



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Universidad Aut3noma de Barcelona

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina



Universitat Aut3noma
de Barcelona

“Efecto del tratamiento con probi3ticos (*Saccharomyces Boulardii*) sobre el microbioma intestinal y la inflamaci3n sist3mica en el paciente VIH virol3gicamente suprimido”

Tesis presentada por

JUDIT VILLAR GARCÍA

Para optar al grado de Doctor de la Universidad Aut3noma de Barcelona dentro del Programa de Doctorado en Medicina.

Esta tesis ha sido realizada bajo la tutoría y direcci3n del Dr. Hernando Knobel, y co-direcci3n del Dr. Adolf Díez P3rez

Tesis adscrita al Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Aut3noma de Barcelona

Visto bueno del director y co-director de la tesis:

Dr. Hernando Knobel

Dr. Adolf Díez P3rez

Barcelona, mayo de 2017



Universitat Autònoma
de Barcelona

El **Dr. Hernando Knobel**, Doctor en medicina y Jefe clínico del Servicio de Enfermedades infecciosas del Hospital del Mar de Barcelona, y el **Dr. Adolf Díez Pérez**, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universidad Autònoma de Barcelona,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “**Efecto del tratamiento con probióticos (*Saccharomyces Boulardii*) sobre el microbioma intestinal y la inflamación sistémica en el paciente VIH virológicamente suprimido**”, presentada por **Judit Villar García** para acceder al título de Doctora en Medicina y desarrollada bajo su dirección y tutela, representa una aportación relevante al tema y reúne méritos suficientes y los requisitos formales y científicos adecuados para su preceptiva lectura y defensa públicas.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, firmamos la presente certificación en Barcelona, a 10 de Mayo de 2017.

Dr. Hernando Knobel

Director y tutor

Dr. Adolf Díez Pérez

Codirector

Judit Villar García

Doctoranda

Esta tesis doctoral ha recibido el soporte de la fundación IMIM para su encuadernación.

Agradecimientos:

A todos los que me han ayudado en este proyecto desde el principio y han creído en él, especialmente a Hernando, Alicia y Roberto, así como al resto de compañeros con los que tanto he aprendido estos años y que ya son mi gran familia en Barcelona.

A mis amigos, con los que sigo creciendo, por su incondicionalidad.

A mi familia, la que siempre ha estado...y en especial a Xavi y a Jan por todos los ratos que no he podido estar.

A los pacientes, de los que siempre aprendemos gracias a su colaboración desinteresada.

“Todas las enfermedades comienzan en el intestino”

Hipócrates, siglo V a.C.

ÍNDICE

1. INDICE DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS.....	6
2. INTRODUCCIÓN.....	7
3. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	21
4. PUBLICACIONES.....	24
4.1. <u>Primer artículo:</u> “Efecto de los probióticos (<i>Saccharomyces Boulardii</i>) sobre la translocación microbiana y la inflamación en pacientes VIH tratados: ensayo clínico doble ciego, aleatorizado, controlado con placebo.”	
- Objetivos, diseño del estudio y resultados del 1er artículo.....	25
- Copia del primer artículo.....	28
- Contenido suplementario del primer artículo.....	36
4.2. <u>Segundo artículo:</u> “Impacto del probiótico <i>Saccharomyces boulardii</i> en la composición del microbioma intestinal en pacientes VIH tratados: ensayo doble ciego, aleatorizado, controlado con placebo.”	
- Objetivos, diseño del estudio y resultados del 2º artículo.....	38
- Copia del segundo artículo	41
- Información de soporte del segundo artículo.....	56
5. DISCUSIÓN.....	69
6. CONCLUSIONES.....	76
7. BIBLIOGRAFÍA.....	79

1. ÍNDICE DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

TAR o TARGA: tratamiento antirretroviral (de gran actividad)

GALT: *Gut Associated Lymphoid Tissue*

LPS: lipopolisacáridos de la pared celular bacteriana

LBP: *Lipid- Binding Protein*

SIV: virus de la inmunodeficiencia del simio

GI: gastrointestinal

INR o ID: *Immunologic non-responders* o inmunodiscordantes

IR: *Immunologic responders* o respondedores inmunológicos

ITT: Análisis por intención de tratar

OT: Análisis “on treatment”

sCD14: CD14 soluble

TNF- α : factor de necrosis tumoral α

IL: interleuquina

PCR: proteína C reactiva

VSG: velocidad de sedimentación globular

NNRTI: Inhibidores de la Transcriptasa Inversa No análogos de los Nucleósidos

IP: Inhibidores de la Proteasa

2. INTRODUCCIÓN

La infección por VIH deteriora el tracto gastrointestinal: la translocación microbiana.

Gracias al tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA o TAR), la supresión virológica mantenida en el tiempo, es posible incluso en pacientes con infección por el VIH, incluso los que han recibido múltiples tratamientos y presentan altos niveles de resistencia. Sin embargo, la inmunosupresión persistente crónica, que contribuye a la progresión de la enfermedad y a las complicaciones clínicas en individuos viralmente suprimidos apunta a factores adicionales que contribuyen a la inflamación sistémica distintos de la replicación del VIH: la **translocación microbiana** es uno de esos factores.

Las células dendríticas y los linfocitos localizados en la lámina propia de la mucosa rectal constituyen el sistema GALT (*Gut-Associated Lymphoid Tissue*), donde más del 90% de los linfocitos se encuentran en estado de activación, y representa la primera diana de la infección por el VIH, independientemente de la vía por la que se haya adquirido la infección (1). La consecuencia es que durante los primeros días de la infección se produce una destrucción masiva de los linfocitos de la lámina propia intestinal, que representa más del 50% de los linfocitos totales del organismo, sobre todo a nivel del íleon (2,3). La destrucción se produce por efecto citopático directo del virus sobre las células infectadas pero también por mecanismos apoptóticos inducidos por las proteínas virales, especialmente la gp160. Este daño es irreversible, por lo que la barrera estructural e inmune, que protege al organismo del paso de gérmenes a través de la mucosa intestinal, se ve profundamente dañada tras la primoinfección, y se mantiene en el tiempo al no ser restaurada a pesar de la administración de un TAR efectivo (4,5). La pérdida masiva de LT CD4+ intestinales y la alteración anatómo-funcional del epitelio intestinal (aumento de la permeabilidad) tiene como consecuencia la aparición de fugas en la circulación sistémica de subproductos bacterianos, como lipopolisacáridos (LPS) de la pared celular bacteriana de las bacterias Gram-negativas y al ácido lipoteicoico de las bacterias Gram-positivas que contribuyen a una activación inmune sistémica, fenómeno denominado "**Translocación microbiana**" (6,7).

La translocación microbiana:

Las estructuras del sistema GALT están estratégicamente situadas en las zonas donde se encuentra mayor concentración de microbioma (Placas de Peyer y folículos linfoides) (8). En ausencia de patología, la interacción hospedador-microbioma conduce a un predominio de los mecanismos de tolerancia hacia el microbioma residente. El sistema

inmune es el encargado de controlar el delicado equilibrio entre el crecimiento microbiano y su contención. El muestreo y reconocimiento del contenido del intestino es crucial ya que la microbiota (microorganismos que componen el microbioma) es responsable del 70% del total de respuesta inmune. Cuando la célula presentadora de antígenos reconoce las partículas bacterianas y estimula la expansión clonal de los linfocitos T, ha de haber un equilibrio entre la respuesta Th17 (reclutándose neutrófilos al sistema GALT y aumentando la secreción de citoquinas proinflamatorias) y la respuesta mediada por las células T reguladoras (Treg), que producen citoquinas antiinflamatorias y son los elementos responsables de la tolerancia inmunológica a estos bioproductos. La destrucción de las células T CD4+ asociada con la activación inmune en el intestino conduce a la infiltración masiva de células T CD8+ y al daño celular epitelial, aumentando la producción de IFN- γ , IL-6, IP-10 (9). Una de las consecuencias más significativas del deterioro del sistema GALT provocado por la infección por VIH es la disminución drástica de las células Th17 y un aumento en la frecuencia inmunosupresora de las células Treg en el GALT (10). La alteración del equilibrio Th17 / Treg en el GALT a favor de las Treg inducida por el VIH compromete la inmunidad intestinal, y expone al huésped, mediante la translocación bacteriana, a una amplia gama de bioproductos microbianos que pasan al torrente sanguíneo y que tienen como consecuencia una activación inmunitaria generalizada y persistente y a la progresión de la enfermedad (11,12).

¿Cómo medimos la translocación microbiana?

La translocación bacteriana induce la producción de moléculas del sistema inmune innato en respuesta a productos bacterianos circulantes; como la **Lipid- Binding Protein** o **LBP**. La LBP es una molécula que forma parte de la inmunidad innata, producida en los hepatocitos así como por las células epiteliales del intestino y los pulmones tras la inducción de IL-6 e IL-1, y media la respuesta del huésped frente a componentes de la membrana celular de las bacterias Gram negativas (como los lipopolisacáridos de la pared bacteriana o LPS) y el ácido lipoteicoico de las bacterias Gram positivas presentes en la circulación sistémica (13). La LBP media la iniciación de la respuesta inmunitaria del huésped ante los ácidos lipopolisacáridos o lipoteicoicos facilitando su transferencia a los “*toll-like receptors*” ligados a la membrana del CD14, que finalmente activan la transducción de señalización de citocinas por monocitos y neutrófilos para controlar así la translocación microbiana circulante (14). Los niveles elevados de LBP se correlacionan con mayor inflamación sistémica y peor respuesta inmunológica, tanto en individuos VIH negativos, como VIH positivos, por lo que ha quedado establecido como marcador indirecto de la translocación microbiana (12,15).

Los niveles de translocación microbiana también se pueden medir mediante la forma soluble de CD14 (sCD14), un correceptor de los LPS que se libera en la circulación por los monocitos tras la estimulación del producto microbiano translocado (16,17). Otro parámetro de translocación utilizado en diferentes investigaciones es la medida de los niveles de rDNA bacteriano en plasma. Ambos parámetros se correlacionan con los niveles de LPS translocados y la magnitud de la inmunoactivación; su elevación persistente también se correlaciona con menor recuperación inmunológica y progresión a SIDA (18-20, *Figura 1*).

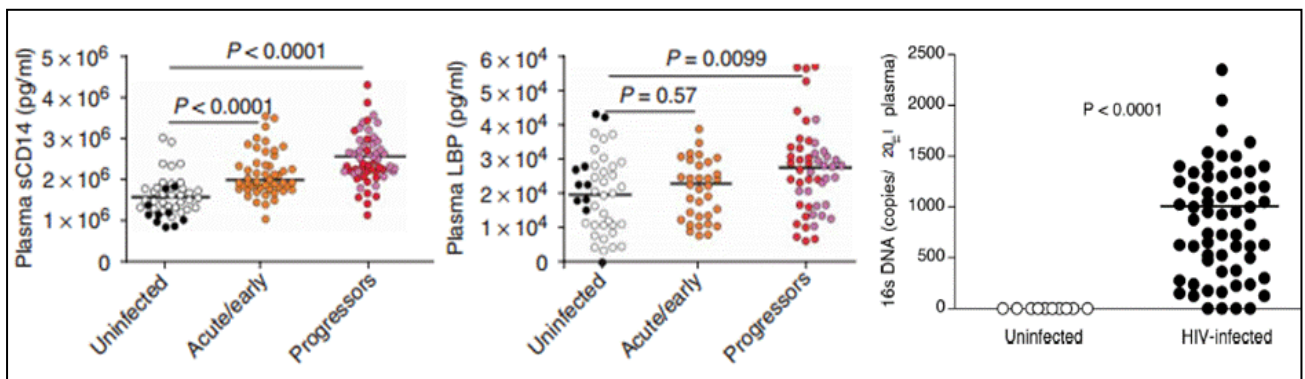


Figura 1: Los niveles de translocación bacteriana medidos mediante el CD14 soluble (sCD14), Lipid- Binding Protein (LBP) y 16s DNA plasmáticos son significativamente más elevados durante la infección aguda o temprana por VIH, y más aún cuando la enfermedad progresa. *Brenchley JM, et al. Nat Med. 2006;12:1365-71*

Efectos sistémicos de la translocación bacteriana: la inmunoactivación crónica y la progresión de la enfermedad

El Tratamiento Antirretroviral de Gran Actividad (TARGA) ha permitido mejorar radicalmente las expectativas de la infección por VIH, controlándola en diferentes aspectos. Sin embargo, numerosos estudios han demostrado que el deterioro permanente e irreparable de la barrera mucosa intestinal y la consecuente translocación bacteriana que ocurre durante la infección por el VIH desde el inicio, no mejora completamente tras la instauración del TARGA (21, *Figura 2*), ni a pesar de conseguir una supresión virológica mantenida en el tiempo.

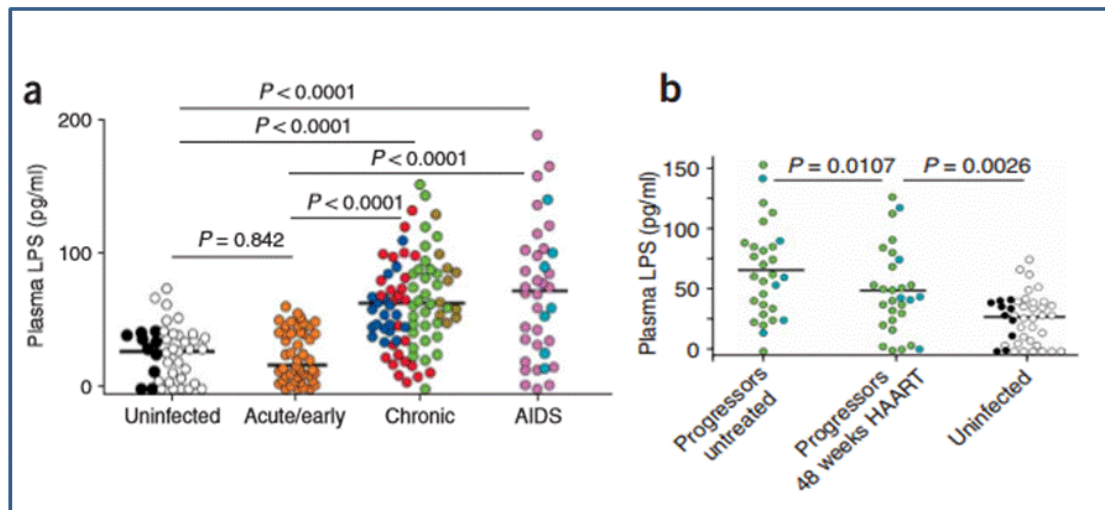


Figura 2. El daño del tracto gastrointestinal durante la infección por VIH. Los niveles de lipopolisacáridos bacterianos (LPS) son más elevados según progresa la infección por VIH (a) y no se normalizan a pesar de instaurar TAR (b).

Adaptado de Brenchley JM, et al. *Nat Med.* 2006;12:1365-71

El paso continuo de productos microbianos del epitelio intestinal al torrente sanguíneo juega un papel fundamental en el mantenimiento de la activación permanente del sistema inmune, y tiene como consecuencia efectos en todo el organismo (22,23). Los productos proinflamatorios derivados de la flora intestinal translocada (LPS, peptidoglicanos, ac. lipoteicoico, flagelina, DNA ribosomal, etc), producen efectos locales, y, tras atravesar el hígado, efectos sistémicos al estimular las células del sistema inmune innato (particularmente macrófagos y cél. dendríticas) y adaptativo (Linf. T), pero también células no inmunes (como las células endoteliales del sistema cardiovascular) (Figura 3). Múltiples estudios observacionales, en pacientes VIH tratados y sin TAR, han objetivado una correlación directa entre la detección de diferentes parámetros de translocación microbiana, la inmunoactivación crónica y la progresión de la enfermedad (24-29).

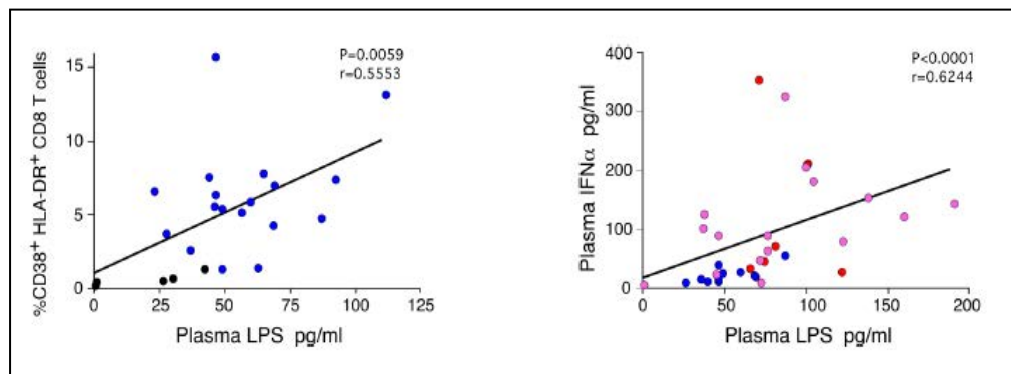


Figura 3. La translocación microbiana (LPS) contribuye a la activación de la inmunidad adaptativa e innata. Correlación entre los niveles de LPS y la frecuencia de %CD38+ HLA-DR+ LT CD8 e IF α circulantes en individuos con infección por VIH crónica. Brenchley JM, et al. *Nat Med.* 2006;12:1365-71

Esta hiperactivación inmunitaria o “**inflamación crónica**” mantenida en el tiempo, genera una liberación constante de citoquinas proinflamatorias y sustancias pro-coagulantes, y tiene como consecuencia efectos sistémicos deletéreos, relacionados directamente con la translocación bacteriana, demostrados en diferentes estudios realizados en pacientes VIH: incremento del riesgo cardiovascular secundario a arteriosclerosis (30), disfunción endotelial (31), HTA (32), e hipercoagulabilidad: la exposición crónica a productos bacterianos (LPS) tras la el aumento de permeabilidad de la mucosa intestinal activa al CD14 y TLR4 (“*Toll-like receptors*”), aumentándose la expresión del factor tisular en los monocitos activados y activándose la cascada de la coagulación (33,34). También se le ha atribuido a la translocación microbiana un papel importante en la patogénesis de neoplasias asociadas o no a SIDA, como linfomas (35), en la senescencia precoz y los déficits neurocognitivos (36), incluso aceleran la progresión de la infección crónica por VHB y VHC en los pacientes coinfectados (37-40). Además, la translocación bacteriana está asociada con la insuficiente reconstitución de células T CD4+ y contribuye a la patogénesis de la inmunodiscordancia.

El problema de la inmunodiscordancia en los pacientes VIH

Los pacientes con infección por VIH con deficiencia de recuento de células T CD4+ (<250 cél/ml) a pesar de recibir un tratamiento antirretroviral eficaz y mantenerse virológicamente suprimidos durante años, se han definido como no respondedores inmunológicos (“immunologic non-responders” o INR) o inmunodiscordantes (ID). Se estima que representan hasta el 30% de todos los sujetos infectados con VIH tratados. Esta ausencia de respuesta inmunológica es de gran relevancia clínica, ya que se ha demostrado desde hace tiempo su clara asociación con una morbi-mortalidad más alta (41). Este fenómeno ha sido ampliamente estudiado utilizando diferentes enfoques, y su patogénesis está relacionada con la edad avanzada, el nadir bajo de T CD4+ al inicio del TAR, la reducción de la función tímica, la co-infección por virus hepatotropos y a múltiples variantes genéticas (42). Sin embargo, la causa última de la respuesta discordante es la excesiva destrucción de células T CD4+ debido a su hiperactivación, la replicación viral residual y la estimulación antigénica persistente debido a la translocación microbiana (43,44) .

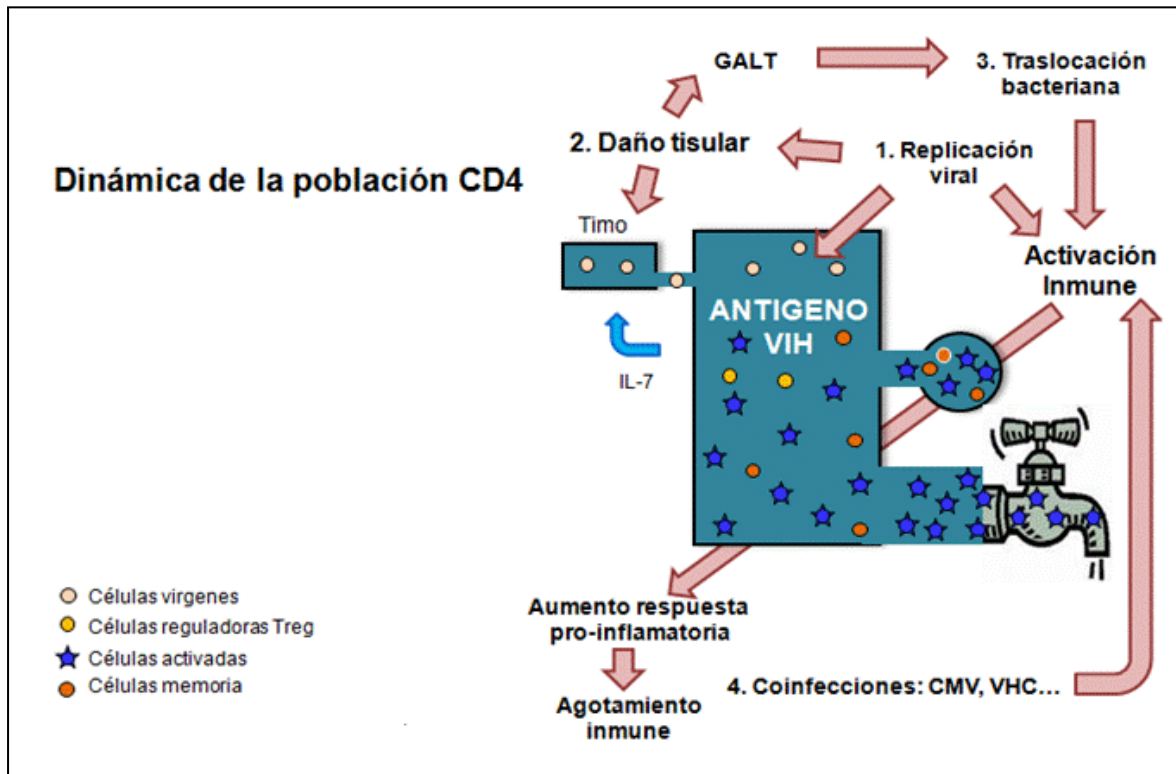


Figura 4: Dinámica de la población de LT CD4+.
Adaptado de Gazzola et al, 2009, CID 48:328-37

Se ha demostrado, incluso en pacientes con TAR, que existe una correlación entre los niveles de translocación microbiana y la insuficiente reconstitución de linfocitos T CD4+ (45,46). Se cree que una historia de inmunosupresión más avanzada condiciona el deterioro irreversible de la arquitectura del tejido linfoide tímico e intestinal (GALT), limitando su capacidad para controlar la translocación bacteriana. Esto favorece la inmuoactivación crónica y la escasa recuperación inmunológica o agotamiento inmune que define la inmunodiscordancia (47-49, Figura 4).

