs (D:A:D) Study Group, Smith C, Sabin CA, Lundgren JD, Thiebaut R, Weber R, et al. Factors associated with specific causes of death amongst HIV-positive individuals in the D:A:D Study. *AIDS Lond Engl*. 2010 Jun 19;24(10):1537–48.
40. Deeks SG, Tracy R, Douek DC. Systemic Effects of Inflammation on Health during Chronic HIV Infection. *Immunity*. 2013 Oct;39(4):633–45.

41. Crabtree-Ramírez B, Del Río C, Grinsztejn B, Sierra-Madero J. HIV and Noncommunicable Diseases (NCDs) in Latin America: A Call for an Integrated and Comprehensive Response. *JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr*. 2014 Sep;67:S96–8.
42. Grinsztejn B, Luz PM, Pacheco AG, Santos DVG, Velasque L, Moreira RI, et al. Changing Mortality Profile among HIV-Infected Patients in Rio de Janeiro, Brazil: Shifting from AIDS to Non-AIDS Related Conditions in the HAART Era. Yazdanpanah Y, editor. *PLoS ONE*. 2013 Apr 5;8(4):e59768.
43. Paula AA, Schechter M, Tuboi SH, Faulhaber JC, Luz PM, Veloso VG, et al. Continuous Increase of Cardiovascular Diseases, Diabetes, and Non-HIV Related Cancers as Causes of Death in HIV-Infected Individuals in Brazil: An Analysis of Nationwide Data. Okulicz JF, editor. *PLoS ONE*. 2014 Apr 11;9(4):e94636.
44. Torres TS, Cardoso SW, Velasque L de S, Marins LMS, de Oliveira MS, Veloso VG, et al. Aging with HIV: an overview of an urban cohort in Rio de Janeiro (Brazil) across decades of life. *Braz J Infect Dis*. 2013 May;17(3):324–31.
45. Leite NC. Non-alcoholic fatty liver disease and diabetes: From physiopathological interplay to diagnosis and treatment. *World J Gastroenterol*. 2014;20(26):8377.
46. Guaraldi G, Squillace N, Stentarelli C, Orlando G, D’Amico R, Ligabue G, et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease in HIV-Infected Patients Referred to a Metabolic Clinic: Prevalence, Characteristics, and Predictors. *Clin Infect Dis*. 2008 Jul 15;47(2):250–7.
47. Crum-Cianflone N, Dilay A, Collins G, Asher D, Campin R, Medina S, et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Among HIV-Infected Persons: *JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr*. 2009 Apr;50(5):464–73.
48. Angulo P. GI Epidemiology: nonalcoholic fatty liver disease: GI EPIDEMIOLOGY: NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007 Mar 30;25(8):883–9.
49. Smith CJ, Ryom L, Weber R, Morlat P, Pradier C, Reiss P, et al. Trends in underlying causes of death in people with HIV from 1999 to 2011 (D:A:D): a multicohort collaboration. *The Lancet*. 2014 Jul;384(9939):241–8.
50. Benmassaoud A, Ghali P, Cox J, Wong P, Szabo J, Deschenes M, et al. Screening for nonalcoholic steatohepatitis by using cytokeratin 18 and transient elastography in HIV mono-infection. Huang J-F, editor. *PLOS ONE*. 2018 Jan 30;13(1):e0191985.
51. Lemoine M, Assoumou L, De Wit S, Girard P-M, Valantin MA, Katlama C, et al. Diagnostic Accuracy of Noninvasive Markers of Steatosis, NASH, and Liver Fibrosis in HIV-Monoinfected Individuals at Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): Results From the ECHAM Study. *JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr*. 2019 Apr;80(4):e86–94.
52. Kapoor N, Audsley J, Rupali P, Sasadeusz J, Paul TV, Thomas N, et al. A gathering storm: HIV infection and nonalcoholic fatty liver disease in low and middle-income countries. *AIDS*. 2019 Jun;33(7):1105–15.