Teniendo en cuenta el escaso éxito de diferentes tratamientos probados para mejorar la inmunidad en los pacientes inmunodiscordantes, controlar la translocación microbiana podría posicionarse como una nueva diana terapéutica. Para ello es indispensable conocer en más profundidad la bioestructura del microbioma intestinal de este grupo de pacientes en especial riesgo.

El microbioma intestinal: el “órgano olvidado” y la revolución de la metagenómica

Es un tema de gran interés para la comunidad científica en general el impacto que tiene la composición de nuestro microbioma sobre determinadas enfermedades. El tracto gastrointestinal humano está poblado por una compleja comunidad de microorganismos cuya composición está modulada por el sistema inmune del huésped, con el que está íntimamente ligado (50). Es el órgano inmune más grande del organismo, ya que aloja el 90% del total de linfocitos, que se encargan de controlar una inmensa biomasa (10^{13} - 10^{14} células procariontas, 500-1000 especies bacterianas) que establecen relaciones simbióticas, mutualistas o patógenas con nuestro organismo, y que contienen un número de genes 100 veces mayor que el genoma humano (“metagenoma”). Las bacterias comensales tienen funciones protectoras (desplazamiento de patógenos, “efecto barrera”, competición por nutrientes y receptores, producción de factores antimicrobianos), estructurales (fortificación de la barrera, inducción de IgA, adelgazamiento apical de las uniones estrechas), tróficas (desarrollo del sistema inmune, control de la proliferación y diferenciación de las células epiteliales) y metabólicas (metabolismo de los carcinógenos de la dieta, síntesis de vitaminas, fermentación de los residuos no digeribles de la dieta y de la mucosidad derivada del epitelio, absorción de iones y ahorro de energía). Una alteración del microbioma intestinal, afecta a sus funciones estructurales, inmunitarias y metabólicas, y estas comunidades bacterianas (incluidos sus genes y sus rutas metabólicas), influyen directamente sobre el huésped, por lo que un microbioma disbiótico contribuye al mantenimiento de un estado de inflamación (local y sistémica) persistente (51).

Pero, ¿qué es un microbioma intestinal disbiótico?

Hasta hace poco, las propiedades del microbioma eran desconocidas. El cultivo *in vitro*, que ha sido la piedra angular de la microbiología desde el siglo XIX, no puede aplicarse al estudio de la relación de las comunidades microbianas entre ellas y con el huésped. Las nuevas técnicas de secuenciación masiva y las herramientas de bioinformática disponibles recientemente, que trabajan con los genes que codifican la 16S rDNA y permiten secuenciar el DNA de genomas completos, suponen una herramienta pionera que permite reconstruir filogenias o comparar perfiles de comunidades microbianas de la flora intestinal de cada individuo (52). Las plataformas de secuenciación han permitido además comparar enterotipos entre individuos sanos (53), o en un mismo individuo tras una intervención (p.ej, toma de TAR o probióticos), y ha supuesto una revolución en el estudio del origen de determinadas enfermedades relacionadas con un desbalance de

determinadas especies en el microbioma intestinal, que abarcan desde las enfermedades inflamatorias intestinales (54), diarrea crónica (55), la obesidad (56,57), la diabetes (58,59), el cáncer (60) o el envejecimiento prematuro (61), entre otras.

La gran relevancia que ha adquirido el microbioma intestinal en la patogénesis o la perpetuación de diferentes enfermedades y la posibilidad de estudiar su composición y dinámica con más profundidad ha hecho que se esté abriendo paso a nuevas estrategias terapéuticas que permitan modificar el llamado “gran órgano olvidado” hacia uno más beneficioso para el huésped (62).

El microbioma en la infección por VIH

Se ha podido demostrar por tanto, como un deterioro en el epitelio intestinal y en el sistema GALT conducido por la infección por VIH favorece la translocación bacteriana y como consecuencia, la inmunoadactivación crónica. Sin embargo, gracias a las nuevas técnicas de metagenómica, que permiten el estudio exhaustivo del ecosistema microbiano de los pacientes, se ha podido profundizar en estos hallazgos preliminares, encontrando además diferencias significativas no sólo en la estructura del epitelio y en los mecanismos de regulación inmune, sino también en la **composición del microbioma intestinal** en los pacientes VIH en comparación con los sujetos no infectados. La propia infección por VIH puede generar un microambiente disbiótico que facilita la adherencia de bacterias menos beneficiosas y la pérdida de las comensales habituales, que podrían contribuir a perpetuar la inmunoadactivación crónica (63-65, *Figura 5*).

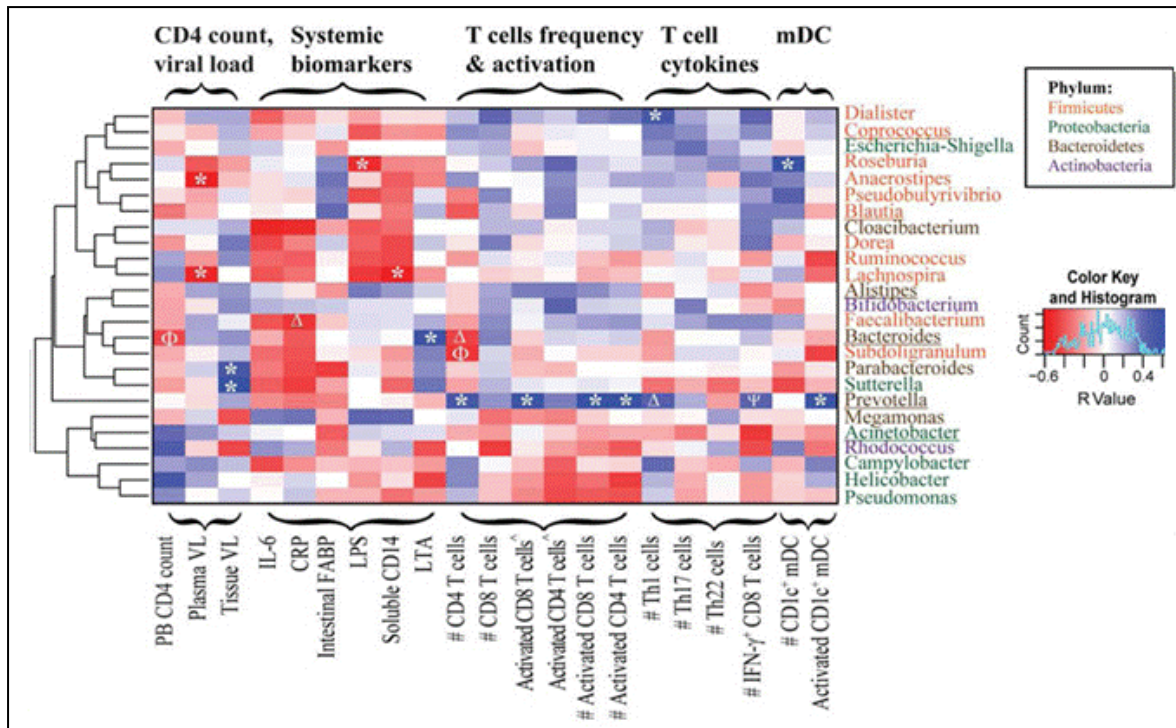


Figura 5: Asociaciones entre los 25 géneros más abundantes en los sujetos infectados con HIV-1 con diversos parámetros clínicos e inmunes. Los géneros tienen un código de colores basado en su respectivo filo. El *Heatmap* representa asociaciones positivas (sombreado azul) y negativas (sombreado rojo) entre el recuento de CD4+, la carga viral plasmática y tisular, la frecuencia de las células T de la mucosa, la activación, T helper cell (Th)1, Th17 y Th22 y IFN- γ y así como frecuencia y activación de cél. Dendríticas (CD1c + mDC). #: Número por gramo de tejido mucoso; Δ Porcentaje de células T CD4+ o CD8+ activadas dentro de células CD45+ viables. * $p < 0.05$, $\Delta p < 0.06$, $\phi p < 0.07$, $\psi p < 0.08$.
Dillon *et al. Mucosal Immunol.* 2014

Ellis *et al.* objetivaron como los niveles más altos de Enterobacteriales y Bacteroidales se correlacionaban con la disminución de TCD4+ del GALT y mayor activación inmune en pacientes con VIH en comparación con los controles sanos (66). Gori *et al.* observaron una sobrerrepresentación de especies potencialmente patógenas, (*Candida albicans* y *Pseudomonas aeruginosa*) durante la primoinfección (67). Mutlu *et al.* demostraron, en pacientes VIH virológicamente suprimidos, que los niveles más altos de Bifidobacterias y *Lactobacillus* se asociaban con una disminución de la translocación microbiana y porcentajes más altos de células T CD4+ en el intestino y la periferia (63). Estas especies se agotaban en el microbiota fecal de pacientes con VIH no tratados (63,67,68). Vujkovic-Cvijin *et al.* objetivaron mediante biopsias intestinales, que los pacientes con VIH virémicos tenían comunidades de microbiota claramente enriquecidas en Proteobacteria, más notablemente la familia *Enterobacteriaceae*, patógenos entéricos que se relacionaron con la inflamación sistémica (IL-6), así como una disminución en las proporciones de Bacteroides y Alistipes, que se también se agotan en la enfermedad inflamatoria intestinal (69). Lozupone *et al.* analizaron la dinámica del microbioma

intestinal en pacientes VIH en distintos períodos de tiempo, concluyendo que los géneros de bacterias que se elevaban en los pacientes VIH+ como *Peptococcus* disminuyeron al instaurarse el TAR, hasta alcanzar niveles cercanos (pero no iguales) a los de los sujetos sanos (70). El microbioma intestinal no sólo tiene una función estructural e inmunitaria; su actividad metabólica influye a su vez en el metabolismo del hospedador (57). Dependiendo de los diferentes grupos de bacterias que colonicen el epitelio intestinal, se activarán diferentes vías metabólicas que tendrán repercusión sobre el huésped, ya que pueden propiciar el mantenimiento de la inmuoactivación crónica y la progresión de la enfermedad (69). A su vez, esta inmuoactivación fomenta un ecosistema donde predomine un microbioma disbiótico o pro-inflamatorio, por lo que nos encontraríamos ante un bucle de retroalimentación auto-sostenible.

En pacientes inmunodiscordantes el estudio del microbioma mediante secuenciación masiva prácticamente no se ha explorado; en un estudio reciente, que objetivó diferencias taxonómicas significativas al estratificar por orientación sexual, el grupo de pacientes ID mostraron una menor diversidad de especies (71).

Sin embargo, todos estos estudios aportan sólo datos preliminares sobre los efectos específicos que el VIH ejerce sobre la composición microbiana y los mecanismos exactos que relacionen los diferentes patrones con los procesos inflamatorios y su influencia en la progresión de la infección por VIH. Esta comprensión es fundamental para el desarrollo de terapias eficaces dirigidas a modificar el microbioma intestinal hacia uno menos disbiótico.

El microbioma como nueva diana terapéutica en el paciente VIH:

Recientemente, el microbioma intestinal se ha propuesto como un nuevo objetivo terapéutico para la reducción de la inflamación crónica también en la infección por VIH (72,73). Se han propuesto diferentes intervenciones para modificar la flora residente intestinal como prebióticos (74), aunque los resultados más prometedores por el momento se han obtenido administrando **probióticos**, definidos como microorganismos vivos no patogénicos que colonizan el intestino y proveen de un potencial beneficio al huésped. Determinadas cepas han demostrado mejorar el epitelio intestinal desde el punto de vista estructural e inmunomodulador, siendo efectivos como prevención y/o tratamiento de patologías caracterizadas por inflamación en el tracto gastrointestinal (75-77).

Con respecto a la infección por VIH, los primeros estudios se realizaron con *Bifidobacterium lactis* (78) y *Streptococcus thermophilus* en niños infectados por el VIH en Brasil (79), *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 y *L. reuteri* RC-14 en niños en Nigeria (80) y en Tanzania (81,82). Estos suplementos lácteos protegieron contra la pérdida de LT CD4+, mejoraron las curvas de crecimiento y los síntomas gastrointestinales a pesar de no administrarse TAR. Klatt *et al.* demostraron mediante biopsias intestinales de macacos con SIV que la suplementación con un simbiótico (probiótico/prebiótico) aumentó la frecuencia y la funcionalidad de las células presentadoras de antígenos y de los LT CD4+ del colon, pero no periféricos, redujo la fibrosis de los folículos linfoides en el colon, disminuyendo la translocación bacteriana y la inflamación (83). Pero no todos los probióticos han demostrado la misma eficacia: *Bacillus coagulans* durante 3 meses no aumentó el recuento de células T CD4+ en plasma ni redujo los niveles de IL-6 ni dímero-D, comparado con placebo (84) y el probiótico VSL#3, compuesto por especies de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Streptococcus* ha mostrado resultados discordantes (85,86).

Por tanto, ¿qué probiótico elegir?

Determinados probióticos se han mostrado eficaces a la hora de disminuir la permeabilidad intestinal al mejorar su bioestructura, sin embargo los efectos inmunomoduladores de los probióticos son cepa-dependientes, y no todos reducen la inflamación intestinal en el mismo grado. *S. boulardii* es uno de los probióticos cuyas características se encuentran mejor avaladas por numerosos estudios científicos exhaustivos (87,88). El uso terapéutico de la levadura *Saccharomyces boulardii* para la prevención y el tratamiento de diferentes enfermedades se basa en su mecanismo de acción, farmacocinética y eficacia clínica demostrada tanto en modelos animales como en ensayos clínicos, sin objetivarse efectos adversos (89). Sus características, entre las que destacan su efecto trófico reparador de la mucosa intestinal, (con la consecuente disminución de la permeabilidad), su acción anti-toxina y su efecto inmunomodulador, no se observan en otros probióticos.

Propiedades de *S. boulardii* :

- Sobrevive a la temperatura corporal (37°C), resiste el PH gástrico y a los ácidos biliares.
- Propiedades farmacocinéticas: se administra vía oral, alcanza concentraciones máximas los tres primeros días (en heces, 2×10^7 /g) y se elimina en un plazo de 3-5 días después de haberse interrumpido el tratamiento.

Mecanismos de acción de *S. boulardii* (Figura 6):

- **Acción luminal:** Mejora la integridad de la unión estrecha entre los enterocitos y las cadenas (AGCC), que están alterados cuando existe una enfermedad subyacente.
- **Acción anti-toxina:** Interfiere con las toxinas patógenas dificultando su unión a la luz intestinal mediante el bloqueo de los receptores de las toxinas patógenas, o actuando como un receptor señuelo para la toxina y la destrucción directa.
- **Actividad antimicrobiana:** *S. boulardii* inhibe directamente el crecimiento de patógenos, tales como *Candida albicans*, *Salmonella Typhimurum*, *Yersinia enterocolitium*, *Aeromonas*, etc.
- **“Cross-talk” con la microbiota normal:** labor conjunta, además de la digestión, en la "resistencia a la colonización". Produce *bacteriocinas* (enzimas perjudiciales para el crecimiento de patógenos). Actúa como sustituto de la microflora normal hasta que se logra su restablecimiento cuando ha sido alterada.
- **Efectos tróficos:** *S. boulardii* reduce la mucositis, restaura las vías de transporte de fluidos, y tiene un efecto trófico por la liberación de espermina y espermidina, que ayudan a la maduración de los enterocitos (90).
- **Regulación de la respuesta inmune y acción antiinflamatoria:** *S. boulardii* actúa como inmunomodulador, tanto dentro de la luz intestinal como a nivel sistémico. Aumenta los niveles de IgA secretora en el intestino y reduce las respuestas proinflamatorias, al afectar la migración de las células T, promoviendo su acúmulo en los ganglios linfáticos mesentéricos y limitando tanto la infiltración de las células Th1 en el cólon como la amplificación de la inflamación inducida por la producción de citocinas proinflamatorias (91); función similar al efecto protector de la flora normal del cólon. Además, *S. boulardii* tiene un efecto antiinflamatorio adicional inhibiendo la activación de las células dendríticas inducida por los LPS (92,93).

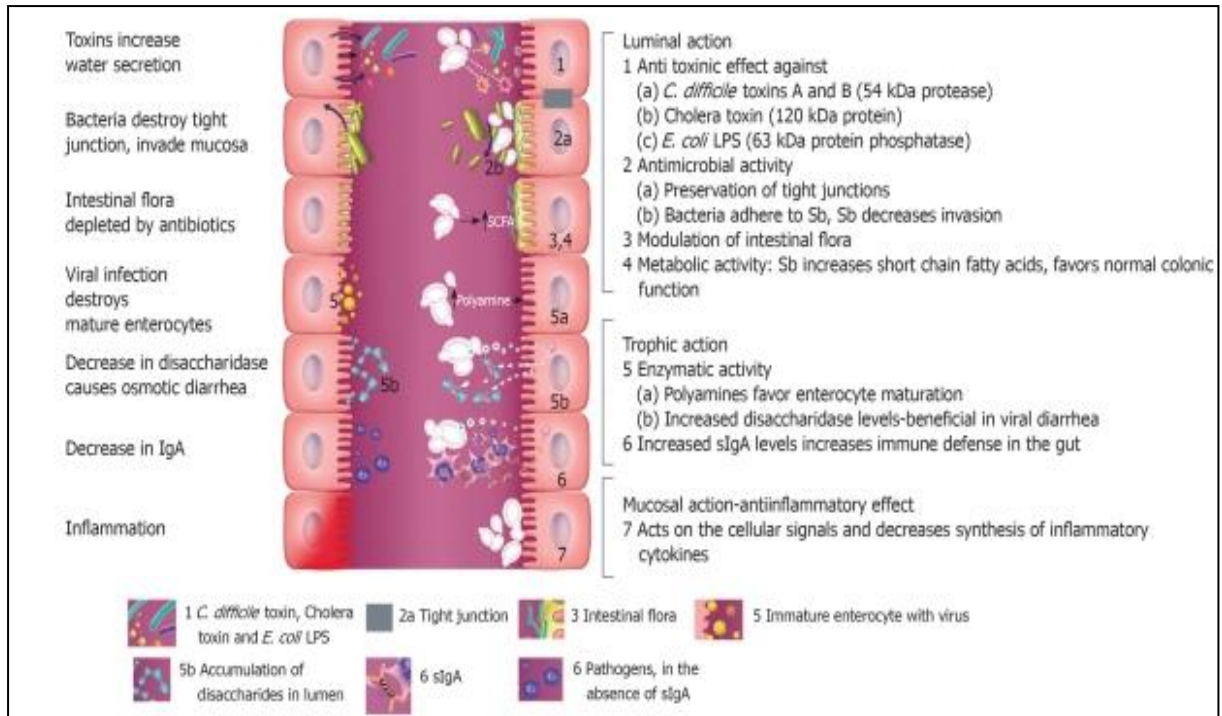


Figura 6. Esquema del tracto gastrointestinal, ilustrando los diferentes mecanismos de acción de *Saccharomyces boulardii* (*Sb*). A la izquierda, se representan los efectos de diferentes microbios patógenos. A la derecha, se representan siete efectos protectores diferentes de *S. boulardii*. Dentro del lumen intestinal, *S. boulardii* puede degradar las toxinas de los patógenos, interferir con la adherencia patogénica, modular la microbiota habitual y preservar la fisiología intestinal normal. *S. boulardii* también puede restaurar indirectamente el equilibrio normal de ácidos grasos de cadena corta (SCFA, aumentar los niveles de IgA secretora (sIgA) o actuar como un regulador inmunológico al influir en los niveles de citoquinas. *Mc Farland et al. World J Gastroenterol. 2010*

Los recientes avances en la comprensión de la inmunología de la mucosa GI y la evidencia de los efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios de *S. boulardii* abren perspectivas prometedoras (87,94). Estos resultados sugieren que la administración de *S. boulardii* puede tener un efecto beneficioso en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por un aumento de la permeabilidad intestinal, la inflamación y la translocación bacteriana (95,96). Por lo tanto, y aunque hasta ahora no se había investigado, también puede ser capaz de reducir la translocación bacteriana y la consiguiente inflamación crónica que caracteriza la infección por el VIH.