53. Lombardi R, Sambatakou H, Mariolis I, Cokkinos D, Papatheodoridis GV, Tsochatzis EA. Prevalence and predictors of liver steatosis and fibrosis in unselected patients with HIV mono-infection. *Dig Liver Dis.* 2016 Dec;48(12):1471–7.
54. Soriano V, Barreiro P, Sherman KE. The changing epidemiology of liver disease in HIV patients. *AIDS Rev.* 2013 Mar;15(1):25–31.
55. Benedict M, Zhang X. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. *World J Hepatol.* 2017;9(16):715.
56. McAvoy N, Lockman A, Hayes P. Non alcoholic fatty liver disease (NAFLD): an overview. *J-R Coll PHYSICIANS Edinb.* 2007;37(1):9.
57. Adams LA, Lymp JF, Sauver JS, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology.* 2005;129(1):113–21.
58. Ong JP, Pitts A, Younossi ZM. Increased overall mortality and liver-related mortality in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2008;49(4):608–12.
59. Söderberg C, Stål P, Askling J, Glaumann H, Lindberg G, Marmur J, et al. Decreased survival of subjects with elevated liver function tests during a 28-year follow-up. *Hepatology.* 2010;51(2):595–602.
60. Stepanova M, Younossi ZM. Independent association between nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease in the US population. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2012;10(6):646–50.
61. Vodkin I, Valasek M, Bettencourt R, Cachay E, Loomba R. Clinical, biochemical and histological differences between HIV-associated NAFLD and primary NAFLD: a case–control study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2015;41(4):368–78.
62. Judge RG, Maurice JB, Nelson M, Thursz MR. Non-alcoholic fatty liver disease in an HIV-infected cohort with abnormal liver function tests: prevalence and risk factors. In *WILEY-BLACKWELL 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA; 2016.* p. 568A-569A.
63. Morse CG. Fatty liver disease in HIV: common, underappreciated, and understudied. *Aids.* 2017;31(11):1633–5.
64. Marchetti G, Tincati C, Silvestri G. Microbial translocation in the pathogenesis of HIV infection and AIDS. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(1):2–18.
65. Rockstroh JK, Mohr R, Behrens G, Spengler U. Liver fibrosis in HIV: which role does HIV itself, long-term drug toxicities and metabolic changes play? *Curr Opin HIV AIDS.* 2014;9(4):365–70.
66. Maurice J, Judge R, Baldry M, Hubbard J, Cooke G, Lemoine M, et al. NAFLD in HIV is associated with age and metabolic factors but not HIV-specific parameters in a prospectively characterised cohort. In *WILEY 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA; 2017.* p. 41–2.
67. Maurice JB, Patel A, Scott AJ, Patel K, Thursz M, Lemoine M. Prevalence and risk factors of nonalcoholic fatty liver disease in HIV-monoinfection. *Aids.* 2017;31(11):1621–32.

68. Price JC, Wang R, Seaberg EC, Budoff MJ, Kingsley LA, Palella FJ, et al. The Association of Inflammatory Markers With Nonalcoholic Fatty Liver Disease Differs by Human Immunodeficiency Virus Serostatus. *Open Forum Infect Dis.* 2017;4(3):ofx153.
69. Vujkovic-Cvijin I, Dunham RM, Iwai S, Maher MC, Albright RG, Broadhurst MJ, et al. Dysbiosis of the gut microbiota is associated with HIV disease progression and tryptophan catabolism. *Sci Transl Med.* 2013;5(193):193ra91-193ra91.
70. Seth A, Sherman KE. Fatty Liver Disease in Persons With HIV Infection. *Top Antivir Med.* 2019;27(2):75.
71. Dold L, Luda C, Schwarze-Zander C, Boesecke C, Hansel C, Nischalke H-D, et al. Genetic polymorphisms associated with fatty liver disease and fibrosis in HIV positive patients receiving combined antiretroviral therapy (cART). *PloS One.* 2017;12(6):e0178685.
72. Krahn T, Falutz J, Guaraldi G, Klein M, Sapir-Pichhadze R, Wong P, et al. Non-alcoholic fatty liver disease increases the risk of incident cardiometabolic complications and allcause mortality in HIV-infected persons. *Can Liver J.* 2019 May;2(2):43–4.
73. Maurice J, Kelleher P, Nelson M, Thursz M, Lemoine M. NAFLD in HIV mono-infection is a consequence of insulin resistance but not bacterial translocation. *J Hepatol.* 2018;68:S358.
74. Loomba R, Seguritan V, Li W, Long T, Klitgord N, Bhatt A, et al. Gut Microbiome-Based Metagenomic Signature for Non-invasive Detection of Advanced Fibrosis in Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Metab.* 2019;30(3):607.
75. Leung C, Rivera L, Furness JB, Angus PW. The role of the gut microbiota in NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2016;13(7):412.
76. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *nature.* 2006;444(7122):1022.
77. Wieland A, Frank D, Harnke B, Bambha K. Systematic review: microbial dysbiosis and nonalcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2015;42(9):1051–63.
78. Collaboration A, Hara K, Kim S, Sato K. Performance of pile-up mitigation techniques for jets in pp collisions at $\sqrt{s} = 8$ TeV using the ATLAS detector. *Eur Phys J C.* 2016;76:581.
79. LaRusso NF, Tabibian JH, O'Hara SP. Role of the intestinal microbiome in cholestatic liver disease. *Dig Dis.* 2017;35(3):166–8.
80. Gill SR, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *science.* 2006;312(5778):1355–9.
81. Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *science.* 2012;336(6086):1268–73.
82. Boursier J, Diehl AM. Implication of Gut Microbiota in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Hogan DA, editor. *PLOS Pathog.* 2015 Jan 27;11(1):e1004559.

83. Vrieze A, Holleman F, Zoetendal EG, de Vos WM, Hoekstra JBL, Nieuwdorp M. The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. *Diabetologia*. 2010 Apr;53(4):606–13.
84. Son G, Kremer M, Hines IN. Contribution of Gut Bacteria to Liver Pathobiology. *Gastroenterol Res Pract*. 2010;2010:1–13.
85. Heymann F, Tacke F. Immunology in the liver — from homeostasis to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016 Feb;13(2):88–110.
86. Wigg AJ. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut*. 2001 Feb 1;48(2):206–11.
87. Macpherson AJ, Heikenwalder M, Ganal-Vonarburg SC. The Liver at the Nexus of Host-Microbial Interactions. *Cell Host Microbe*. 2016 Nov;20(5):561–71.
88. Ahn SB, Jun DW, Kang B-K, Lim JH, Lim S, Chung M-J. Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Study of a Multispecies Probiotic Mixture in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Sci Rep*. 2019 Dec;9(1):5688.
89. Del Chierico F, Nobili V, Vernocchi P, Russo A, De Stefanis C, Gnani D, et al. Gut microbiota profiling of pediatric nonalcoholic fatty liver disease and obese patients unveiled by an integrated meta-omics-based approach. *Hepatology*. 2017 Feb;65(2):451–64.
90. Shapiro H, Thaiss CA, Levy M, Elinav E. The cross talk between microbiota and the immune system: metabolites take center stage. *Curr Opin Immunol*. 2014 Oct;30:54–62.
91. Compare D, Coccoli P, Rocco A, Nardone OM, De Maria S, Cartenì M, et al. Gut–liver axis: The impact of gut microbiota on non alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2012 Jun;22(6):471–6.
92. Pasolli E, Asnicar F, Manara S, Zolfo M, Karcher N, Armanini F, et al. Extensive Unexplored Human Microbiome Diversity Revealed by Over 150,000 Genomes from Metagenomes Spanning Age, Geography, and Lifestyle. *Cell*. 2019 Jan;176(3):649–662.e20.
93. Schnabl B, Brenner DA. Interactions Between the Intestinal Microbiome and Liver Diseases. *Gastroenterology*. 2014 May;146(6):1513–24.
94. Michail S, Lin M, Frey MR, Fanter R, Paliy O, Hilbush B, et al. Altered gut microbial energy and metabolism in children with non-alcoholic fatty liver disease. *FEMS Microbiol Ecol*. 2015 Feb 1;91(2):1–9.
95. Boursier J, Mueller O, Barret M, Machado M, Fizanne L, Araujo-Perez F, et al. The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota: Boursier et al. *Hepatology*. 2016 Mar;63(3):764–75.
96. Rooks MG, Garrett WS. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat Rev Immunol*. 2016 Jun;16(6):341–52.