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Hipótesis de trabajo

En los pacientes VIH persiste un estado de inflamación crónica a pesar de un TAR eficaz, debido en parte a la translocación bacteriana intestinal secundaria a la disbiosis propia de la infección.

La suplementación oral con el probiótico *Saccharomyces boulardii* disminuiría la enteropatía asociada a la infección por VIH, y, como consecuencia, minimizaría la translocación microbiana y la inmunoadactivación crónica secundaria, incluso en pacientes con supresión virológica. Este efecto beneficioso podría deberse en parte a que el probiótico produce un cambio en la composición del microbioma intestinal, hacia un patrón menos proinflamatorio.

Los pacientes inmunodiscordantes presentan más translocación microbiana e inflamación sistémica, así como una como un microbioma intestinal alterado, por lo que podrían beneficiarse también de este tratamiento.

Objetivos

Principal:

Analizar el efecto del probiótico *Saccharomyces boulardii* sobre la translocación bacteriana, la inflamación sistémica y la composición del microbioma intestinal en un grupo de pacientes VIH virológicamente suprimidos, la mitad de ellos inmunodiscordantes.

Objetivos secundarios:

1. Analizar si el probiótico tiene un efecto sobre la reconstitución inmune (recuento de T CD4/CD8).
2. Explorar la tolerancia y la seguridad del probiótico en pacientes VIH+.
3. Analizar la duración en el tiempo de los efectos del probiótico sobre la translocación bacteriana y la inflamación tras la interrupción del mismo.
4. Estudiar si la translocación microbiana se relaciona con la inflamación sistémica.
5. Evaluar si el probiótico modifica la composición del microbioma intestinal disminuyendo especies que se correlacionan con mayor translocación bacteriana e inflamación sistémica.
6. Analizar si los pacientes inmunodiscordantes presentan mayor translocación bacteriana, inflamación sistémica y un patrón diferente de microbioma intestinal.

4. PUBLICACIONES

4.1. PRIMER ARTÍCULO

“Efecto de los probióticos (*Saccharomyces Boulardii*) sobre la translocación microbiana y la inflamación en pacientes VIH tratados: ensayo clínico doble ciego, aleatorizado, controlado con placebo.”

Objetivo principal: Analizar los cambios en los parámetros de la translocación microbiana medida mediante la *Lipid-Binding Protein* (LBP) después del tratamiento con el probiótico *Saccharomyces boulardii* en un grupo de pacientes infectados por VIH con supresión virológica.

Objetivos secundarios:

- Estudiar los cambios en los marcadores de actividad inmune, como el factor de necrosis tumoral (TNF- α), interleuquina 6 (IL-6), PCR de alta sensibilidad, β 2 microglobulina, VSG y fibrinógeno, además de las concentraciones plasmáticas de CD14 soluble (sCD14) y el recuento de linfocitos T CD4+ y CD8+ tras la administración del probiótico, comparado con placebo.
- Analizar la seguridad y tolerabilidad del probiótico *S. boulardii* en pacientes VIH.

Diseño del estudio: Estudio controlado prospectivo aleatorizado, doble ciego.

Sujetos: Pacientes afectos de infección crónica por VIH con seguimiento en el Hospital del Mar. Tamaño muestral: 44 casos, previamente seleccionados y divididos en 2 grupos en base a los siguientes criterios de inclusión:

- (1) Pacientes con CD4+>400 células/ml (“Immunologic responders” o IR) y carga viral indetectable desde hace más de 2 años bajo tratamiento antirretroviral (n=22)
- (2) Pacientes con criterios de inmunodiscordancia (“Immunologic non-responders” o ID), definida como recuperación de células TCD4+<350 células/ml a pesar de 4–7 años de TAR efectivo (n=22).

Los **criterios de exclusión** fueron los siguientes:

- Exposición a alimentos o suplementos que contuvieran probióticos en los 6 meses anteriores a la inclusión.
- Cambios en el régimen de TAR en los 2 años previos.
- Presencia de una enfermedad concomitante grave en el momento de la inclusión o anomalías en las pruebas de laboratorio de cualquier grado.

* El uso previo de antibióticos o su utilización durante el estudio por cualquier patología concomitante no supuso un criterio de exclusión, pero se tuvo en cuenta a la hora de realizar el análisis de los datos.

Intervención: Los pacientes se randomizaron (1:1) mediante una lista de aleatorización generada por un ordenador en el Servicio de Farmacia a 2 subgrupos según la intervención asignada (doble ciego):

- (A) se les asignó suplementación oral diaria con *S. boulardii* (cápsulas con 56,5 mg o 1 billón de levaduras vivas, 2 cápsulas 3 veces al día) (n = 22) durante 12 semanas.
- (B) se les asignó placebo, 2 cápsulas 3 veces al día (n = 22) durante 12 semanas.

RESULTADOS

Sujetos

Entre agosto de 2012 y julio de 2013, 44 pacientes fueron incluidos en el estudio: 22 inmunodiscordantes y 22 inmunorespondedores al TAR, la mitad de cada grupo se le asignó tratamiento con placebo, y la otra mitad con el probiótico (**Figura 1** del artículo). La mayoría de los parámetros demográficos y clínicos estaban bien apareados entre el grupo de tratamiento probiótico (n = 22) y el grupo de placebo (n = 22) tal y como se muestra en la **Tabla 1** del artículo. La mediana de edad fue de 47,5 años, el 84% eran varones, y los factores de riesgo para la adquisición de la infección fueron: contagio por vía heterosexual (46%), hombres que tienen sexo con hombres (38%) y usuarios de drogas por vía parenteral (16%). Todos los pacientes habían suprimido la carga viral durante una mediana de 4,7 años, recibían un TAR basado en NNRTI (75%) o en IPs (25%). La mediana de T CD4+ nadir fue de 108 células/ μ l, y el 41% tenía diagnóstico de SIDA.

Con respecto a los análisis de seguridad, no hubo cambios significativos en los marcadores bioquímicos o hematológicos plasmáticos ni en la morfología fecal (medida por la escala de Bristol) ni en la frecuencia de las deposiciones. Todos los participantes completaron el estudio; ninguno suspendió su participación debido a los efectos secundarios de los tratamientos o a enfermedades concomitantes.

Cambios en los parámetros de translocación microbiana e inflamación después de la intervención

En el análisis cuantitativo por intención de tratar (ITT, n = 44), en la que los 44 los pacientes fueron incluidos, sólo los niveles de β 2-microglobulina mostraron una tendencia decreciente en el grupo probiótico vs el grupo placebo (p= 0,06). En el análisis cualitativo (definido como una disminución o un aumento de los valores en relación con los parámetros basales) por intención de tratar (ITT), el único parámetro que disminuyó significativamente después de 12 semanas de tratamiento fue la LBP: 13,6% (n = 3) en el grupo placebo vs 50% (n = 11) en el grupo probiótico (p = 0,02). Los niveles de β 2-microglobulina también mostraron una disminución significativa en la semana 24 (p = 0,01) en el grupo de los pacientes que recibieron el probiótico. Estos resultados se especifican en la **Tabla 2** del artículo.

Cuando se realizó un análisis “On treatment” (OT, n = 35), en el que se excluyeron los pacientes que sufrieron eventos clínicos significativos durante el curso del estudio (como la sepsis urinaria o neumonía, que requirieron de una terapia antimicrobiana de amplio espectro), se objetivó una disminución significativa en los niveles cuantitativos de LBP (p = 0,02) e IL-6 (p = 0,00) (**Figuras S1 y S2 del contenido suplementario** del artículo), así como una tendencia decreciente en los niveles de PCR ultrasensible (p = 0,07) en el grupo probiótico frente al grupo placebo después de 12 semanas de tratamiento. Los cambios en la LBP y la IL-6 se mantuvieron estadísticamente significativos a los 3 meses después de la interrupción del tratamiento. Además, los niveles de β 2-microglobulina mostraron una disminución significativa en la semana 24 (p = 0,05). Sin embargo, dadas las diferencias significativas que se encontraron basalmente entre los 2 grupos asignados al azar en los niveles de β 2-microglobulina, este resultado debe interpretarse con precaución (**Figura S3 del del contenido suplementario** del artículo). En el análisis cualitativo OT, se observó nuevamente un descenso de la LBP tras las 12 semanas de tratamiento (disminución de 57,9% y 6,2% en el grupo probiótico y grupo placebo, respectivamente; p = 0,002). Estos resultados se muestran en la **Tabla 3** del artículo.

El probiótico no mostró efectos significativos sobre los marcadores inmunológicos IgE, IgG, interferón gamma e IL-10. Asimismo, no hubo cambios en el recuento de linfocitos T CD4+ y CD8+ (totales ni porcentaje). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros de inflamación e inmunidad en el grupo de inmunodiscordantes comparado con el grupo de respondedores inmunológicos (eficacia similar en ambos).

“Effect of probiotics (S.Boulardii) on microbial translocation and inflammation in HIV-treated patients: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial”. J Acquir Immune Defic Syndr. 2015 Mar 1;68(3):256-63.

doi: 10.1097/QAI.0000000000000468

doi: 10.1097/QAI.0000000000000468

doi: 10.1097/QAI.0000000000000468

doi: 10.1097/QAI.0000000000000468

doi: 10.1097/QAI.0000000000000468

doi: 10.1097/QAI.0000000000000468

doi: 10.1097/QAI.0000000000000468

doi: 10.1097/QAI.0000000000000468

CONTENIDO SUPLEMENTARIO DEL PRIMER ARTÍCULO

Figura S1: Cambios en IL-6 tras 3 meses de tratamiento

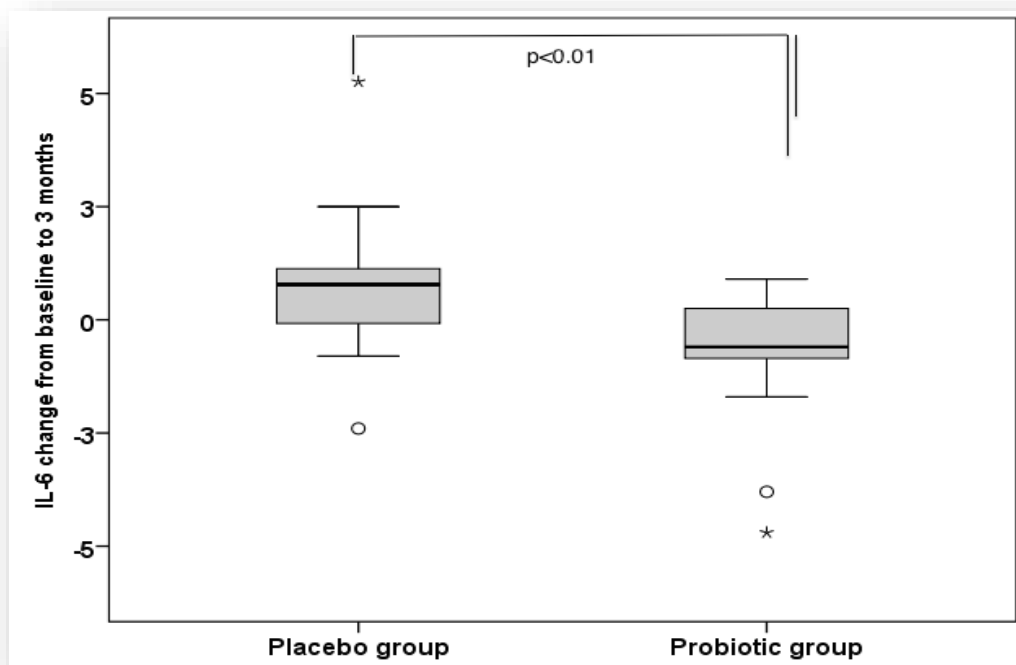


Figura S2: Cambios en LBP tras 3 meses de tratamiento

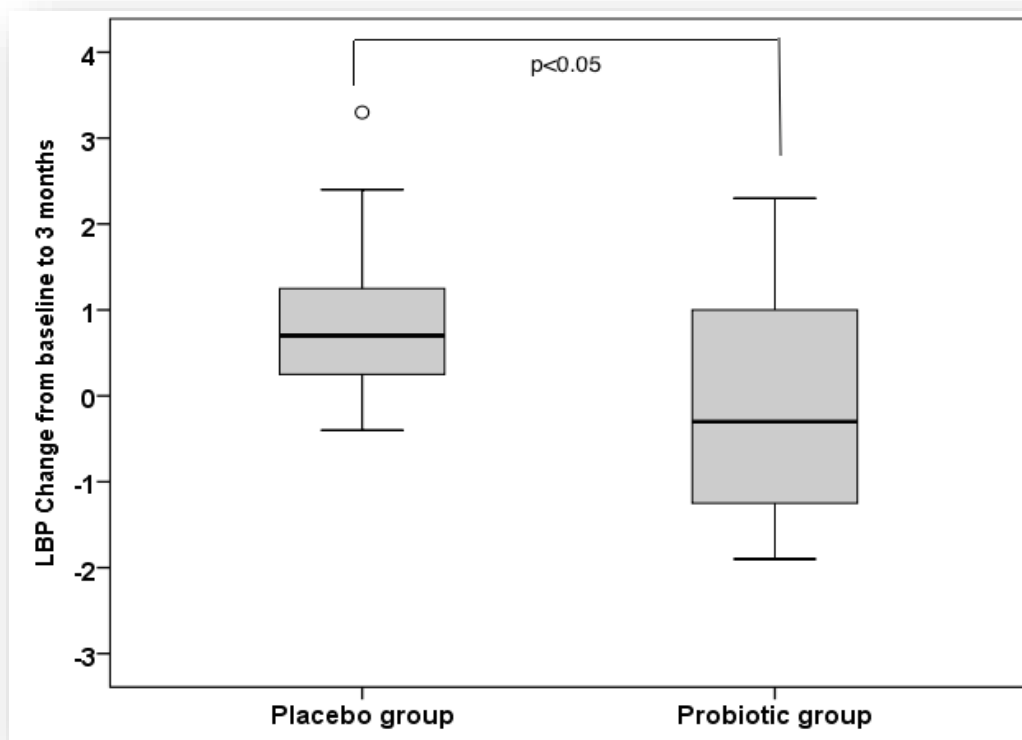
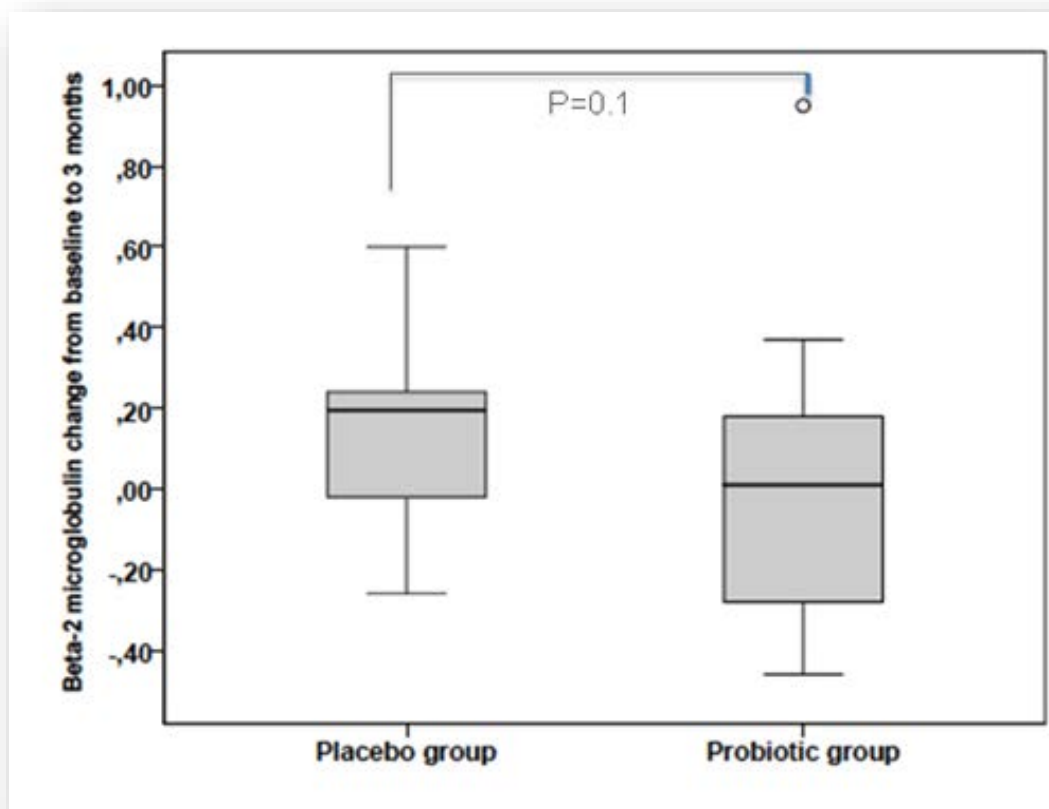


Figura S3: Cambios en $\beta 2$ microglobulina tras 3 meses de tratamiento



4.2. SEGUNDO ARTÍCULO

“Impacto del probiótico *Saccharomyces boulardii* en la composición del microbioma intestinal en pacientes VIH tratados: ensayo doble ciego, aleatorizado, controlado con placebo.”

Objetivo principal: Analizar, mediante técnicas de secuenciación 16S rDNA en heces, el impacto del tratamiento con el probiótico *Saccharomyces boulardii* sobre la composición del microbioma intestinal de los 44 pacientes VIH incluidos en el estudio previo (la mitad inmunodiscordantes), para determinar si su efecto beneficioso sobre los parámetros de translocación e inflamación puede deberse en parte a una modificación de la composición del microbioma hacia especies que se correlacionaban con menos translocación bacteriana e inflamación.

Objetivos secundarios:

- Determinar si los parámetros plasmáticos de translocación bacteriana se correlacionaban con los de inflamación sistémica.
- Analizar si las especies modificadas por el probiótico se correlacionaban con determinados parámetros de translocación microbiana (LBP y CD14 soluble) e inflamación sistémica (IL6).
- Explorar si los pacientes inmunodiscordantes presentaban más translocación bacteriana e inflamación sistémica así como a un patrón de microbioma intestinal diferente, comparado con los pacientes no inmunodiscordantes.

Diseño del estudio: Se analizaron de manera retrospectiva las muestras de heces recogidas (y almacenadas a -80°C) durante el ensayo clínico prospectivo, randomizado, doble ciego, recogidas al inicio de la intervención y tras 12 semanas de tratamiento con el probiótico *S. boulardii* o placebo.

Sujetos: 44 pacientes VIH, con carga viral plasmática indetectable (<20copias/ml) durante >2 años, la mitad de ellos inmunodiscordantes (ID o INR) (T-CD4+<350 cél/ml), randomizados a recibir durante 12 semanas suplementación oral con *S.boulardii* o placebo (**Figura 1** del artículo). Las características basales de los grupos placebo y probiótico se muestran en la **Tabla S1, en la información de soporte** del artículo.

RESULTADOS

La translocación microbiana se correlaciona con la inflamación sistémica

Antes de la intervención, se analizó la asociación entre los marcadores en plasma de translocación microbiana y de inflamación sistémica de los 44 pacientes, observando una correlación estadísticamente significativa entre los niveles de LBP y los niveles plasmáticos de CD14 soluble ($r = 0,48$, $p = 0,001$), PCR ($r = 0,63$, $p = 0,0001$), fibrinógeno ($r = 0,64$, $p = 0,0001$), nadir de Cd4 ($r = -0,53$, $p = 0,001$), $\beta 2$ microglobulina ($r = 0,59$, $p = 0,0001$), VSG ($r=0.57$, $p= 0,0001$), e IL - 6 ($r = 0,58$, $p = 0,0001$). Mediante un análisis de regresión logística multivariante, la LBP se correlacionó independientemente con PCR, VSG y CD14 soluble (**Tabla S2, información de soporte** del artículo).

Saccharomyces boulardii produce cambios en algunas comunidades bacterianas intestinales

El análisis de correspondencia canónica mostró la alta influencia del efecto probiótico frente al efecto del tiempo (eje vertical), como muestra la **Figura 2** del artículo. Los cambios en la composición del microbioma intestinal después de las intervenciones se muestran en la **Figura S1 en la información de soporte** del artículo, grupo de ID. Tras 12 semanas de tratamiento probiótico, se observó una disminución significativa en los niveles de algunas especies de Clostridiales con respecto a la línea de base en comparación con el placebo (**Figura 3** del artículo). También se observó una disminución significativa en las comunidades de *Catenibacterium* (2,65 a 0,04, $p = 0,00003$), y un aumento en los niveles de Megamonas ($p = 0,02$) y Desulfovibrionales ($p = 0,05$). Estos hallazgos fueron similares en los grupos INR e IR.

Posteriormente se investigó si existía una correlación entre estas diferentes poblaciones modificadas por el probiótico y los parámetros de translocación microbiana e inflamación sistémica en plasma, observándose una correlación estadísticamente significativa entre la proporción de determinados géneros de Clostridia y las concentraciones plasmáticas de CD14 soluble ($r = 0,63$, $p = 0,03$), LBP R = 0,71, $p = 0,009$), e IL-6 ($r = 0,69$, $p = 0,0008$). Los resultados se muestran en las **Figuras 4 a-c** del artículo. Estas correlaciones se objetivaron en el grupo INR, pero no en los IR, probablemente porque los IR tienen una menor abundancia relativa de *Clostridiaceae* basalmente. Las correlaciones no son estadísticamente significativas en el grupo tratado con probióticos, probablemente debido a que la representación de estas comunidades bacterianas era muy baja por el efecto probiótico (**Figuras 5 a-c** del artículo).