97. Levy M, Thaïss CA, Zeevi D, Dohnalová L, Zilberman-Schapira G, Mahdi JA, et al. Microbiota-Modulated Metabolites Shape the Intestinal Microenvironment by Regulating NLRP6 Inflammasome Signaling. *Cell*. 2015 Dec;163(6):1428–43.
98. Zhu W, Gregory JC, Org E, Buffa JA, Gupta N, Wang Z, et al. Gut Microbial Metabolite TMAO Enhances Platelet Hyperreactivity and Thrombosis Risk. *Cell*. 2016 Mar;165(1):111–24.
99. Duncan SH, Louis P, Thomson JM, Flint HJ. The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota. *Environ Microbiol*. 2009 Aug;11(8):2112–22.
100. Kimura I, Ozawa K, Inoue D, Imamura T, Kimura K, Maeda T, et al. The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nat Commun*. 2013 Oct;4(1):1829.
101. Blumberg H, Mccollum EV. THE PREVENTION BY CHOLINE OF LIVER CIRRHOSIS IN RATS ON HIGH FAT, LOW PROTEIN DIETS. *Science*. 1941 Jun 20;93(2425):598–9.
102. Craciun S, Balskus EP. Microbial conversion of choline to trimethylamine requires a glycyl radical enzyme. *Proc Natl Acad Sci*. 2012 Dec 26;109(52):21307–12.
103. Cope K, Risby T, Diehl AM. Increased gastrointestinal ethanol production in obese mice: Implications for fatty liver disease pathogenesis. *Gastroenterology*. 2000 Nov;119(5):1340–7.
104. Volynets V, Küper MA, Strahl S, Maier IB, Spruss A, Wagnerberger S, et al. Nutrition, Intestinal Permeability, and Blood Ethanol Levels Are Altered in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Dig Dis Sci*. 2012 Jul;57(7):1932–41.
105. Zhu L, Baker SS, Gill C, Liu W, Alkhoury R, Baker RD, et al. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: A connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology*. 2013 Feb;57(2):601–9.
106. Hoyles L, Fernández-Real J-M, Federici M, Serino M, Abbott J, Charpentier J, et al. Molecular phenomics and metagenomics of hepatic steatosis in non-diabetic obese women. *Nat Med*. 2018 Jul;24(7):1070–80.
107. Sun L, Xie C, Wang G, Wu Y, Wu Q, Wang X, et al. Gut microbiota and intestinal FXR mediate the clinical benefits of metformin. *Nat Med*. 2018 Dec;24(12):1919–29.
108. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009 Nov;9(11):799–809.
109. Luther J, Garber JJ, Khalili H, Dave M, Bale SS, Jindal R, et al. Hepatic Injury in Nonalcoholic Steatohepatitis Contributes to Altered Intestinal Permeability. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2015 Mar;1(2):222–232.e2.
110. Miele L, Valenza V, La Torre G, Montalto M, Cammarota G, Ricci R, et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2009 Jun;49(6):1877–87.