La inmunodiscordancia se asocia con una mayor translocación microbiana y la presencia de algunas especies proinflamatorias

Las diferencias basales entre los grupos INR e IR se resumen en la **Tabla 1** del artículo. El análisis cuantitativo de los datos basales mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo INR y el grupo IR en las siguientes variables: edad, coinfección por VHC, LBP y niveles de $\beta 2$ microglobulina. Los INR tendieron a tener niveles más altos de fibrinógeno y CD14 soluble. En comparación con el grupo IR, el grupo INR tuvo una mayor proporción de individuos con valores superiores a la mediana de LBP (68,2% vs 27,3%, $p = 0,007$); CD14 soluble (72,7% frente a 40,9%, $p = 0,03$); B2 microglobulina (66,7% frente a 33%, $p = 0,022$) y fibrinógeno (65% frente a 31,8%, $p = 0,03$).

La LBP elevada se asoció con la INR (Riesgo Relativo = 5,71; IC del 95% = 1,56-20,93; $p = 0,015$) y en el análisis de regresión condicional hacia atrás, la LBP elevada fue la única variable que pudo explicar la falta de respuesta inmunológica (OR = 6,22, IC del 95% = 1,63 - 23,75, $p = 0,007$) (**Tabla S3, información de soporte** del artículo).

Al analizar la composición del microbioma intestinal basalmente (antes de la intervención), se observó una mayor abundancia relativa de algunas especies de Firmicutes (Clostridia) en el grupo INR con respecto al grupo IR, como *Lachnospiraceae* (OR = 3,4, $p = 0,05$). La abundancia relativa del género Proteobacteria también fue significativamente mayor en el grupo de inmunodiscordantes (**Tabla S4, información de soporte** del artículo).

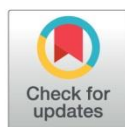
RESEARCH ARTICLE

Impact of probiotic *Saccharomyces boulardii* on the gut microbiome composition in HIV-treated patients: A double-blind, randomised, placebo-controlled trial

Judit Villar-García^{1,2,3*}, Robert Güerri-Fernández^{1,2,3}, Andrés Moya^{4,5}, Alicia González^{1,2}, Juan J. Hernández⁶, Elisabet Lerma^{1,2}, Ana Guelar^{1,2}, Luisa Sorli^{1,2}, Juan P. Horcajada^{1,2,3}, Alejandro Artacho⁴, Giuseppe D'Auria^{4,5}, Hernando Knobel^{1,2,3}

1 Department of Infectious Diseases, Hospital del Mar, Barcelona, Spain, **2** IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute, Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mediques), Barcelona, Spain, **3** Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain, **4** Joint Unit of Research in Genomics and Health, Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research in the Valencian Community (FISABIO) and Cavanilles Institute of Biodiversity and Evolutionary Biology (Universitat de València), València, Spain, **5** CIBER en Epidemiología y Salud Pública, Madrid, Spain, **6** Reference Laboratory of Catalonia, Barcelona, Spain

* jvillar@hospitaldelmar.cat



OPEN ACCESS

Citation: Villar-García J, Güerri-Fernández R, Moya A, González A, Hernández JJ, Lerma E, et al. (2017) Impact of probiotic *Saccharomyces boulardii* on the gut microbiome composition in HIV-treated patients: A double-blind, randomised, placebo-controlled trial. PLoS ONE 12(4): e0173802. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173802>

Editor: Alan Landay, Rush University, UNITED STATES

Received: November 9, 2016

Accepted: February 22, 2017

Published: April 7, 2017

Copyright: © 2017 Villar-García et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work is supported by a Spanish Health Ministry "Grant for independent clinical research 2012" (EC-11-541) to Judit Villar, the principal investigator, www.msssi.gob.es. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Dysbalance in gut microbiota has been linked to increased microbial translocation, leading to chronic inflammation in HIV-patients, even under effective HAART. Moreover, microbial translocation is associated with insufficient reconstitution of CD4+T cells, and contributes to the pathogenesis of immunologic non-response. In a double-blind, randomised, placebo-controlled trial, we recently showed that, compared to placebo, 12 weeks treatment with probiotic *Saccharomyces boulardii* significantly reduced plasma levels of bacterial translocation (*Lipopolysaccharide-binding protein* or LBP) and systemic inflammation (IL-6) in 44 HIV virologically suppressed patients, half of whom (n = 22) had immunologic non-response to antiretroviral therapy (<270 CD4+Tcells/ μ L despite long-term suppressed viral load). The aim of the present study was to investigate if this beneficial effect of the probiotic *Saccharomyces boulardii* is due to modified gut microbiome composition, with a decrease of some species associated with higher systemic levels of microbial translocation and inflammation. In this study, we used 16S rDNA gene amplification and parallel sequencing to analyze the probiotic impact on the composition of the gut microbiome (faecal samples) in these 44 patients randomized to receive oral supplementation with probiotic or placebo for 12 weeks. Compared to the placebo group, in individuals treated with probiotic we observed lower concentrations of some gut species, such as those of the *Clostridiaceae* family, which were correlated with systemic levels of bacterial translocation and inflammation markers. In a sub-study of these patients, we observed significantly higher parameters of microbial translocation (LBP, soluble CD14) and systemic inflammation in immunologic non-responders than in immunologic responders, which was correlated with a relative abundance of specific gut bacterial groups (*Lachnospiraceae* genus and Proteobacteria). Thus, in this work, we propose a new therapeutic strategy using the probiotic yeast *S. boulardii* to modify gut

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

microbiome composition. Identifying pro-inflammatory species in the gut microbiome could also be a useful new marker of poor immune response and a new therapeutic target.

Introduction

Recent studies have shown that gut microbiota is impaired in HIV-patients, even after effective Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART), and a large number of disease-associated bacteria have been identified. HIV-infection severely damages the gastrointestinal mucosal barrier resulting in microbial translocation [1–2], which in turn leads to continuous systemic inflammation and disease progression despite effective HAART [3–6]. Using high-resolution profiling of the bacterial community by 16S rDNA gene amplification and pyrosequencing, previous studies have identified a dysbiotic gut pattern in HIV-infected individuals, characterized by increased microbial translocation, chronic inflammation and hyperactivation of CD4+T cells, despite achieving long-term virologic suppression [7–11]. Moreover, microbial translocation is associated with insufficient reconstitution of CD4+T cells, and contributes to the pathogenesis of immunologic non-response [12–16]. A recent study have reported that HIV gut microbiome must be controlled for HIV risk factors, and after stratifying for sexual orientation, there was no solid evidence of an HIV-specific dysbiosis, but HIV-1 infection remained consistently associated with reduced bacterial richness and the lowest gut bacterial richness was observed in immunologic non-responders patients [17].

Recently the intestinal microbiome has been proposed as a novel therapeutic target for reducing chronic inflammation [18–19] and various interventions such as pre-probiotics have been proposed to improve the resident gut microbiome [20–22]. Since the specific effects of HIV infection on the particular gut bacterial taxa that contributes to chronic immunoactivation are unclear, it seems reasonable to propose treatments to improve the gut bacterial richness and HIV associated immune dysfunction. However, the beneficial effects of probiotics are strain-dependent and not all interventions are equally effective [23–25]. *Saccharomyces boulardii* is a probiotic whose clinical efficacy, anti-inflammatory and immunomodulatory effects are supported by extensive previous studies [26–30]. We recently demonstrated that treatment with *S. boulardii* significantly decreased plasma levels of microbial translocation (*Lipopolysaccharide-binding protein* or LBP) and inflammation parameters such as cytokine IL-6 in 44 HIV-treated patients, half of whom had an immunodiscordant response to antiretroviral therapy [31]. The aim of the present study was to investigate if this beneficial effect of the probiotic *Saccharomyces boulardii* is due to a modification in the gut microbiome composition of this patients, with a decrease in some species associated with higher systemic levels of microbial translocation and inflammation. In this study, we used 16S rDNA tagging to analyze the gut microbiome communities in these 44 patients, to assess the impact of probiotic treatment with *S. boulardii* compared to placebo.

In a sub-study of these patients, we explore if the immunological non-response was associated with higher systemic inflammation and microbial translocation parameters and a distinct gut microbiome pattern.

Subjects, material and methods

Study design

We performed a double-blind randomized, placebo-controlled trial to analyze the composition of the gut microbiota, microbial translocation, and inflammation parameters in 44 chronic

HIV-infected patients with undetectable plasma viral load (<20 copies/mL) for at least 2 years and a stable HAART regimen. Half of the patients (n = 22) had already been previously selected as being immunodiscordant or immunological non-responders (INR), defined as individuals with an persistent unfavorable immunologic response (<270 CD4+Tcells/ μ L despite long-term suppressed viral load), while the other 22 had already been previously selected as immunologic responders (IR: CD4+T count >400 cells/ μ L). Once the patients had been included in the IR or INR group, they were double-blind randomized to oral supplementation with probiotic *S. boulardii* (capsules with 56.5 mg living yeasts, 2 capsules 3 times per day, n = 22), or placebo (2 capsules 3 times per day, n = 22) for 12 weeks. All 44 participants completed the study; none discontinued their participation because of side effects of the treatments or adverse events. (Fig 1. CONSORT Flow diagram). Markers of microbial translocation and inflammation, immunological and clinical data were collected before and after the intervention (Baseline and week 12), and follow-up visits were conducted until 48 weeks (See “S1 and S2 Protocols” Files). We recently reported the plasma findings in these patients [31]. All patients also provided 50gr of stool samples before and after the intervention, which were stored at -80°C within the first 24–48 hours; to allow us to compare gut microbiome composition before and after a 12-week treatment with probiotic or placebo. A computer-generated randomization list was used. Randomization was performed by a hospital pharmacist unrelated to the care of the patients, using sequentially numbered containers. The participants and the care providers were blinded after assignment to interventions.

The study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of Hospital del Mar Medical Research Institute, number 2011/4508, on data 01/Feb/2012, according to the principles of the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all participants before enrollment in the study. Patients were recruited between August 2012–July 2013. The study was registered during the enrollment because it had already been previously notified, registered and approved by the Hospital del Mar Medical Research Institute Ethics Committee. The authors confirm that related trial for this intervention is registered at ClinicalTrials.gov (PROB-VIH, Trial number: NCT01908049). “S1 Checklist”

Microbial translocation markers

Serum levels of soluble CD14 were quantified using a ELISA kit (Quantikine™, R&D Systems, Minneapolis, MN) on a Quanta-Lyser™ 160 robotic workstation (Inova Diagnostics, San Diego, CA). Serum LBP was measured using the Immulite™ chemiluminescent immunometric assay on its automated analyzer (Immulin One, Siemens Healthcare[®], Llanberis, UK).

Inflammation markers

Milliplex MAP™ was used to analyze IL-6. Hs-CRP and β 2 microglobulin were measured using the Immulin One™, and plasma fibrinogen with HemosIL™ reagents.

Microbiome taxonomy analyses & bioinformatics

DNA was extracted from frozen stool samples and amplified by PCR targeting 16S gene regions using primers described elsewhere [32]. We performed library preparation followed by Illumina sequencing according to standard protocols described previously [33]. The taxonomic composition of the intestinal microbiota was characterized by grouping sequences into OTUs (Organizational Taxonomic Units). We used the QIIME open source algorithm for handling and interpretation of the data from the raw sequences; following quality assessment of sequence data, we assigned taxonomic affiliations using the RDP_classifier from the Ribosomal Database Project [34].


CONSORT
 TRANSPARENT REPORTING of TRIALS

CONSORT 2010 Flow Diagram

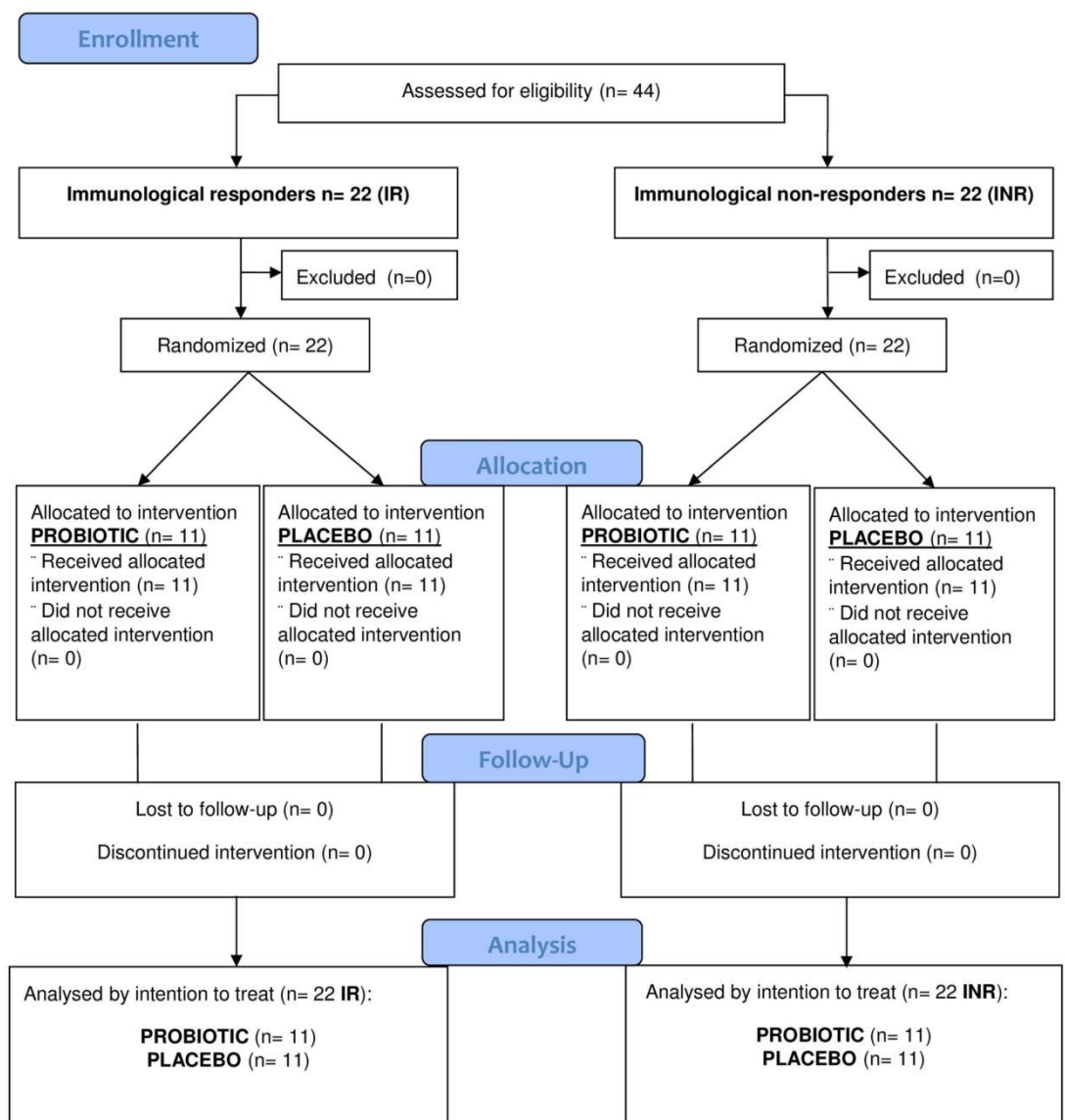


Fig 1. CONSORT flow diagram.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173802.g001>

Statistical analysis

No previous data were available to estimate the sample size; thus, for a Type I error rate of 0.05 and a 1-beta risk of 0.20 in a bilateral contrast, we computed that 22 patients were needed per study group to detect statistically significant differences between proportions. The assumed proportions for the power analysis for each group was 0.5. Continuous variables were expressed as the median and interquartile range, and discrete variables as percentages. Categorical variables were described as proportions. The Mann-Whitney U-test was used to compare medians, ANOVA to assess differences in continuous variables, and the Pearson's χ^2 test to evaluate the association between categorical variables. We also conducted multivariate logistic regression analysis to study the correlation between microbial translocation and systemic inflammation parameters, and conditional backward stepwise regression analysis at baseline to identify parameters that were correlated with the immunodiscordance. The enter criteria was a p value < 0.1. All the variables studied were selected based on the statistical significance. For the analysis of qualitative differences between responders and non-responders, we performed a median recoding of LBP, soluble CD4, β_2 microglobuline and fibrinogen; the values obtained were defined as high or low. Statistical analyses were performed using SPSS software version 20.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL) and several open source libraries in R (R Core Team 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>). The glm (R) function has been used in the logistic regression analysis.

Results

Patient characteristics

This study included 44 patients. Half of each group were immunological non-responders (INR), the median age was 47.5 years, 84% were male, and the risk factors for acquiring HIV infection were Heterosexual (HTX) (46%), Men who Have Sex with Men (MHSM) (38%) and Injection drug users (IDU) (16%). The profiles of demographic, biological and clinical parameters were similar in the probiotic and placebo groups [31] (“S1 Table”). All patients had suppressed viral load for a median of 4.7 years, with NNRTI-based (75%) or PI-based HAART (25%). The median nadir CD4+T was 108 cells/ μ l, and 41% had AIDS diagnosis.

Microbial translocation is correlated with systemic inflammation

We tested for association between microbial translocation measurements and baseline parameters from 44 patients, and observed a statistically significant correlation between LBP levels and plasma levels of soluble CD14 ($r = 0.48$, $p = 0.001$), Hs-CRP ($r = 0.63$, $p = 0.0001$), β_2 microglobulin ($r = 0.59$, $p = 0.0001$), Erythrocyte Sedimentation Rate-ESR ($r = 0.57$, $p = 0.0001$), Fibrinogen ($r = 0.64$, $p = 0.0001$), Cd4 nadir ($r = -0.53$, $p = 0.0001$), and IL-6 ($r = 0.58$, $p = 0.0001$). Using multivariate logistic regression analysis, we found that LBP was independently correlated with Hs-CRP, ESR and soluble CD14 (“S2 Table”).

Saccharomyces boulardii produces changes in some gut bacterial communities

Canonical correspondance analysis shows the high influence of probiotic effect versus the time effect (vertical axis) (Fig 2). Changes in gut microbiome after the interventions are showed at “S1 Fig” (INRs group). After 12 weeks of probiotic treatment, we observed a significant decrease in levels of some Clostridiales species with respect to baseline compared with placebo

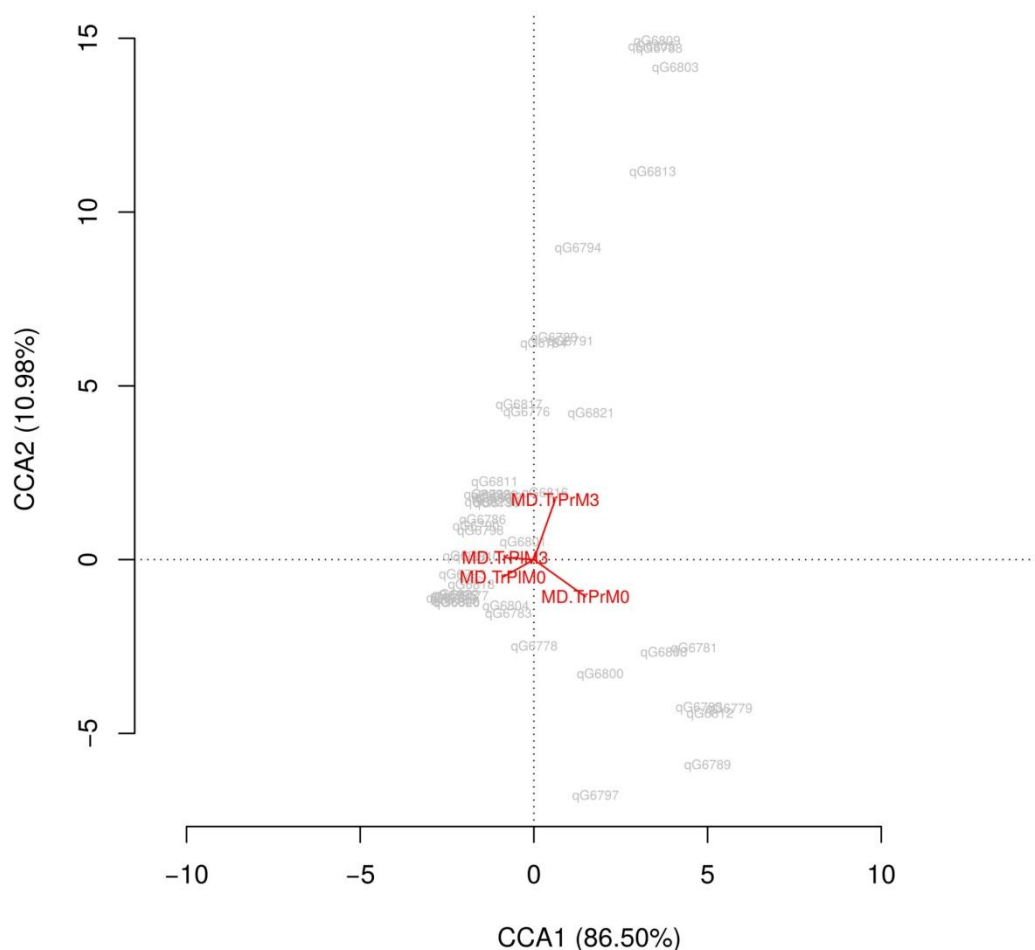


Fig 2. Canonical correspondence analysis.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173802.g002>

(Fig 3). We also observed a significant decreased in *Catenibacterium* communities (2.65 to 0.04, $p = 0.00003$), and an increase in levels of *Megamonas* ($p = 0.02$) and *Desulfovibrionales* (Proteobacteria) ($p = 0.05$). These probiotic effects on gut microbiota composition were similar in the INR and IR groups.