111. Rahman K, Desai C, Iyer SS, Thorn NE, Kumar P, Liu Y, et al. Loss of Junctional Adhesion Molecule A Promotes Severe Steatohepatitis in Mice on a Diet High in Saturated Fat, Fructose, and Cholesterol. *Gastroenterology*. 2016 Oct;151(4):733-746.e12.
112. Zhai Y, Shen X, O'Connell R, Gao F, Lassman C, Busuttill RW, et al. Cutting Edge: TLR4 Activation Mediates Liver Ischemia/Reperfusion Inflammatory Response via IFN Regulatory Factor 3-Dependent MyD88-Independent Pathway. *J Immunol*. 2004 Dec 15;173(12):7115-9.
113. Abu-Shanab A, Quigley EMM. The role of the gut microbiota in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010 Dec;7(12):691-701.
114. Spruss A, Kanuri G, Wagnerberger S, Haub S, Bischoff SC, Bergheim I. Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology*. 2009 Oct;50(4):1094-104.
115. Alisi A, Bedogni G, Baviera G, Giorgio V, Porro E, Paris C, et al. Randomised clinical trial: the beneficial effects of VSL#3 in obese children with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014 Jun;39(11):1276-85.
116. Seghieri M, Christensen AS, Andersen A, Solini A, Knop FK, Vilsbøll T. Future Perspectives on GLP-1 Receptor Agonists and GLP-1/glucagon Receptor Co-agonists in the Treatment of NAFLD. *Front Endocrinol*. 2018 Nov 6;9:649.
117. Lee J, Hong S-W, Rhee E-J, Lee W-Y. GLP-1 Receptor Agonist and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Diabetes Metab J*. 2012;36(4):262.
118. Malaguarnera M, Vacante M, Antic T, Giordano M, Chisari G, Acquaviva R, et al. Bifidobacterium longum with Fructo-Oligosaccharides in Patients with Non Alcoholic Steatohepatitis. *Dig Dis Sci*. 2012 Feb;57(2):545-53.
119. Wong VW-S, Won GL-H, Chim AM-L, Chu WC-W, Yeung DK-W, Li KC-T, et al. Treatment of nonalcoholic steatohepatitis with probiotics. A proof-of-concept study. *Ann Hepatol*. 2013 Apr;12(2):256-62.
120. Beserra BTS, Fernandes R, do Rosario VA, Mocellin MC, Kuntz MGF, Trindade EBSM. A systematic review and meta-analysis of the prebiotics and synbiotics effects on glycaemia, insulin concentrations and lipid parameters in adult patients with overweight or obesity. *Clin Nutr*. 2015 Oct;34(5):845-58.
121. Mowat AMcI, Viney JL. The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev*. 1997 Apr;156(1):145-66.
122. Scholer A, Hugues S, Boissonnas A, Fetler L, Amigorena S. Intercellular Adhesion Molecule-1-Dependent Stable Interactions between T Cells and Dendritic Cells Determine CD8+ T Cell Memory. *Immunity*. 2008 Feb;28(2):258-70.
123. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, et al. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med*. 2004 Sep 20;200(6):749-59.
124. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, Hogan C, et al. Primary HIV-1 Infection Is Associated with Preferential Depletion of CD4+ T Lymphocytes from Effector Sites in the Gastrointestinal Tract. *J Exp Med*. 2004 Sep 20;200(6):761-70.