We then investigated the correlation between these different stool bacterial populations, parameters of microbial translocation and systemic inflammation, and observed a statistically significant correlation between the proportion of *Clostridia* genera and plasma concentrations of soluble CD14 ($r = 0.63$, $p = 0.03$), LBP ($r = 0.71$, $p = 0.009$), and IL-6 ($r = 0.69$, $p = 0.0008$; Fig 4). These correlations were present at baseline in INR group but not in the IRs probably because IRs have a lower relative abundance of *Clostridiaceae* at baseline. The correlations are not statistically significant in probiotic treated group, probably because of a decrease in these bacterial communities due to the probiotic effect (Fig 5).

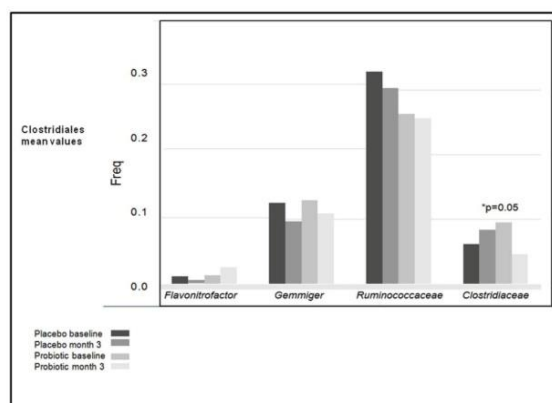


Fig 3. Changes in the proportion of Clostridiales after the interventions.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173802.g003>

Immunological non-response is associated with higher microbial translocation and the presence of some pro-inflammatory species

The baseline differences between the INR and IR groups are summarized in Table 1. Quantitative analysis of the baseline data indicates that the following variables showed statistically significant differences between the INR and IR group: age, current CD4+T count, CD4+T nadir, HCV coinfection, LBP and $\beta 2$ microglobulin levels. The INR groups tended to have higher fibrinogen and soluble CD14 levels. Compared to the IR group, the INR group had a greater proportion of individuals with values greater than the median of LBP (68.2% vs 27.3%, $p = 0.007$); soluble CD14 (72.7% vs 40.9%, $p = 0.03$); $\beta 2$ microglobuline (66.7% vs 33%, $p = 0.022$) and fibrinogen (65% vs 31.8%, $p = 0.03$).

High LBP was associated with being an INR (Relative Risk = 5.71; 95% CI = 1.56–20.93; $p = 0.015$) and in the conditional backward stepwise regression analysis, high LBP was the

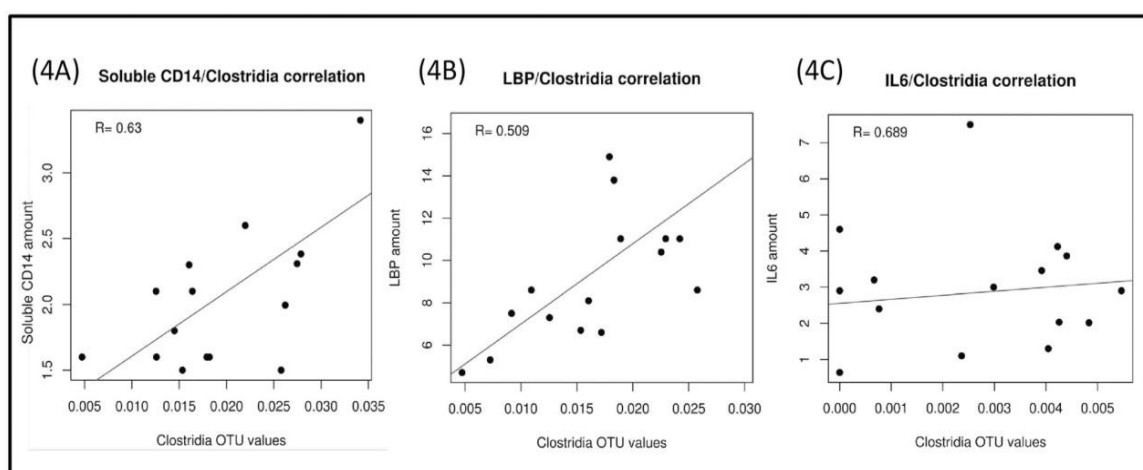


Fig 4. Correlations between relative abundance of Clostridiales and soluble CD14 (4A), LBP (4B) and IL6 (4C) before the intervention (INR). LBP, Lipopolisaccharide Binding-Proteine; IL6, interleukin-6.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173802.g004>

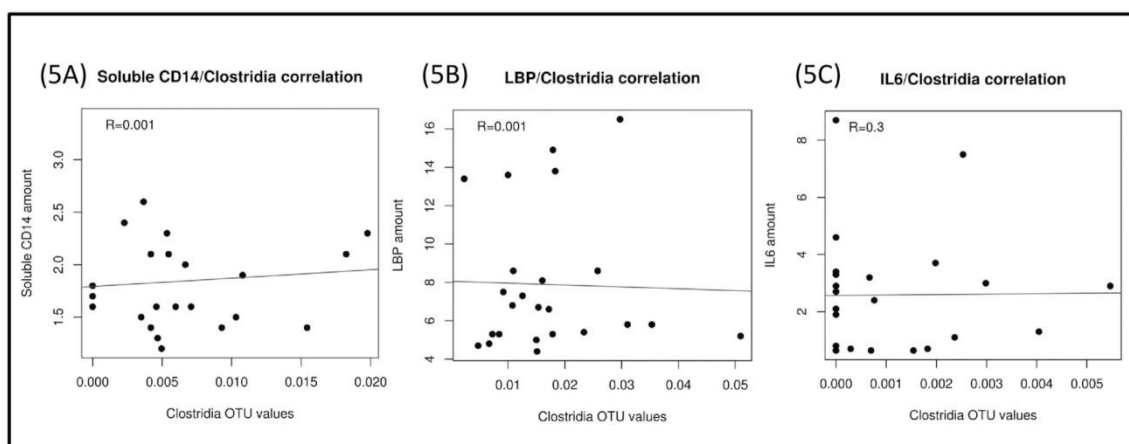


Fig 5. Correlations between relative abundance of Clostridiales and soluble CD14 (5A), LBP (5B) and IL6 (5C) after probiotic treatment. LBP, Lipopolisaccharide Binding-Proteine; IL6, interleukin-6.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173802.g005>

only variable that could explain immunological non-response ($OR = 6.22$, 95% $CI = 1.63$ – 23.75 , $p = 0.007$) (“S3 Table”).

Analyzing gut microbiome composition at baseline, we observed a higher proportion of some Firmicutes species (Clostridia) in the INR group than in the IR group. The proportion of Proteobacteria was higher in immunodiscordant patients; the proportion of *Lachnospiraceae* genera was significantly higher in the INR group ($OR = 3.4$, $p = 0.05$) (“S4 Table”).

Discussion

This is the first clinical trial to use 16S rDNA sequencing to analyze changes in gut microbiome composition following treatment with *Saccharomyces boulardii*, and how these changes are correlated with microbial translocation and inflammation in HIV patients.

Microbial imbalance in the gut has been associated with increased microbial translocation, leading to chronic inflammation. In line with this, various microbial communities resident in the gut are correlated with plasma bacterial translocation markers (soluble CD14 and LBP) and pro-inflammatory cytokine interleukin-6 [10–11,35]. We recently reported a significant reduction in LBP and IL-6 levels in a small cohort of HAART-treated HIV patients supplemented with 12 weeks treatment with probiotic *S. boulardii* compared to placebo [31]. Here, we take a step further and use 16S rDNA tagging and high throughput sequencing to analyze microbiome profiles before and after the intervention, and to evaluate whether some predominant species are associated with increased bacterial translocation, systemic inflammation and poor immune response in these patients.

Following probiotic treatment, we observed a significant decrease in some Clostridiales, such as *Clostridiaceae* and *Catenibacterium* communities. Previous studies have used PCR or FISH techniques, rather than 16S rDNA sequencing, to evaluate the effects of supplementation with specific prebiotics in HAART-naïve infected HIV adults [21] and supplementation with probiotic *S. boulardii* in HIV-negative adults with enteritis [36]; these studies reported a consequent reduction in concentrations of pathogenic clostridia-related species, which are considered to be pro-inflammatory mucotropic bacteria, although these authors did not evaluate if this was correlated with a decrease in systemic inflammation. Recent studies have reported a

Table 1. Differences between Immunological Responders (IR) and Non-Responders (INR).

	Responders (n = 22)	Non-Responders (n = 22)	p-value
Demographics			
Age (years) [SD]	44 (37–49)	52 (47–57)	0.014
Male [n (%)]	21 (95.5)	16 (72.7)	0.042
HIV infection			
Risk factor [n (%)]			
IDU	0 (0)	6 (100)	0.03
MHSM	12 (70.6)	5 (29.4)	0.06
HTX	10 (50)	10 (50)	1
Time with viral load <50 copies/ml (years) [median (IQR)]	4.5 (3–9.25)	5 (3.75–10)	0.463
Nadir CD4 cell count (/ml) [median (IQR)]	244 (105–293)	47.5 (9–113.75)	0.000
Zenith viral load (log10) [median (IQR)]	4.88 (4.58–5.38)	5.06 (4.39–5.41)	0.770
HCV co-infection [n (%)]	0 (0)	8 (100)	0.002
Current ART [n (%)]			
NNRTI	22 (68.8%)	10 (31.3%)	0.000
PI	0	11 (52.4%)	0.000
Absolute CD4T-count (cells/ μ l) [median (IQR)]	483 (413–630)	219 (169–266)	0.000
Absolute CD8T-count (cells/ μ l) [median (IQR)]	699.5(472.5–860.5)	594 (353–781)	0.199
Microbial translocation parameters [median (IQR)]			
LBP (pg/mL)	5.65 (5.2–6.5)	7.4 (6.1–8.7)	0.011
Soluble CD14 (μ g/mL)	1.43 (1.31–1.93)	1.69 (1.55–2.11)	0.082
Inflammation parameters [median (IQR)]			
Hs-CRP(mg/dl)	0.22 (0.07–0.35)	0.16 (0.07–0.40)	0.874
IL-6(pg/mL)	1.85 (0.7–2.85)	2.7 (1.02–40.15)	0.466
Ig E (kU/L)	48.9 (16.8–157)	115 (21.6–360)	0.467
Fibrinogen (mg/dl)	257.5 (219–279)	293.5(259.5–324)	0.062
TNF- α (pg/mL)	10.9 (8.7–12.3)	12.7 (7.8–16.9)	0.190
ESR (mm/h)	7 (2–10.5)	10 (6–16.5)	0.100
Vit D 25 OH (ng/mL)	30.97(20.07–0.33)	37.04 (24.6–42.48)	0.253
β 2microglobuline (μ g/mL)	1.7 (1.54–2.06)	2.12 (1.93–2.86)	0.002
Gut microbiome composition (Relative abundance [%])			
<i>Lachnospiraceae</i> (Clostridia)	0.017%	0.093%	0.03
Proteobacteria	0.053%	0.248%	0.06

ART, antiretroviral therapy; PI, protease inhibitor; NNRTI, non-nucleoside; reverse transcriptase inhibitor; LBP, Lipopolysaccharide-binding protein; sCD14, soluble CD14; hs-CRP, high sensitivity C-reactive protein; IL-6, Interleukin 6; ESR, Erythrocyte Sedimentation Rate; IQR, interquartile range.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173802.t001>

higher proportion of *Catenibacterium* in HIV patients than in healthy individuals [9,11]. *Catenibacterium* is a Gram-positive, non-spore-forming and anaerobic genus from the family of Erysipelotrichidae. Taxa in this family were the most enriched [7], or a significant enrichment was reported [8–9], in the untreated HIV-infected subjects compared to HIV-uninfected individuals and was correlated with markers of microbial translocation and systemic inflammation in HIV patients [8]. In our study, the concentration of *Catenibacterium*, which have also been associated with other chronic diseases [37–39], also decreased following probiotic treatment.

We observed a relationship between bacterial translocation and various parameters of systemic inflammation. These data are consistent with previous studies demonstrating, in both treated and untreated HIV patients, a direct correlation between systemic parameters of

bacterial translocation, and chronic immune activation and disease progression [40–48]. Furthermore, we found significant correlation between some bacterial taxa (Clostridia) and parameters of microbial translocation and systemic inflammation in immunological non-responders group (INR). Recent studies also have demonstrated a statistically significant correlation between some species of Clostridia, including *Lachnospiraceae*, and increased systemic immune activation parameters (TNF) in HIV-infected patients [11]. While the immunologic driving factors of gut dysbiosis related to HIV infection are likely to be complex interestingly, our study showed a significant reduction in these bacterial communities following probiotic treatment.

HIV-patients with deficient CD4+Tcell count recovery despite HAART have been defined as Immunological non-responders (INRs), and are estimated to account for up to 30% of all treated HIV-infected subjects. This is relevant because this subpopulation is associated with higher morbi-mortality. This phenomenon has been widely studied using different approaches, and its pathogenesis is known to be related to older age, nadir CD4 T-cell count, reduced thymic function, co-infection with hepatotropic viruses, and multiple genetic variants [12,13]. However, the ultimate cause of the discordant response is excessive CD4 T-cell destruction due to CD4+T hyperactivation [14], residual viral replication, and persistent antigenic stimulation due to microbial translocation. HAART-treated individuals have been reported to show an inverse correlation between levels of microbial translocation and sustained failure on CD4+T cell reconstitution [15,16]. A history of more advanced immunosuppression and the resulting damage to gut immunity and integrity are thought to be an important factor in the differences observed between groups in gut microbiome and markers of bacterial translocation and inflammation [49–51]. Our results are consistent with these findings, and extend them by comparing the composition of the gut microbial community in immunological responders and non-responders. Interestingly, the relative abundance of specific gut bacterial groups in INR patients is associated with greater bacterial translocation. Recent studies have shown that Proteobacteria, which are over-represented in our group of INRs, are responsible for much of the translocation after SIV-infection [52]; although the mechanisms remain unknown, Brenchley *et al.* [53] suggested their motility, high metabolic rate and possession of immune evasion genes as possible reasons. Identifying gut species that contribute to the pathogenesis of immunologic non-response and persistent immune activation could be a new diagnostic and therapeutic tool in this group of HIV-patients with an increased risk of clinical progression and death.

The multiple anti-inflammatory mechanisms produced by *S. boulardii* provide molecular explanations to support its effectiveness in intestinal inflammatory states [30]. It has also been demonstrated that *S. boulardii* increases absolute numbers of the main habitual fermenting bacterial groups, and decreases concentrations of mucotropic occasional bacterial communities [54]. Several mechanisms of action have been identified directed against the host and pathogenic microorganisms, suppressing “bacteria overgrowth” and host cell adherence [30]. One limitation of this study is that, since *S. boulardii* is a yeast, we did not perform 16S rDNA gene amplification and parallel sequencing to demonstrate colonization by the probiotic, or changes in the gut mycobiome. A decrease in some dysbiotic bacterial genera, replacement of inflammatory yeast and/or improved functional biostructure of colonic microbiota following *S. boulardii* treatment may prevent microbial translocation [54], although our study was not designed to determine the mechanism through which changes in gut microbiome composition alter its functional anatomy, metabolomics or mycobiome. Our study has some of the limitations of other studies in this topic. All are small works, and more extensive studies with better tools than 16s sequencing are needed before drawing definitive conclusions, including selection of the patients who could best respond to the probiotic treatment, as well as the doses and

duration of the therapy. However, given the increasingly widespread use of metabolomic and metagenomic techniques, analysis of gut bacterial contents could be used in the future as a marker of a dysbiotic microbiome that contributes to chronic systemic inflammation and HIV progression. More importantly, the gut microbiome can be modified using certain strains of probiotics to generate a less pro-inflammatory profile; this new therapeutic target is worthy of further exploration.

Conclusions

We observed a change in gut microbiome composition following probiotic treatment (*S. boulardii*), with a decrease in some species which are directly correlated with systemic levels of microbial translocation and inflammation. The use of specific probiotics could be a new therapeutic strategy for HIV patients. In addition, our data suggest that identifying pro-inflammatory species in the gut microbiome could be a new marker of poor immune response.

Supporting information

S1 Protocol.

(DOC)

S2 Protocol.

(DOC)

S1 Checklist.

(DOC)

S1 Fig. Changes in gut microbiome after the interventions (INRs group). INR, immunologic non-responders.

(TIF)

S1 Table. Baseline characteristics of the patients. ART, antiretroviral therapy; PI, protease inhibitor; NNRTI, nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor; LBP, Lipopolisaccharide Binding-Proteine; sCD14, soluble CD14; hs-CRP, high sensitivity C-reactive protein; ESR, Erythrocyte Sedimentation Rate; IQR, interquartile range.

(DOCX)

S2 Table. LBP Multivariate logistic regression analysis. LBP, Lipopolisaccharide Binding-Proteine; sCD14, soluble CD14, hs-CRP, high sensitivity C-reactive protein.

(DOCX)

S3 Table. Backward stepwise logistic regression analysis. LBP_{basal}, Lipopolisaccharide Binding-Proteine at baseline; sCD14, soluble CD14; β 2microglob, Beta 2 microglobuline.

(DOCX)

S4 Table. INR logistic regression results.

(CSV)

Author Contributions

Conceptualization: JV.

Data curation: JV RG HK A González EL A Guelar LS.

Formal analysis: HK AA GD AM.

Funding acquisition: JV HK.

Investigation: JV GD.

Methodology: JV JJH AA GD.

Project administration: JV HK.

Resources: JV JPH A González GD.

Software: AA GD AM.

Supervision: JV HK AM GD.

Validation: JJH AA GD AM HK.

Visualization: JV RG HK GD.

Writing – original draft: JV.

Writing – review & editing: JV RG HK GD AM AA.

References

1. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Douek DC, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 2006; 12(12): 1365–1371. <https://doi.org/10.1038/nm1511> PMID: 17115046
2. Nazli A, Chan O, Dobson-Belaire WN, Gray-Owen SD, Arsenault AL, Kaushic C, et al. Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation. *PLoS Pathogens* 2010; 6(4):e1000852. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000852> PMID: 20386714
3. Nowroozizadeh S, Månsson F, da Silva Z, Norrgren H, Holmgren B, Jansson M, et al. Microbial translocation correlates with the severity of both HIV-1 and HIV-2 infections. *J Infect Dis*. 2010; 201(8):1150–4. PMID: 20199244
4. Wallet MA, Rodriguez CA, Yin L, Saporta S, Chinratanapisit S, Hou W, et al. Microbial translocation induces persistent macrophage activation unrelated to HIV-1 levels or T-cell activation following therapy. *AIDS* 2010; 24(9):1281–90.
5. Tincati C, Biasin M, Bandera A, Violin M, Marchetti G, Gori A, et al. Early initiation of highly active antiretroviral therapy fails to reverse immunovirological abnormalities in gut-associated lymphoid tissue induced by acute HIV infection. *Antivir Ther*. 2009; 14(3):321–330. PMID: 19474466
6. Cassol E, Malfeld S, Mahasha P, Alfano M, Poli G, Rossouw T, et al. Persistent microbial translocation and immune activation in HIV-1-infected South Africans receiving combination antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2010; 202(5):723–33. <https://doi.org/10.1086/655229> PMID: 20629534
7. Vujkovic-Cvijin I, Dunham RM, Iwai S, Hunt PW, Lynch SV, McCune JM, et al. Dysbiosis of the gut microbiota is associated with HIV disease progression and tryptophan catabolism. *Science Translational Medicine* 2013; 5(193):193ra91. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006438> PMID: 23843452
8. Dinh DM, Volpe GE, Duffalo C, Tai AK, Kane AV, Ward HD, et al. Intestinal microbiota, microbial translocation, and systemic inflammation in chronic HIV infection. *J Infect Dis*. 2015; 211(1):19–27. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu409> PMID: 25057045
9. Lozupone CA, Rhodes ME, Neff CP, Fontenot AP, Campbell TB, and Palmer BE. HIV-induced alteration in gut microbiota: driving factors, consequences, and effects of antiretroviral therapy. *Gut Microbes* 2014; 5(4):562–570. <https://doi.org/10.4161/gmic.32132> PMID: 25078714
10. Ellis CL, Ma ZM, Mann SK, Miller CJ, Pollard RB, Asmuth DM, 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(5):363–370. PMID: 21436711
11. Mutlu EA, Keshavarzian A, Losurdo J, Gorenz A, Burns C, Landay A, et al. A compositional look at the human gastrointestinal microbiome and immune activation parameters in HIV infected subjects. *PLoS-Pathogens* 2014; 10(2):IDe1003829.
12. Benveniste O, Flahault A, Sterkers G, Simon A, Ameisen JC, Lepout C, et al. Mechanisms involved in the low-level regeneration of CD4+ cells in HIV-1-infected patients receiving highly active antiretroviral

- therapy who have prolonged undetectable plasma viral loads. *J Infect Dis*. 2005; 191 (10):1670–1679. <https://doi.org/10.1086/429670> PMID: 15838794
13. Gazzola L, Tincati C, Bellistri GM, Monforte A, Marchetti G. The absence of CD4R T cell count recovery despite receipt of virologically suppressive highly active antiretroviral therapy: clinical risk, immunological gaps, and therapeutic options. *Clin Infect Dis* 2009; 48(3):328–337. PMID: 19123868
 14. Massanella M, Negro E, Perez-Alvarez N, Puig J, Ruiz-Hernandez R, Bofill M, et al. CD4 T-cell hyperactivation and susceptibility to cell death determine poor CD4 T-cell recovery during suppressive HAART. *AIDS* 2010; 24(7):959–68. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328337b957> PMID: 20177358
 15. Marchetti G, Bellistri GM, Borghi E, Tincati C, Ferramosca S, La Francesca M, et al. Microbial translocation is associated with sustained failure in CD4+ T-cell reconstitution in HIV-infected patients on long-term highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2010; 22(15):2035–8.
 16. Merlini E, Bai F, Bellistri GM, Tincati C, d'Arminio Monforte A, Marchetti G. Evidence for polymicrobial flora translocating in peripheral blood of HIV-infected patients with poor immune response to antiretroviral therapy. *PLoS One* 2011; 6(4):e18580. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018580> PMID: 21494598
 17. Noguera-Julian M, Rocafort M, Guillén Y, Rivera J, Casadellà M, Nowak P, et al. Gut Microbiota Linked to Sexual Preference and HIV Infection. *EBioMedicine*. 2016 Jan 28; 5:135–46. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.01.032> PMID: 27077120
 18. Rajasurir R, Khoury G, Kamarulzaman A, French MA, Cameron PU, Lewin SR. Persistent immune activation in chronic HIV infection: do any interventions work? *AIDS* 2013; 27 (8):1199–208. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32835ecb8b> PMID: 23324661
 19. Assimakopoulos SF, Dimitropoulou D, Marangos M and Gogos CA. Intestinal barrier dysfunction in HIV infection: pathophysiology, clinical implications and potential therapies. *Infection* 2014; 42(6):951–9. <https://doi.org/10.1007/s15010-014-0666-5> PMID: 25070877
 20. Hummelen R, Chantalucha J, Butamanya NL, Cook A, Habbema JD, Reid G, et al. Effect of 25 weeks probiotic supplementation on immune function of HIV patients. *Gut Microbes* 2011; 2(2):80–85. PMID: 21637031
 21. Gori A, Rizzardini G, Van't Land B, Welling G, Garssen J, Clerici M, et al. Specific prebiotics modulate gut microbiota and immune activation in HAART-naïve HIV-infected adults: results of the "COPA" pilot randomized trial. *NATURE* 2011; 4(5): 554–63.
 22. Klatt NR, Canary LA, Sun X, Haddad EK, Estes JD, Brenchley JM, et al. Probiotic/prebiotic supplementation of antiretrovirals improves gastrointestinal immunity in SIV-infected macaques. *The Journal of Clinical Investigation* 2013; 123(2):903–907. <https://doi.org/10.1172/JCI66227> PMID: 23321668
 23. Cunningham-Rundles S, Ahrné S, Johann-Liang R, Grasse C, Bengmark S, Cervia JS, et al. Effect of probiotic bacteria on microbial host defense, growth and immune function in human immunodeficiency virus type-1 infection. *Nutrients* 2011; 3(12):1042–1070. <https://doi.org/10.3390/nu3121042> PMID: 22292110
 24. Sandler NG, Zhang X, Bosch RJ, Deeks SG, Lederman MM, Gandhi RT et al. AIDS Clinical Trials Group A5296 Team. Sevelamer does not decrease lipopolysaccharide or soluble CD14 levels but decreases soluble tissue factor, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, and oxidized LDL cholesterol levels in individuals with untreated HIV infection. *The Journal of Infectious Diseases* 2014; 210 (10):1549–1554. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu305> PMID: 24864123
 25. Stiksrud B, Nowak P, Nwosu FC, Hov JR, Dyrhol-Riise AM, Trøseid M, et al. Reduced Levels of D-dimer and Changes in Gut Microbiota Composition After Probiotic Intervention in HIV-Infected Individuals on Stable ART. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2015; 70 (4): 329–37. <https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000000784> PMID: 26258571
 26. Thomas S, Przeszdzing I, Metzke D, Schmitz J, Radbruch A, Baumgart DC, et al. *Saccharomyces boulardii* inhibits lipopolysaccharide-induced activation of human dendritic cells and T cell proliferation. *Clin Exp Immunol*. 2009; 156 (1):78–87. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.03878.x> PMID: 19161443
 27. Im E, Pothoulakis C. Recent advances in *Saccharomyces boulardii* research. *Gastroenterol Clin Biol*. 2010; 34 Suppl 1:S62–S70.
 28. McFarland LV. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World J Gastroenterol*. 2010; 16(18):2202–22. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i18.2202> PMID: 20458757
 29. Canonici A, Pellegrino E, Siret C, Terziolo C, Czerucka D, Bastonero S, et al. *Saccharomyces boulardii* Improves Intestinal Epithelial Cell Restitution by Inhibiting α v β 5 Integrin Activation State. *PLoS ONE* 2012; 7(9):p. e45047. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045047> PMID: 23028753

30. Pothoulakis C. Review article: anti-inflammatory mechanisms of action of *Saccharomyces boulardii*. *Alliment Pharmacol Ther.* 2009; 30(8):26–833.
31. Villar-García J, Hernández JJ, Güerri-Fernández R, González A, Lerma E, Knobel H, et al. Effect of probiotics (*Saccharomyces boulardii*) on microbial translocation and inflammation in HIV-treated patients: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2015; 68(3):256–63. <https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000000468> PMID: 25469528
32. Klindworth A, Priesse E, Schweer T, Peplies J, Horn M, Glöckner FO, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41(1):e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808> PMID: 22933715
33. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Gilbert JA, Smith G, Knight R, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.* 2012; 6(8):1621–4. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8> PMID: 22402401
34. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, and Cole JR. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73(16):5261–5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07> PMID: 17586664
35. Perez-Santiago J, Gianella S, Massanella M, Little SJ, Richman DD, Smith DM, et al. Gut Lactobacillales are associated with higher CD4 and less microbial translocation during HIV infection. *AIDS* 2013; (27)12:1921–1931. PMID: 24180001
36. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Kirsch S and Doerffel Y. Functional biostructure of colonic microbiota (central fermenting area, germinal stock area and separating mucus layer) in healthy subjects and patients with diarrhea treated with *Saccharomyces boulardii*. *Gastroenterol Clin Biol.* 2010; 34 Suppl 1: S79–92.
37. Vaziri ND, Wong J, Pahl M, Piceno YM, Yuan J, DeSantis TZ, et al. Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora. *Kidney Int.* 2013 Feb; 83(2):308–15. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.345> PMID: 22992469
38. Ciubotaru I, Green SJ, Kukreja S, Barengolts E. Significant differences in fecal microbiota are associated with various stages of glucose tolerance in African American male veterans. *Transl Res.* 2015 Nov; 166(5):401–11. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2015.06.015> PMID: 26209747
39. Moreno-Indias I, Sánchez-Alcoholado L, García-Fuentes E, Cardona F, Queipo-Ortuño MI, Tinahones FJ. Insulin resistance is associated with specific gut microbiota in appendix samples from morbidly obese patients. *Am J Transl Res.* 2016 Dec 15; 8(12):5672–5684. PMID: 28078038
40. Ancuta P, Kamat A, Kunstman KJ, Kim EY, Autissier P, Wurcel A, et al. Microbial translocation is associated with increased monocyte activation and dementia in AIDS patients. *PLoS One* 2008; 3:e2516. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002516> PMID: 18575590
41. Marchetti G, Cozzi-Lepri A, Merlini E, Bellistri GM, Castagna A, Galli M, et al. Microbial translocation predicts disease progression of HIV-infected antiretroviral-naïve patients with high CD4+ cell count. *AIDS* 2011; 25(11):1385–94. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3283471d10> PMID: 21505312
42. Troseid M, Nowak P, Nyström J, Lindkvist A, Abdurahman S and Sönerborg A, et al. Elevated plasma levels of lipopolysaccharide and high mobility group box-1 protein are associated with high viral load in HIV-1 infection: reduction by 2-year antiretroviral therapy. *AIDS* 2010; 24 (11):1733–1737. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32833b254d> PMID: 20502315
43. Sandler NG, Wand H, Roque A, Law M, Nason MC, Emery S, et al. Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV Infection. *J Infect Dis.* 2011; 203 (6):780–790. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq118> PMID: 21252259
44. Dillon SM, Lee EJ, Kotter CV, Robertson CE, Frank DN, Wilson CC, et al. An altered intestinal mucosal microbiome in HIV-1 infection is associated with mucosal and systemic immune activation and endotoxemia. *Mucosal Immunol.* 2014; 7(4):983–94. <https://doi.org/10.1038/mi.2013.116> PMID: 24399150
45. Marksa MA, Rabkin CS, Engels EA, Rager H, Goedert JJ, Chaturvedi AK, et al. Markers of microbial translocation and risk of AIDS-related lymphoma. *AIDS* 2013; 27(3):469–474. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32835c1333> PMID: 23169327
46. Kelesidis T, Kendall MA, Yang OO, Hodis HN, Currier JS. Biomarkers of microbial translocation and macrophage activation: association with progression of subclinical atherosclerosis in HIV-1 infection. *J Infect Dis.* 2012; 206 (10):1558–1567. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis545> PMID: 23066162
47. Blodget E, Shen C, Aldrovandi G, Gupta SK, Stein JH, Dubé MP, et al. Relationship between Microbial Translocation and Endothelial Function in HIV Infected Patients. *PLoS ONE* 2012; 7(8): e42624.
48. Vázquez-Castellanos JF, Serrano-Villar S, Latorre A, Artacho A, Gosalbes MJ, Moya A, et al. Altered metabolism of gut microbiota contributes to chronic immune activation in HIV-infected individuals. *Mucosal Immunol.* 2015; 8(4):760–72. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.107> PMID: 25407519

49. Jiang W, Lederman MM, Hunt P, Deeks SG, Douek DC, Brenchley JM, 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; 199 (8): 1177–1185. <https://doi.org/10.1086/597476> PMID: 19265479
50. Piconi S, Trabattoni D, Gori A, Parisotto S, Capetti A, Rizzardini G, Clerici M, et al. Immune activation, apoptosis, and Treg activity are associated with persistently reduced CD4+ T-cell counts during antiretroviral therapy. *AIDS* 2010; 24 (13):1991–2000. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32833c93ce> PMID: 20651586
51. Klatt NR, Funderburg NT and Brenchley JM. Microbial translocation, immune activation and HIV disease. *Trends Microbiol.* 2013; 21(1): 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.09.001> PMID: 23062765
52. Klase Z, Ortiz A, Deleage C, Mudd JC, Quiñones M, Schwartzman E, et al. Dysbiotic bacteria translocate in progressive SIV infection. *Mucosal Immunol.* Sep 2015; 8(5):1009–1020. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.128> PMID: 25586559
53. Williams B, Mirmonsef P, Boucher CA, Bushman F, Carrington-Lawrence S, Collman RG et al. A Summary of The First HIV Microbiome Workshop 2015. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2016 Oct/Nov; 32 (10–11):935–941. <https://doi.org/10.1089/AID.2016.0034> PMID: 27267576
54. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Schulz S, Manowsky J, Verstraelen H, Swidsinski S, et al. Functional anatomy of the colonic bioreactor: Impact of antibiotics and *Saccharomyces boulardii* on bacterial composition in human fecal cylinders. *Syst Appl Microbiol.* 2016 Feb; 39(1):67–75 <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.11.002> PMID: 26723852

INFORMACIÓN DE SOPORTE DEL SEGUNDO ARTÍCULO**Tabla S1.** Características basales de los pacientes de los grupos probiótico y placebo

	Probiótico	Placebo	P
N	22	22	1
Demográficas			
Edad (años) [SD]	49.45 (7.75)	45.5 (7.75)	0.16
Hombres [n (%)]	20 (90.9)	17 (77.3)	0.41
Grupo étnico [n (%)]			
Caucásicos	17 (77.3)	17 (77.3)	1
Infección VIH			
Factor de riesgo [n (%)]			
ADVP	3 (13.6)	4 (18.2)	0.80
HMX	9 (40.9)	8 (36.4)	0.80
HTX	10 (45.5)	10 (45.5)	1
Tiempo desde el diagnóstico del VIH (años) [mediana (IQR)]	15 (6-21)	10 (6-20)	0.39
Tiempo con carga viral <50 copias/m (años) [mediana (IQR)]	5.5 (5-10)	4 (3-9)	0.06
Nadir CD4 T (cél/ml) [mediana (IQR)]	90 (49-243)	126 (33-268)	0.93
Diagnóstico de SIDA [n (%)]	10 (45.5)	8 (36.4)	0.54
VIH RNA (% < 50 copias/ml) [mediana (IQR)]	100	100	1
Inmunodiscordantes [n (%)]	11 (50%)	11 (50%)	1
Carga viral <i>Zenith</i> (log10) [mediana(IQR)]	4.93 (4-5.43)	4.91 (4.67- 5.31)	0.76
VHC co-infección [n (%)]	5 (22.7)	3 (13.6)	0.70
TAR actual [n (%)]			
NNRTI	17 (77.3)	16 (72.7)	1
IP	5 (22.7)	6 (27.3)	1
Recuento absoluto de CD4 T (cel/μl) [mediana (IQR)]	328 (220-457)	328 (207-503)	0.82
Recuento de CD4 T (% linfocitos) [mediana(IQR)]	24.1 (19.2-30.4)	24.6 (16.2-32.2)	0.92
Recuento absoluto de CD8 T (cel/ μl)	697 (538-833)	481.5 (350-791)	0.17
Recuento de CD8 T (% linfocitos)	45.8 (41.4-53.45)	37.9 (32-55.4)	0.17
Parámetros de translocation microbiana [mediana (IQR)]			
LBP (pg/mL)	6.6 (5.8- 8.6)	5.95 (5.3-8.3)	0.35
CD14 soluble (μg/mL)	1.7 (1.4-2.1)	1.55 (1.3-1.9)	0.37
Parámetros inflamatorios [mediana (IQR)]			
PCR ultrasensible (mg/dl)	0.24 (0.07-0.48)	0.14 (0.07- 0.34)	0.59
IL -6 (pg/mL)	2.7 (1.5- 3.3)	1.4 (0.7-3.4)	0.12
Fibrinógeno (mg/dl)	265 (225.5-346.5)	273.5 (236-317)	0.91
TNF-α (pg/mL)	11.9 (8.7-13.2)	10.6 (8-16)	0.68
VSG (mm/h)	10 (7-18)	7 (5-10)	0.11
β2 microglobulina (μg/mL)	2.11 (1.87-2.45)	1.77 (1.51- 2.13)	0.02

Tabla S2: Análisis de regresión logística multivariado de la LBP

sCD14 (µg/mL)	2.15	(CI 95%: 0.18 - 4.12)	p : 0.03
CD4 nadir (cells/ µl)	-0.59	(CI 95%: -1.41 - 0.23)	p: 0.15
IL-6 (pg/mL)	0.11	(CI 95%: -0.01 - 0.21)	p: 0.06
Fibrinógeno (mg/dl)	-0.03	(CI 95%: -0.19 - 0.14)	p: 0.75
β2microglobulina (µg/mL)	-1.09	(CI 95%: -2.62 - 0.45)	p: 0.16
VSG (mm/h)	1.28	(CI 95%: 0.31 - 2.26)	p: 0.01
PCR ultrasensible (mg/dl)	1.97	(CI 95%: 0.06 - 3.90)	p: 0.04

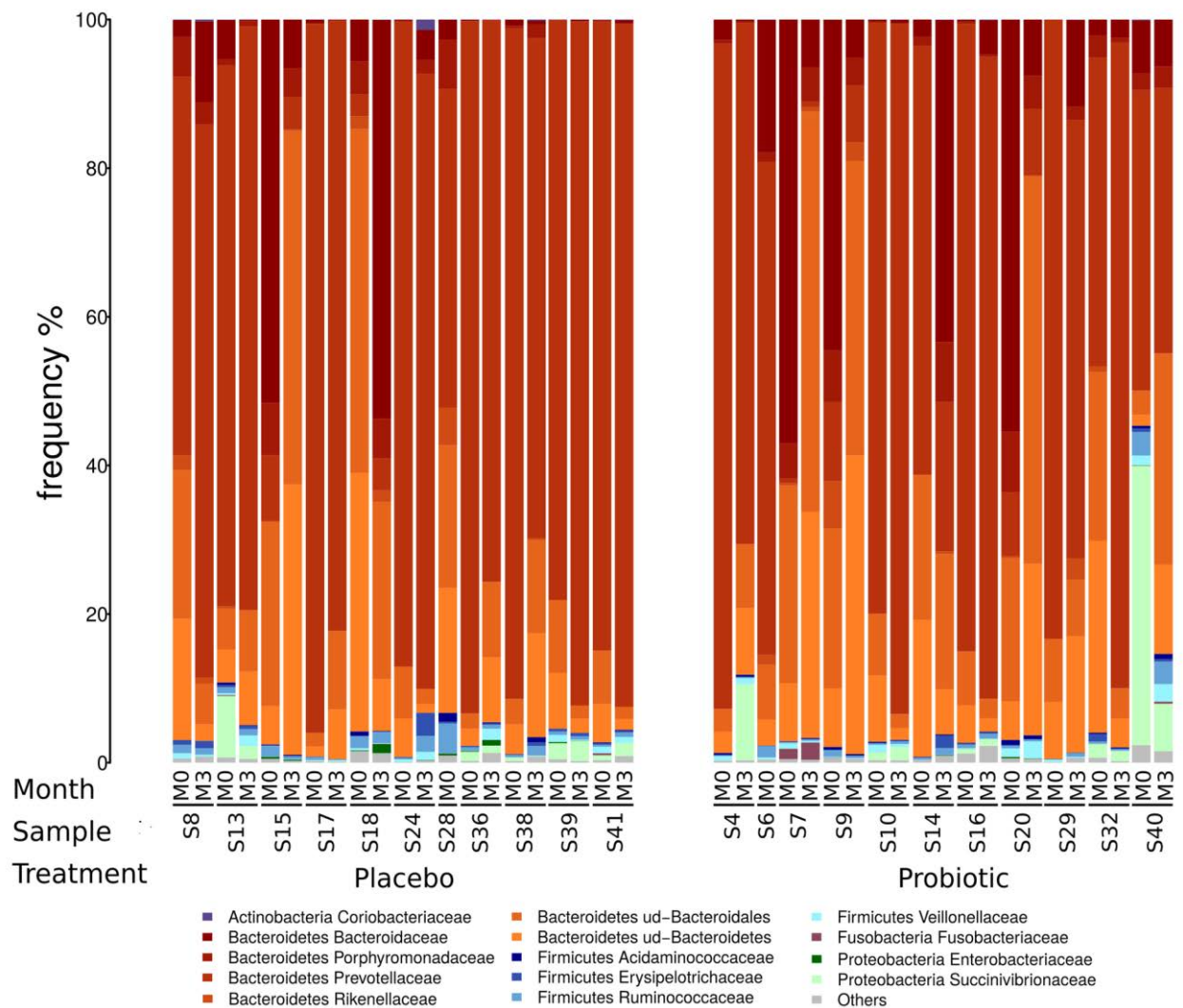
Tabla S3: Análisis de regresión condicional hacia atrás

	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	CI 95% for EXP(B)		
							Lower	Upper	
1 st Step	LBP_Basal	1,135	,782	2,103	1	,147	3,110	,671	14,417
	Gender	1,374	1,251	1,207	1	,272	3,952	,340	45,883
	β2microglob	-,839	,802	1,093	1	,296	,432	,090	2,082
	Fibrinogen	-1,028	,753	1,864	1	,172	,358	,082	1,565
	sCD14	-,237	,825	,082	1	,774	,789	,157	3,977
	Constant	,273	,843	,105	1	,746	1,314		
2 nd Step	LBP_Basal	1,184	,765	2,395	1	,122	3,267	,730	14,627
	Gender	1,409	1,245	1,280	1	,258	4,091	,356	46,970
	β2microglob	-,926	,744	1,550	1	,213	,396	,092	1,702
	Fibrinogen	-1,036	,753	1,892	1	,169	,355	,081	1,553
	Constant	,188	,788	,057	1	,811	1,207		
3 rd Step	LBP_Basal	1,385	,735	3,551	1	,060	3,993	,946	16,857
	β2microglob	-,913	,728	1,574	1	,210	,401	,096	1,671
	Fibrinogen	-,913	,728	1,574	1	,210	,401	,096	1,671
4 th Step	Constant	,192	,782	,060	1	,806	1,212		
	LBP_Basal	1,584	,710	4,977	1	,026	4,875	1,212	19,608
5 th Step	Fibrinogen	-1,008	,710	2,016	1	,156	,365	,091	1,467
	Constant	-,341	,646	,278	1	,598	,711		
5 th Step	LBP_Basal	1,828	,684	7,152	1	,007	6,222	1,630	23,757
	Constant	-,981	,479	4,198	1	,040	,375		

Tabla S4: Regresión logística de los resultados de 16s DNA en inmunodiscordantes

modelDf	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL	NANA	2333	2710646669	NA
InmunoD	~ p.Proteobacteria_c.Betaproteobacteria	13.43195509862229	83910956830	0.0639463583
InmunoD	~ p.Firmicutes_c.Clostridia_f.Lachnospiraceae	14.53867132532125	3004382430	0.0331373035
InmunoD	~ p.Proteobacteria_c.Betaproteobacteria;p.Firmicutes_c.Clostridia_f.Lachnospiraceae	15.44907590152019	85136234150	0.0195786804

Figura S1. Cambios en la composición del microbioma en los grupos probiótico y placebo (ID).