125. Arthos J, Cicala C, Martinelli E, Macleod K, Van Ryk D, Wei D, et al. HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin $\alpha 4\beta 7$, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. *Nat Immunol.* 2008 Mar;9(3):301–9.
126. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med.* 2006 Dec;12(12):1365–71.
127. Stein TP, Koerner B, Schluter MD, Leskiw MJ, Gprindachvilli T, Richards EW, et al. WEIGHT LOSS, THE GUT AND THE INFLAMMATORY RESPONSE IN AIDS PATIENTS. *Cytokine.* 1997 Feb;9(2):143–7.
128. Jiang W, Lederman MM, Hunt P, Sieg SF, Haley K, Rodriguez B, et al. Plasma Levels of Bacterial DNA Correlate with Immune Activation and the Magnitude of Immune Restoration in Persons with Antiretroviral-Treated HIV Infection. *J Infect Dis.* 2009 Apr 15;199(8):1177–85.
129. Gordon SN, Cervasi B, Odorizzi P, Silverman R, Aberra F, Ginsberg G, et al. Disruption of intestinal CD4+ T cell homeostasis is a key marker of systemic CD4+ T cell activation in HIV-infected individuals. *J Immunol.* 2010 Nov 1;185(9):5169–79.
130. Li Q, Estes JD, Duan L, Jessurun J, Pambuccian S, Forster C, et al. Simian Immunodeficiency Virus-Induced Intestinal Cell Apoptosis Is the Underlying Mechanism of the Regenerative Enteropathy of Early Infection. *J Infect Dis.* 2008 Feb;197(3):420–9.
131. Lederman MM, Calabrese L, Funderburg NT, Clagett B, Medvik K, Bonilla H, et al. Immunologic Failure Despite Suppressive Antiretroviral Therapy Is Related to Activation and Turnover of Memory CD4 Cells. *J Infect Dis.* 2011 Oct 15;204(8):1217–26.
132. Ellis CL, Ma Z-M, Mann SK, Li C-S, Wu J, Knight TH, et al. Molecular Characterization of Stool Microbiota in HIV-Infected Subjects by Panbacterial and Order-Level 16S Ribosomal DNA (rDNA) Quantification and Correlations With Immune Activation: JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr. 2011 Aug;57(5):363–70.
133. Ancuta P, Kamat A, Kunstman KJ, Kim E-Y, Autissier P, Wurcel A, et al. Microbial Translocation Is Associated with Increased Monocyte Activation and Dementia in AIDS Patients. Unutmaz D, editor. *PLoS ONE.* 2008 Jun 25;3(6):e2516.
134. Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Paul WE, Picker LJ. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat Med.* 2006 Mar;12(3):289–95.
135. Cadogan M, Dalglish AG. HIV immunopathogenesis and strategies for intervention. *Lancet Infect Dis.* 2008 Nov;8(11):675–84.
136. Troseid M, Sonnerborg A, Nowak P. High Mobility Group Box Protein-1 in HIV-1 Infection: Connecting Microbial Translocation, Cell Death and Immune Activation. *Curr HIV Res.* 2011 Jan 1;9(1):6–10.
137. Klatt NR, Funderburg NT, Brenchley JM. Microbial translocation, immune activation, and HIV disease. *Trends Microbiol.* 2013 Jan;21(1):6–13.

138. Dillon SM, Lee EJ, Kotter CV, Austin GL, Dong Z, Hecht DK, et al. An altered intestinal mucosal microbiome in HIV-1 infection is associated with mucosal and systemic immune activation and endotoxemia. *Mucosal Immunol*. 2014 Jul;7(4):983–94.
139. Cresci GAM, Izzo K. Gut Microbiome. In: *Adult Short Bowel Syndrome* [Internet]. Elsevier; 2019 [cited 2019 Nov 16]. p. 45–54. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128143308000044>
140. Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J, et al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2017 Dec;81(4):e00036-17, /mmlbr/81/4/e00036-17.atom.
141. Fraher MH, O’Toole PW, Quigley EMM. Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012 Jun;9(6):312–22.
142. Zhuang L, Chen H, Zhang S, Zhuang J, Li Q, Feng Z. Intestinal Microbiota in Early Life and Its Implications on Childhood Health. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2019 Feb;17(1):13–25.
143. Yatsunenkov T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012 Jun;486(7402):222–7.
144. Mohammadkhah AI, Simpson EB, Patterson SG, Ferguson JF. Development of the Gut Microbiome in Children, and Lifetime Implications for Obesity and Cardiometabolic Disease. *Children*. 2018 Nov 27;5(12):160.
145. Faith JJ, Guruge JL, Charbonneau M, Subramanian S, Seedorf H, Goodman AL, et al. The Long-Term Stability of the Human Gut Microbiota. *Science*. 2013 Jul 5;341(6141):1237439.
146. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014 Jan;505(7484):559–63.
147. Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci*. 2007 Jan 16;104(3):979–84.
148. Brooks AW, Priya S, Blekhman R, Bordenstein SR. Gut microbiota diversity across ethnicities in the United States. Cadwell K, editor. *PLOS Biol*. 2018 Dec 4;16(12):e2006842.
149. Shreiner AB, Kao JY, Young VB. The gut microbiome in health and in disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2015 Jan;31(1):69–75.
150. Kamada N, Chen GY, Inohara N, Núñez G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat Immunol*. 2013 Jul;14(7):685–90.
151. Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K, et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*. 2011 Jan;469(7331):543–7.

152. Fabich AJ, Jones SA, Chowdhury FZ, Cernosek A, Anderson A, Smalley D, et al. Comparison of Carbon Nutrition for Pathogenic and Commensal *Escherichia coli* Strains in the Mouse Intestine. *Infect Immun*. 2008 Mar 1;76(3):1143–52.
153. Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Hautefort I, Thompson A, et al. Butyrate Specifically Down-Regulates *Salmonella* Pathogenicity Island 1 Gene Expression. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Jan 1;72(1):946–9.
154. Geuking MB, Köller Y, Rupp S, McCoy KD. The interplay between the gut microbiota and the immune system. *Gut Microbes*. 2014 May;5(3):411–8.
155. Cani PD, Delzenne NM. Interplay between obesity and associated metabolic disorders: new insights into the gut microbiota. *Curr Opin Pharmacol*. 2009 Dec;9(6):737–43.

10. ANEXOS

ANEXO 1: Carta de Aprovaçãõ do CEP INI-FIOCRUZ

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Acompanhamento prospectivo de pacientes infectados pelo HIV por métodos não-invasivos de avaliação de lesões hepáticas.

Pesquisador: Valdilea Gonçalves Veloso dos Santos

Área Temática:

Versão: 6

CAAE: 32889514.4.0000.5262

Instituição Proponente: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - IPEC / FIOCRUZ

Patrocinador Principal: FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ
Fundação Oswaldo Cruz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.400.252

Apresentação do Projeto:

Trata-se de parecer de resposta de pendência à Emenda 2 submetida ao protocolo que visa incluir novo objetivo de pesquisa através de sub-estudo de fase exploratória.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a diversidade da microbiota intestinal e correlacionar os diferentes tipos, famílias e filos com a presença e progressão evolutiva da fibrose e esteatose hepática estimada por métodos não-invasivos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS: O procedimento relacionado a coleta de 4 swabs retais utilizando-se cotonete flocados do tipo COPAN não apresenta riscos maiores, podendo causar leve desconforto na introdução do swab no reto.

BENEFÍCIOS: Sugerir medidas mais eficazes de prevenção ou tratamento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O uso de métodos não-invasivos na prática clínica poderá reduzir as possíveis complicações relacionadas à biópsia hepática e permitirá a implementação de medidas precoces a fim de

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ipec.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 1.400.252

prevenir complicações graves no acompanhamento a longo prazo nos pacientes infectados pelo HIV.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Ver item: "Recomendações".

Recomendações:

O participante, acompanhado receberá o previsto no projeto, o que deverá ser também estendido ao acompanhante (gastos como transporte e alimentação).

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto só deverá ter início após a aceitação do recomendado.

Considerações Finais a critério do CEP:

A aprovação da Emenda será referendada na próxima reunião deste CEP que se realizará no dia 15 de fevereiro de 2016.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_618300 E2.pdf	29/12/2015 12:58:51		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Carta_Emenda_1_PROSPEC_16_10_2015.pdf	29/12/2015 12:57:54	Valdilea Gonçalves Veloso dos Santos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_sub_estudo_Prospec_v2_17_12_2015_Final_com_marcacoes.pdf	29/12/2015 12:56:16	Valdilea Gonçalves Veloso dos Santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Resposta_ao_parecer_do_CEP_1371214.pdf	29/12/2015 12:55:43	Valdilea Gonçalves Veloso dos Santos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_sub_estudo_Prospec_v2_17_12_2015_Final_clean.pdf	29/12/2015 12:54:55	Valdilea Gonçalves Veloso dos Santos	Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto assinada.pdf	30/06/2014 15:17:28		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ipec.fiocruz.br

INSTITUTO NACIONAL DE
INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 1.400.252

RIO DE JANEIRO, 02 de Fevereiro de 2016

Assinado por:
Léa Ferreira Camillo-Coura
(Coordenador)

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ipec.fiocruz.br