PROTOCOLO S1: protocolo del ensayo clínico en castellano

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN CLINICA INDEPENDIENTE

Expediente nº

SPI/2885/2011

TITULO: Tratamiento con probióticos (<i>Saccharomyces boulardii</i>) y su papel en la translocación bacteriana y la reconstitución inmune en la infección por el VIH.			
Solicitante: Judit Villar García			
Investigador/a principal: Judit Villar García			
TIPO DE PROYECTO:	INDIVIDUAL	X	MULTICENTRICO
NOMBRE COORDINADOR/A (MULTICENTRICOS DE VARIAS SOLICITUDES):			
RESUMEN (Objetivos y metodología del proyecto): Objetivos: PRINCIPAL: Evaluar la evolución de la translocación bacteriana tras el tratamiento con bífidus (<i>Saccharomyces boulardii</i>) en pacientes VIH+ y su papel sobre la reconstitución inmune. OBJETIVOS SECUNDARIOS: 1) Analizar la evolución de los marcadores de actividad inmune tras la administración de los bífidus. 2) Estudiar la evolución de los linfocitos CD4+ y la carga viral del VIH en los pacientes tras la toma de los probióticos. Metodología: <u>Diseño:</u> Estudio controlado prospectivo aleatorizado doble ciego a realizar en un hospital de tercer nivel en Barcelona. <u>Sujetos:</u> Pacientes afectos de infección crónica por VIH. Tamaño muestral: 44 casos. Se dividirán en 2 grupos: (1) Pacientes con linfocitos CD4+>400 cél/ml y carga viral indetectable desde hace más de 2 años (22 casos) y (2) Pacientes con criterios de inmunodiscordancia, definida como recuperación de células TCD4+<350 células/ml a pesar de 4–7 años de tratamiento antirretroviral efectivo (22 casos). <u>Intervención:</u> Los pacientes se randomizarán en 2 subgrupos: (A) recibirán suplementación oral diaria con <i>S. boulardii</i> durante 3 meses y (B), recibirán placebo durante 3 meses. <u>Variables a estudio:</u> niveles de lipopolisacáridos bacterianos en plasma (LBP) y parámetros de activación inmune (sCD14, IFN- γ , TNF, IL-2, IL-5, IL-6, IL-12), y análisis de microbioma fecal previo al uso de probióticos (basal) a los 3 y 6 meses. Se determinarán asimismo datos inmunológicos y clínicos. <u>Medidas de resultado:</u> cuantificación de niveles de translocación bacteriana, marcadores de actividad y análisis del microbioma fecal mediante secuenciación 16s rDNA. <u>Análisis de datos:</u> Se compararán variables a estudio antes y después de la intervención. El análisis se realizará por eficacia biológica e inmunológica.			
TITLE: Treatment with probiotics (<i>Saccharomyces boulardii</i>) and its role in bacterial translocation and immune reconstitution in HIV infection			
SUMMARY (Objectives and methodology): Objectives: MAIN: To evaluate the parameters of bacterial translocation after treatment with probiotics (<i>Saccharomyces boulardii</i>) in HIV+ patients and its role on immune reconstitution. SECONDARY OBJECTIVES: 1) To analyze the progress of immune activity markers after the administration of probiotics. 2) To determine the improvement of CD4+ lymphocytes and HIV viral load in patients after taking probiotics. Methods: <u>Design:</u> A prospective randomized open controlled double-blinded trial, to be performed at a tertiary care hospital in Barcelona. <u>Subjects:</u> Chronic HIV infected patients. Sample size: 44 cases. They'll be divided in 2 groups: (1) Patients with CD4 +> 400 cells / ml and undetectable viral load for more than two years (22 cases) and (2) Patients with immunodiscordancy, defined as patients with CD4 + T cells lower than 350 cells / ml despite 4-7 years of effective antiretroviral therapy. (22 cases). <u>Intervention:</u> Patients were randomized in 2 subgroups: (A) they'll receive daily oral supplementation with <i>S. boulardii</i> for 3 months and (B) they'll receive placebo. <u>Variables:</u> bacterial lipopolisaccharid levels (LBP), parameters of immune activation in plasma (sCD14, IFN- γ , TNF, IL-2, IL-5, IL-6, IL-12) and fecal microbiome prior to the use of probiotics (baseline), at 3 and 6 months. Immunological and clinical data. <u>Outcome measures:</u> quantification of bacterial translocation levels, markers of activity and 16S rDNA gene amplification and parallel sequencing			

of fecal microbiome. Analysis: Comparison of variables before and after the intervention. The analysis will be performed by biological and immunological effectiveness.

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA INDEPENDIENTE: PROTOCOLO

Expediente nº

SPI/2885/2011

IP: Judit Villar García

Hipótesis de trabajo

La suplementación alimentaria oral con *Saccharomyces boulardii* disminuye la enteropatía asociada a la infección por VIH, y, como consecuencia, minimiza la translocación microbiana y la inmunoadactivación crónica secundaria.

Objetivos

Principal:

Evaluar la evolución de la translocación bacteriana y los cambios en el microbioma intestinal tras el tratamiento con bífidos (*Saccharomyces boulardii*) en pacientes VIH positivos con TAR efectivo y su papel sobre la reconstitución inmune.

Objetivos secundarios:

- 1) Analizar la evolución de los marcadores de actividad inmune tras la administración de los probióticos y su relación con la translocación bacteriana y la inflamación sistémica.
- 2) Estudiar si los pacientes inmunodiscordantes presentan mayor translocación bacteriana, inflamación sistémica y un patrón diferente de microbioma intestinal.

Metodología: Diseño del estudio

Estudio experimental controlado, prospectivo aleatorizado, doble ciego.

Ámbito: Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mediques. Laboratorio de Referencia de Catalunya.

Período de estudio: Enero - diciembre del 2012

Población en estudio. Criterios de inclusión/exclusión

La población en estudio está constituida por pacientes con infección crónica por VIH controlados en el Hospital del Mar.

Se dividirán en 2 grupos (22 pacientes por grupo):

- Grupo 1: Pacientes con linfocitos CD4+ > 400 cél/ml y carga viral indetectable desde hace más de dos años.
- Grupo 2: Pacientes con criterios de inmunodiscordancia, definida como recuperación de células T CD4+ inferior a 350 células/ml a pesar de 4–7 años de tratamiento antirretroviral efectivo (carga viral indetectable).

Aleatorización:

Se utilizará una lista de aleatorización generada por computadora, que llevara a cabo un farmacéutico del hospital no relacionados con el cuidado de los pacientes, los recipientes serán numerados secuencialmente. Tanto los participantes como los investigadores desconocerán el contenido de la asignación de las intervenciones (doble ciego).

Los pacientes de ambos grupos se randomizarán en 2 subgrupos:

(A) pacientes que recibirán suplementación oral diaria con *S. boulardii* durante 3 meses, tras los cuales pararán el tratamiento.

(B) pacientes que recibirán placebo blanco (lactosa) durante 3 meses.

Criterios de exclusión:

- Pacientes que reciban o hayan recibido en los últimos 6 meses complementos alimenticios que contengan probióticos.
- Pacientes que hayan recibido tratamiento antibiótico en los últimos 2 meses, o que, por su patología de base diferente al VIH, requieran la toma de antibióticos más de 2 veces al año.
- La toma de antibióticos durante el estudio, no excluirá a los pacientes del mismo.
- Pacientes a los que se les presuponga mala adherencia a los suplementos alimenticios.
- Pacientes que hayan cambiado el TAR en los últimos 3 meses.
- Pacientes que no firmen el consentimiento informado.

Intervención:

- La intervención será llevada a cabo un médico experto en Enfermedades Infecciosas (IP).
- Se prescribirán a todos los pacientes tratamiento diario (*S. boulardii* VS placebo) en dosis de 2 cápsulas cada 12 horas, como mínimo media hora antes de la ingesta.
- Se realizará extracción de muestras sanguíneas y recogida de heces antes de iniciar los probióticos (basal) a los 3 y 6 meses.
- La realización del estudio no conllevará ninguna modificación de la práctica clínica habitual salvo la obtención de muestras sanguíneas con la periodicidad señalada y la suplementación alimentaria durante los meses que se hayan determinado de forma aleatoria.

VARIABLES PRINCIPALES Y SECUNDARIAS

En cada caso se incluirán las siguientes variables en la hoja de recogida de datos:

- Datos de filiación y demográficos, altura, peso, hábitos tóxicos, hábito deposicional.
- Se aplicará la escala HANDS de ansiedad/depresión.
- Se registrarán las fechas de inicio y de finalización de la medicación antirretroviral pasada y actual, así como de la medicación concomitante administrada durante el estudio, incluida la toma de antibióticos.
- La toma de antibióticos durante el estudio, no excluirá a los pacientes del mismo, ya que la cepa a estudio (*S. boulardii* 17) es resistente a antibióticos, pero se registrará como una variable por si pudiera alterar los resultados.
- Se registrarán posibles efectos adversos derivados de la toma de bífidos.
- Se registrará la adherencia al tratamiento, con conteo de las cápsulas que se devuelven en cada visita.

VARIABLES A ESTUDIO:

Se realizará extracción analítica y recogida de heces a todos los pacientes previo al uso de probióticos (basal), a los 3 y 6 meses, determinándose los siguientes parámetros:

Variable principal:

Niveles de lipopolisacáridos bacterianos en plasma: Lipopolisaccharide Binding Proteine (LBP), como marcador de translocación bacteriana.

Variables secundarias:

- Marcadores de actividad inmune: CD14 soluble (sCD14), Interferón gamma (IFN- γ), Factor de necrosis tumoral (TNF α), IL-2, IL-5, IL-6, IL-12, VSG, PCR ultrasensible, D-dímero, fibrinógeno, Ig G, e Ig E.
- Parámetros que determinan el estado inmunológico: cifra de linfocitos CD4 +, CD 8 +.
- Carga viral del VIH.
- Análisis de microbioma intestinal mediante secuenciación 16s rDNA.

- Recogida de datos: Los datos recogidos se incluirán en una base de datos específicamente diseñada.

Procedimiento:

- Los análisis se realiza'ran en muestras de sangre extraídas en Hospital de Día de Enfermedades Infecciosas. Se usarán tubos de 9 mL Vacuette (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Austria). A los 30 minutos tras la punción, la sangre se centrifugará a 3000 rpm durante 15 minutos, y las muestras de suero serán alicuotadas y congeladas a -80°C hasta su análisis posterior.
- Para todas las determinaciones, las muestras de suero descongeladas se someterán a vórtice y se centrifugarán a 14.000 rpm durante 10 minutos. Además de las alícuotas requeridas en la extracción analítica habitual para el control de la infección por VIH, se añadirá un tubo de suero de 3 mL y uno de EDTA.
- Los pacientes aportarán 50gr de heces recogidas en un contenedor estéril hace <24 h y se congelarán inmediatamente, siendo conservadas una vez entregadas al investigador a -80°C.
- Éste procedimiento se repetirá en las visitas BASAL, a los 3 y a los 6 meses, en ambas ramas del estudio.
- Una vez recogidas todas las muestras del estudio, se enviarán en nieve carbónica al Laboratorio de Referencia de Cataluña, donde serán analizadas.

Análisis de las muestras:

- Para el análisis de marcadores de inflamación (IL-6 y FNT-a) se usará MAPA basado en microesferas fluorescentes (Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania; Luminex / Bioplex200-Luminex Corp., Austin, TX y BioRad, Hercules , CA). El perfil multianálisis de las concentraciones séricas se realizará usando un kit de inmunoensayo múltiple disponible comercialmente (HSCYTMAG-60K; Millipore, Billerica, MA).
- La PCR ultrasensible y la B2 microglobulina se medirán utilizando el ensayo inmunométrico quimioluminiscente Inmulite en su analizador automático (Inmulite Uno; Siemens Healthcare, Llanberis, Reino Unido).
- El fibrinógeno plasmático se medirá utilizando el método de Clauss coagulativa con reactivos HemosIL (Instrumentation Laboratory, Bedford, MA).
- La translocación microbiana (niveles de séricos de CD14 soluble) se cuantificará por duplicado con un kit de inmunoensayo multiplex comercial (Quantikine; R & D Systems, Minneapolis, MN) utilizando una estación de trabajo robotizada Quanta-Lyser 160 (Inova Diagnostics, San Diego, CA). La concentración más baja detectable sCD14 es 0,25 ng / ml .
- La LBP sérica se midió usando el ensayo inmunométrico quimioluminiscente Immulite en su analizador automatizado.
- Todos los ensayos se realizarán de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para el análisis de control de calidad se utilizarán los materiales que incorporan los kits, y será interno.
- Análisis del microbioma fecal: Se extraerá ADN de las muestras de heces congeladas y se amplificarán por PCR las regiones 16S usando cebadores descritos previamente ([Klindworth A, Nucleic Acids Res. 2013](#)); Se realizará secuenciación Illumina de acuerdo a protocolos estándar descritos previamente ([Caporaso JG, ISME J. 2012](#)). La composición taxonómica de la microbiota intestinal se caracterizará mediante agrupación de secuencias en Otus (Unidades de Organización taxonómica).

Análisis de los datos:

- Se analizarán los datos mediante el paquete estadístico SPSS 19.0. El análisis se realizará de "eficacia

biológica e inmunológica” y según el tratamiento recibido y su duración. Las variables cuantitativas se describirán con la media (y desviación estándar) o la mediana (y la amplitud intercuartil) en función de su homogeneidad, y las cualitativas en números absolutos y porcentajes. Las variables categóricas (porcentajes) se compararán mediante una prueba de X² (o de Fisher, si procede) y las cuantitativas mediante una prueba de t de Student (o la prueba U de Mann-Whitney, en su caso). En caso de que hubiera diferencias significativas o relevantes entre las características basales de los grupos en comparación, respecto a alguna variable, se ajustará el análisis por dicha variable, mediante un análisis de regresión logística. Las incidencias y riesgos relativos se calcularán con un intervalo de confianza (IC) del 95%. Se considerará significativo un valor de $p < 0.05$.

- Para el análisis taxonómico y bioinformático del microbioma fecal se utilizará el algoritmo de código abierto QIIME para el manejo e interpretación de los datos de las secuencias en bruto; después de la evaluación de calidad de los datos de secuencias, se asignarán afiliaciones taxonómicas utilizando el RDP_classifier del Proyecto de base de datos ribosomal (Wang, Q, Appl Environ Microbiol. 2007).

Aspectos éticos: Este estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética del Hospital del Mar –Instituto de Investigaciones biomédicas según la Declaración de Helsinki (anexo). La firma del consentimiento informado será requisito indispensable para la inclusión de los pacientes en el estudio de manera izada (anexo).

Aspectos relacionados con el medicamento en investigación(fabricación, etiquetado, distribución...)

- Probiótico: Nombre comercial: **Ultra – Levura**® liofilizada

Responsable de la fabricación: *BIOCODEX*.

Medicamento comercializado y distribuido en España por Laboratorios Zambon S.A.

Presentación: envase con 50 cápsulas.

Composición cuantitativa: Cada cápsula contiene 1.000 millones de gérmenes vivos (10^7) **Saccharomyces boulardii 17** liofilizado: 56.5 mg. Excipientes: Sacarosa (92.3mg), estearato magnésico c.s.p.

Precio de Venta del Laboratorio: 5,51 €/frasco de 50 comprimidos.

- Placebo blanco: Sacarosa

Responsable de la fabricación: *Kern Pharma*

Fuentes de financiación: Ayuda a la Investigación Clínica independiente del Ministerio de Sanidad nº **SPI/2885/2011**

Expediente nº

SPI/2885/2011

IP: Judit Villar García

Plan de trabajo

El proyecto se realizará en el Hospital del Mar, siguiendo las diferentes **etapas**:

FASE 1: (Duración: 3 meses)

- Selección de los pacientes que se incluirán en el estudio.
- Puesta a punto del circuito de extracción y procesamiento de las muestras.

FASE 2: (6 meses)

- Reclutamiento, inclusión y aleatorización de los pacientes.
- Administración de probióticos de forma controlada en la visita Basal, a los 3 meses y a los 6 meses en el grupo seleccionado aleatoriamente.
- Obtención de los datos basales y de las muestras en plasma y heces , a los 3 y a los 6 meses de los pacientes.

- Almacenamiento de los datos en la base diseñada para tal fin.
- Análisis preliminar de los datos.

FASE 3: (12 meses)

- Finalización del seguimiento de los pacientes incluidos en el último mes.
- Análisis definitivo de los datos.
- Publicación de los resultados y comunicación de los mismos en un congreso internacional.

INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE

Título del estudio: Tratamiento con probióticos (*Saccharomyces boulardii*) y su papel en la translocación bacteriana y la reconstitución inmune en la infección por el VIH. SPI/2885/2011

Hospital o Institución

Departamento de Medicina Interna- Enfermedades Infecciosas
Hospital del Mar
Paseo Marítimo, 25-29
08003 Barcelona, Spain

Nombre y apellidos del paciente

1. NATURALEZA Y OBJETIVO DEL ESTUDIO

Este es un documento de consentimiento informado. Contiene una explicación completa del estudio al que le invitamos a participar y un formulario de consentimiento que le pediremos que firme si decide participar. Se le está pidiendo que participe porque usted tiene una infección crónica por el VIH. Existe una necesidad de avanzar en los conocimientos sobre el uso de probióticos en la práctica clínica. Por este motivo, el Hospital del Mar está realizando un estudio prospectivo y controlado con suplementos alimenticios para recopilar información adicional sobre sus efectos sobre la salud, en concreto sobre su sistema inmunológico. Se le administrará, con éste fin, *Saccharomices boulardii* (Ultra-levura®), que deberá tomar diariamente siguiendo las preinscripciones de su médico. Los métodos para este estudio y el presente FCI también han sido examinados y aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica de este hospital y por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS).

2. DURACIÓN PREVISTA DEL ESTUDIO Y NÚMERO PREVISTO DE PARTICIPANTES

En este estudio participarán aproximadamente 44 personas. Usted estará en el estudio durante un periodo máximo de 6 meses.

3. EXPLICACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS A SEGUIR

Una vez haya cumplido los requisitos para formar parte del estudio, un médico le entrevistará y estudiará su historia clínica para obtener la siguiente información:

- Fecha de nacimiento, sexo y raza/origen étnico.
- Altura, peso, e historia clínica general, incluidos los hábitos tóxicos, hábito deposicional y estado anímico. Se registrarán las fechas de inicio y de finalización de la medicación pasada y actual.
- Resultados de laboratorio de sus últimos análisis de sangre y la muestra de heces.

Se le asignará un grupo al azar, con un 50% de posibilidades de ser asignado a cada grupo, y dependiendo de la asignación tomará el probiótico o el placebo, durante 3 meses. Su asignación a uno u otro grupo no podrá ser elegida por usted ni por su médico. Ni usted ni su médico conocerán si está tomando probióticos o placebo, aunque se podrá saber en cualquier momento si fuera necesario.

Se le realizarán análisis en la primera visita, a los 3 y a los 6 meses. En cada visita deberá aportar una

muestra de heces de hace menos de 24h y mantenerla congelada hasta entregarla. Durante el estudio, usted no podrá tomar otros suplementos alimenticios, incluidos lácteos, que contengan probióticos, ya que esto podría alterar los resultados.

SEGUIMIENTO

Se recogerá información sobre su salud y sobre el tratamiento durante un mínimo de 6 meses. Esta información procederá de las visitas habituales a su médico y de su historia clínica así como de cualquier prueba que se realice como parte de su tratamiento estándar.

4. NOTIFICACIÓN DE EFECTOS SECUNDARIOS

- No se han descrito contraindicaciones ni efectos secundarios al tomar *Saccharomyces boulardii*.
- Tampoco se han descrito interacciones con los fármacos que usted esté tomando para el VIH.
- Deberá notificar a su médico en cuanto le sea posible si va a recibir o le han administrado tratamiento antibiótico, ya que podría alterar los resultados del estudio.
- Deberá notificar cualquier acontecimiento adverso que experimente a su médico. Si experimenta un acontecimiento adverso grave, como una enfermedad que requiera hospitalización, informe de ello a su médico del estudio inmediatamente o en cuanto le sea posible.
- En caso de embarazo (si es usted una mujer) mientras dure su participación en este estudio, deberá informar a su médico, aunque podrá continuar tomando el tratamiento.

5. DERECHO A RETIRARSE DEL ESTUDIO

La participación en este estudio es voluntaria. Puede decidir no participar o puede abandonar el estudio en cualquier momento. Si decide no participar o abandonar el estudio, esto no tendrá ninguna penalización para usted. No perderá ningún beneficio al que tuviera derecho ni su decisión afectará a su acceso a la asistencia médica en el futuro. Al retirarse del estudio, los datos y las muestras que ya se hayan tomado se analizarán tal como está previsto, a menos que usted declare que no lo permite en el momento de abandonar el estudio.

6. CONFIDENCIALIDAD

Acceso a su historia clínica: Los médicos del Centro que participan en este estudio necesitarán acceso a su historia clínica, incluidos sus registros médicos pasados y los resultados de los análisis para la finalidad de este estudio. Con la firma del consentimiento informado usted autoriza este acceso y, en caso necesario, el personal del estudio podrá ponerse en contacto con su médico de familia y con otros profesionales sanitarios para obtener acceso a su El acceso a su información personal estará limitado al médico del estudio y a sus colaboradores, a las autoridades sanitarias y al Comité Ético de Investigación Clínica. Todos ellos actuarán de acuerdo con el secreto profesional inherente a su actividad, en caso necesario, para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero manteniendo siempre su confidencialidad de conformidad con la legislación actual.

Abandono del estudio

Si desea retirarse del estudio, deberá comunicárselo a su médico del estudio. Este podrá intentar contactar con usted si abandona el estudio sin comunicárselo, para saber si desea continuar. Si decide abandonar el estudio, el personal del estudio no recogerá más información sobre usted, aunque la información sobre usted que ya haya sido recogida podrá seguir utilizándose según lo especificado

anteriormente. Si tiene alguna pregunta, le recomendamos que se la comente a su médico del estudio.

Cumplimiento de la legislación actual sobre la confidencialidad de la información sobre su salud

El tratamiento de los datos seguirá los principios establecidos en la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica, en la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal y en el Real Decreto 1720/2007 por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal.

7. COMPENSACIÓN

El médico o su institución no recibirán ninguna compensación por parte del laboratorio que comercializa el probiótico. Este estudio no tendrá ningún coste para usted, ya que se le administrará el probiótico de forma gratuita durante las visitas. No recibirá compensación económica por participar en el estudio.

8. RESPUESTA A LAS PREGUNTAS ACERCA DE ESTE ESTUDIO

Antes de que firme este formulario, puede preguntar sobre cualquier cosa que no entienda. El personal del estudio responderá a sus preguntas antes, durante y después del estudio.

Póngase en contacto con _____ en _____ por alguno de los siguientes motivos:

- Si tiene alguna pregunta sobre su participación en este estudio.
- Si tiene preguntas, preocupaciones o quejas sobre la investigación.

Antes de que firme este formulario, puede preguntar sobre cualquier cosa que no entienda. El personal del estudio responderá a sus preguntas antes, durante y después del estudio.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del estudio: Tratamiento con probióticos (*Saccharomyces boulardii*) y su papel en la translocación bacteriana y la reconstitución inmune en la infección por el VIH. SPI/2885/2011

Acepto participar en éste estudio prospectivo, aleatorizado, con un probiótico versus placebo, tal como se especifica en el formulario informativo que se me ha entregado.

Entiendo que mi participación en este estudio es voluntaria y que puedo abandonar el estudio en cualquier momento, sin especificar el motivo. He leído toda la información sobre este estudio y todas mis preguntas han sido respondidas satisfactoriamente. Acepto que mis datos para el estudio arriba mencionado se utilicen tal como se especifica en el formulario y que podrán transferirse para su evaluación, guardarse y gestionarse de forma electrónica de manera anónima. Entiendo que recibiré una copia de este consentimiento, que he firmado, junto con la hoja de información que se me ha entregado.

Se me ha informado de que mi historia clínica podrá ser objeto de una auditoría por parte del Comité

ético/científico del Hospital o por parte del Comité Ético de Investigación Clínica y las autoridades sanitarias, en caso de que proceda, y doy mi consentimiento para ello.

Nombre:.....

(Paciente o representante legal)

Firma..... Fecha.....

(Paciente o representante legal)

Confirmando que el paciente ha sido informado sobre la naturaleza, el objetivo y los posibles resultados de este estudio prospectivo, randomizado y controlado con un probiótico. La información para el paciente ha sido comentada y proporcionada junto con el formulario de consentimiento informado.

Nombre..... Fecha.....

(Responsable de explicar el consentimiento)

Firma.....

5. DISCUSIÓN

Estos son los dos primeros estudios publicados que evalúan el impacto del tratamiento con el probiótico *S. boulardii* en pacientes VIH.

Ha quedado evidenciado en estudios previos como la enteropatía crónica producida por la infección VIH y no reparada por el TAR se ha asociado con un aumento de la translocación microbiana, lo que es una de las causas de la persistencia de inflamación crónica, el compromiso inmunitario y la progresión de la enfermedad (25-27,97). Por tanto, parece lógico proponer intervenciones terapéuticas dirigidas a mejorar la enteropatía asociada al VIH y modular el microbioma intestinal mitigando la disbiosis intestinal (98,99).

En el primer artículo se muestra una reducción significativa en los niveles plasmáticos de translocación bacteriana (LPB) e inflamación sistémica (IL-6) en un reducido número de pacientes VIH virológicamente suprimidos tras la suplementación durante 12 semanas con el probiótico *S. boulardii* en comparación con placebo. En el segundo artículo, se da un paso más mediante el análisis de las muestras de heces con secuenciación 16S para analizar los patrones del microbioma intestinal antes y después de la intervención, y para evaluar si algunas especies predominantes se asocian con el aumento de la translocación bacteriana, la inflamación sistémica y la pobre respuesta inmune en este mismo grupo de pacientes.

Dado que el primer estudio se centra en la inflamación y la translocación bacteriana, los pacientes que presentaron eventos clínicos durante el mismo (sepsis o infección), que además requirieron de la administración de antibióticos de amplio espectro, fueron analizados de forma separada para evitar posibles factores de confusión. El análisis por intención de tratar (ITT), que incluyó todos los pacientes, mostró una disminución de la LBP durante la administración del probiótico. El análisis que excluyó los pacientes con posibles factores de confusión (OT), mostró una disminución de los valores de translocación bacteriana e inflamación sistémica (IL-6), que además se mantuvieron a los 3 meses tras la retirada del probiótico. Estas observaciones, si se confirman en estudios posteriores más extensos, son de gran relevancia clínica, dada la clara relación establecida entre la elevación persistente de la IL-6 y el aumento de la morbilidad y mortalidad en los pacientes VIH (26,100,101). Sin embargo, al no estar establecidos los valores óptimos de la LBP o la IL-6 en la población general, la repercusión clínica de estos hallazgos aún está por definir.

Este estudio no mostró un efecto significativo de *S. boulardii* en la función inmune, medida mediante el recuento de T-CD4+ y T-CD8+. Estos resultados son similares a los

obtenidos con otros probióticos, quizás porque su mecanismo de acción beneficioso para el sistema inmune no repercute directamente en la cifra de Cd4+/Cd8+ (102). Otros parámetros tales como sCD14, TNF- α , PCR ultrasensible u otros marcadores inmunológicos tampoco variaron en este estudio. No se objetivaron eventos adversos o intolerancia asociados al uso de los probióticos, lo que confirma los datos sobre seguridad de *S. Boulardii*, también en pacientes con inmunodepresión celular (103).

La principal limitación del estudio fue el tamaño muestral; teniendo en cuenta además que una proporción significativa de los pacientes presentó un evento clínico durante el estudio que hizo necesario realizar 2 tipos de análisis, uno de ellos excluyendo pacientes. Otra limitación fue que la adherencia a la intervención fue evaluada mediante conteo de cápsulas retornadas y por entrevista clínica, ya que no se disponía de ninguna otra medición objetiva, como la detección de la levadura en plasma o heces, aunque se seleccionaron pacientes con una alta adherencia a los tratamientos, incluido el TAR. Además, al no existir estudios previos con *S. Boulardii* en pacientes VIH, se seleccionó la dosis diaria del probiótico recomendada para tratar enfermedades caracterizadas por un aumento de la permeabilidad intestinal y translocación bacteriana (89). Tampoco se conoce la duración necesaria del tratamiento para producir los efectos beneficiosos en el paciente, aunque en nuestro estudio la disminución de la LBP se mantuvo a las 12 semanas de haber interrumpido el tratamiento. A pesar de que se incluyeron pacientes con características basales similares, que seguían dietas estándar, la falta de datos sobre la influencia de otras variables como los hábitos higiénico-dietéticos sobre la microbiota intestinal, podrían haber influido sobre los resultados obtenidos.

El segundo artículo da un paso más y analiza los cambios en la composición del microbioma intestinal, después del tratamiento con *Saccharomyces boulardii* y cómo estos cambios se correlacionan con la translocación microbiana y la inflamación sistémica en el mismo grupo de pacientes. Para ello se analizaron mediante una plataforma de secuenciación 16S rDNA las heces recogidas en las visitas basal y semana 12 de este mismo grupo de pacientes, intentando dilucidar si el posible efecto beneficioso del probiótico objetivado en el primer estudio, se debe a una modificación del microbioma intestinal hacia especies menos pro-inflamatorias.

En el análisis basal del plasma se confirmó que existe una relación entre la translocación microbiana, medida mediante la LBP, y varios parámetros relacionados con la inflamación sistémica (IL6, PCR ultrasensible, β 2-microglobulina y fibrinógeno). Estos datos son consistentes con estudios previos que demuestran, tanto en pacientes VIH

tratados como no tratados, una correlación directa entre los parámetros sistémicos de la translocación microbiana, y la activación inmune crónica y la progresión de la enfermedad (21,22,104,105). Este hallazgo confirma que la LBP sérica podría ser utilizada como un marcador de translocación bacteriana y progresión de la enfermedad, incluso en pacientes con supresión virológica.

Se ha demostrado recientemente cómo varias comunidades microbianas residentes en el tracto GI de pacientes VIH están correlacionadas con marcadores de translocación microbiana plasmática (CD14 soluble y LBP) y así como la citoquina pro-inflamatoria interleuquina-6 (63,66,68). Los primeros trabajos publicados en este sentido describieron como "ecosistema disbiótico", aquel con una mayor proporción de microbios con más potencial patógeno en comparación con organismos indígenas o comensales menos agresivos. Estos estudios, a pesar de sus limitaciones (tamaño muestral, métodos diferentes para identificar grupos taxonómicos y biomarcadores, etc), han tratado de identificar un patrón intestinal disbiótico, caracterizado por cambios en las proporciones de diferentes especies habituales, menor diversidad taxonómica, un aumento de la translocación microbiana, inflamación crónica y la hiperactivación de las células T CD4+, a pesar de haber logrado la supresión virológica a largo plazo (63-71).

Tras el tratamiento probiótico, se observó una disminución significativa en algunos grupos de Clostridiales, como en las comunidades de *Clostridiaceae* y *Catenibacterium*. Estudios previos han utilizado técnicas más antiguas y menos sensibles como la PCR o FISH, en lugar de secuenciación 16S rDNA, para evaluar los efectos de la suplementación con determinados prebióticos en pacientes VIH adultos sin tratamiento (74) o la suplementación con *S. boulardii* en adultos VIH-negativos con enteritis (96). Estos estudios observaron, tras la intervención, una reducción en las concentraciones de especies patógenas relacionadas con Clostridia, que se consideran bacterias mucotrópicas proinflamatorias, aunque estos autores no evaluaron si esta modificación del microbioma se correlacionaba con una disminución en la inflamación sistémica. Estudios recientes han reportado una mayor proporción de *Catenibacterium* en pacientes con VIH comparado con el microbioma intestinal de individuos sanos (63,70). *Catenibacterium* es un género Gram-positivo, no-formador de esporas y anaeróbico de la familia de *Erysipelotrichidae*. Los taxones en esta familia fueron los más abundantes (69), y se objetivó un enriquecimiento significativo (65,70) en los sujetos infectados por VIH no tratados en comparación a pacientes VIH negativos. Este enriquecimiento se correlacionó con los marcadores de translocación microbiana e inflamación sistémica en los pacientes VIH (65). En nuestro estudio, la concentración de *Catenibacterium*, que también se han

asociado con otras enfermedades, como la insuficiencia renal crónica o la resistencia a la insulina (106-108), también disminuyó después del tratamiento probiótico.

Además, en nuestro estudio se objetivó una correlación significativa entre algunos taxones bacterianos (Clostridia) y parámetros de translocación microbiana e inflamación sistémica en el grupo de pacientes inmunodiscordantes (INR), que mostraron mayor enriquecimiento de esta comunidad. Estudios recientes han demostrado una correlación estadísticamente significativa entre algunas especies de Clostridia, como *Lachnospiraceae*, y el aumento de los parámetros de activación inmune sistémica (TNF) en pacientes infectados por el VIH (63). Si bien los factores inmunológicos que condicionan la disbiosis intestinal asociada a la infección por VIH son complejos, nuestro estudio mostró una reducción significativa en estas comunidades bacterianas después de administrar el probiótico.

En este segundo trabajo se analizaron de forma específica los hallazgos obtenidos en el grupo de pacientes previamente seleccionados como inmunodiscordantes. Se ha descrito con anterioridad como haber iniciado los antirretrovirales en un estado de inmunosupresión más avanzada resulta en un daño en la integridad de la bioestructura y el sistema inmune GI (GALT), lo que desemboca en la translocación microbiana e inmunoactivación persistentes y dificulta la reconstitución inmune a pesar de conseguir la supresión virológica (45-49). Nuestros resultados son consistentes con estos hallazgos, ya que en el grupo de pacientes inmunodiscordantes se observó una mayor proporción de individuos con valores superiores a la mediana en los marcadores de translocación (LBP y CD14 soluble), así como de fibrinógeno y $\beta 2$ microglobulina. Además, en este trabajo se ha intentado dar un paso más comparando la composición del microbioma intestinal entre los pacientes respondedores inmunológicos y los inmunodiscordantes. El análisis de las heces muestra que los pacientes ID presentaron basalmente mayores niveles de Proteobacteria y *Lachnospiraceae* (Clostridiales). Curiosamente, la abundancia relativa de este género en los pacientes con inmunodiscordancia se asoció en nuestro estudio con una mayor translocación bacteriana (CD14 soluble y LBP) e inflamación sistémica (IL-6). Estudios recientes han demostrado también que las Proteobacterias, que están sobre-representadas en nuestro grupo de inmunodiscordantes, son responsables de gran parte de la translocación en un estudio realizado en macacos infectados por SIV (109). Aunque los mecanismos siguen siendo desconocidos, Brenchley *et al.* sugirieron como posibles razones las características propias de esta especie: su motilidad, su alta actividad metabólica y la posesión de genes que les permiten la evasión de los mecanismos de control inmunitarios (110). La identificación de las especies intestinales

que contribuyen a la patogénesis de la inmunodiscordancia y la activación inmunitaria persistente podría ser una nueva herramienta diagnóstica y terapéutica en este grupo de pacientes VIH con un riesgo aumentado de progresión clínica y muerte.

Estudios preliminares han demostrado cómo la administración de pre y probióticos fue segura, objetivándose mejoras modestas en la inmunidad (recuento de CD4 +T), curvas de crecimiento y síntomas gastrointestinales en niños sin TAR (79-82), aunque parte de estos resultados podrían explicarse al mejorar el estado nutricional de los pacientes, ya que se administraban en forma de suplementos de yogurt proteico en países de baja renta con importantes carencias nutricionales, más que por el efecto de la cepa del probiótico administrado (111). Los resultados más recientes con otras combinaciones de probióticos han sido modestos (84,112). En la mayoría de estos estudios preliminares no se incluyó una rama comparativa con placebo (86), salvo excepciones (113,114), siendo los resultados más prometedores y exhaustivos en ensayos realizados en macacos (83,85), donde se ha podido objetivar el efecto antiinflamatorio local y sistémico del probiótico. En los estudios en humanos tampoco se han estudiado en profundidad los cambios concretos que el probiótico ejerce sobre la bioestructura del epitelio intestinal o sobre las especies concretas del microbioma intestinal, que puedan justificar su potencial efecto beneficioso. Lo que ha quedado claro en estos estudios es que no todos los probióticos muestran la misma eficacia, ya que los mecanismos de acción son cepa-dependientes.

Las propiedades de *S. boulardii* y sus múltiples mecanismos de acción descritos previamente apoyan su eficacia en diferentes estados inflamatorios intestinales (87-96). Además de impedir el sobrecrecimiento bacteriano de microorganismos intestinales patógenos o dificultar su adhesión al epitelio del huésped, más recientemente se ha demostrado que *S. boulardii* aumenta el número absoluto de los principales grupos bacterianos fermentadores habituales y disminuye las concentraciones de comunidades bacterianas ocasionales mucotrópicas (115).

Estos son los dos primeros artículos publicados sobre la efectividad de *S. boulardii* en pacientes VIH y su impacto sobre el microbioma intestinal. Una limitación de este estudio es que sólo se ha podido analizar por el momento el microbioma bacteriano, y no el fungoma. Al ser *S. boulardii* una levadura, no se ha podido demostrar la colonización intestinal por el probiótico. La modificación de ciertas comunidades con una funcionalidad “disbiótica” o la sustitución de unas especies de levaduras por otras tras el tratamiento con *S. boulardii* también habrían podido contribuir a la disminución de la translocación

microbiana (115), aunque nuestro estudio no fue diseñado para determinar el mecanismo a través del cual los cambios en el microbioma intestinal alteran su anatomía funcional, metabolómica o fungioma.

Este estudio además comparte las limitaciones con otros estudios sobre este tema. Son trabajos con un número pequeño de pacientes incluidos, y se necesitan estudios más extensos con mejores herramientas de análisis antes de llegar a conclusiones definitivas, incluyendo la selección de los pacientes que mejor podrían responder al tratamiento probiótico, así como las dosis y la duración de la terapia, o conocer el impacto que otras variables que potencialmente alteren el microbioma puedan tener sobre los resultados finales. Sin embargo, dado el uso cada vez más extendido de las técnicas de metabolómica y metagenómica, el análisis de la composición del microbioma intestinal en heces podría ser utilizado en el futuro como un marcador de respuesta inmune insuficiente, inflamación sistémica crónica no controlada y por tanto, de progresión de la infección por VIH. Más importante aún, el microbioma intestinal puede ser modificado usando ciertas cepas de probióticos para generar un ecosistema menos proinflamatorio.

En resumen, el presente estudio demuestra que el tratamiento con el probiótico *Saccharomyces boulardii* modifica el microbioma intestinal, disminuye los parámetros de translocación bacteriana y disminuye marcadores inflamatorios. Dado que los efectos específicos de la infección por el VIH sobre ciertas comunidades residentes que contribuyen a la inactivación crónica aún son poco conocidos, se requieren nuevos estudios más exhaustivos antes de llegar a conclusiones categóricas, aunque parece razonable continuar estudiando tratamientos orientados a mejorar la enteropatía y mejoren la riqueza microbiana intestinal, mitigando así la disfunción inmune asociada al VIH.

6. CONCLUSIONES

1. El tratamiento con el probiótico *Saccharomyces boulardii* durante 12 semanas disminuye los marcadores de translocación microbiana (LBP) y de inflamación (IL-6) en pacientes VIH con supresión virológica, parámetros directamente relacionados con la progresión de la enfermedad y la morbi-mortalidad.
2. El efecto beneficioso sobre la translocación microbiana se mantuvo a las 12 semanas de la interrupción del tratamiento.
3. Tras el tratamiento probiótico se observó un cambio en la composición del microbioma intestinal de los pacientes, disminuyendo algunas especies que se correlacionaron de manera independiente con parámetros en plasma de translocación microbiana e inflamación.
4. Los altos niveles en plasma de translocación microbiana y de especies como *Proteobacteria* y *Lachnospiraceae* en el microbioma intestinal se asociaron significativamente con la inmunodiscordancia.
5. El tratamiento no produjo cambios significativos en el recuento de células T Cd4+ ni Cd8+, tampoco en los pacientes inmunodiscordantes.
6. *S. Boulardii* fue bien tolerado y seguro, sin presentarse efectos adversos o intolerancia de ningún tipo.
7. Estos datos sugieren que el tratamiento con determinadas cepas de probióticos (de bajo coste y seguros) puede ser una nueva estrategia terapéutica complementaria al TAR para reducir la inflamación crónica secundaria a la translocación microbiana, lo que potencialmente tendría un impacto beneficioso sobre la morbi-mortalidad, aunque se requieren estudios que incorporen un mayor número de participantes para determinar la dosis y la duración óptima del tratamiento, así como para seleccionar los pacientes que puedan obtener el máximo beneficio de esta herramienta terapéutica.
8. Además, aunque la interacción entre determinadas especies del microbioma intestinal y el sistema inmune es compleja y se requieren estudios descriptivos que incorporen grandes cohortes poblacionales, nuestros datos sugieren que la identificación de especies potencialmente pro-inflamatorias en el microbioma

intestinal podría ser un nuevo marcador de la respuesta inmune deficiente y de progresión de la enfermedad. El estudio de las posibles correlaciones entre la composición de la comunidad microbiana y el huésped puede contribuir a una mejora de la gestión integral de la infección por el VIH.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Brenchley JM, Price DA, Douek DC. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nat Immunol.* 2006;7:235–239.
2. Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, et al. Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* 2005;434:1093–1097.
3. Li Q, Duan L, Rourke T, et al. Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells. *Nature* 2005;434:1148–52.
4. Guadalupe M, Reay E, Flamm J, et al. Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J Virol.* 2003;77:11708–11717.
5. Chun TW, Nickle DC, Justement JS, et al. Persistence of HIV in gut-associated lymphoid tissue despite long-term antiretroviral therapy. *Journal of Infectious Diseases* 2008;197:714–720
6. Nazli A, Chan O, Dobson-Belair WN, et al. Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation. *Plos Pathog* 2010;6:e1000852.
7. Cassol E, Malfeld S, Mahasa P, et al. Persistent microbial translocation and immune activation in HIV-1-infected South Africans receiving combination antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2010; 202:723–33.
8. Brandtzaeg. The changing immunological paradigm in coeliac disease. *Immunol Lett* 2016;105:127–39.
9. Noel N, Boufassa F, L'écureux C, et al. Elevated IP10 levels are associated with immune activation and low CD4+ T-cell counts in HIV controller patients. *AIDS* 2014;28:467–476.
10. Shaw JM, Hunt PW, Critchfield JW et al. Increased frequency of regulatory T cells accompanies increased immune activation in rectal mucosae of HIV-positive noncontrollers. *Journal of Virology* 2011;85:11422–11434.
11. Jenabian MA, Patel M, Kema I, et al. Distinct tryptophan catabolism and Th17/Treg balance in HIV progressors and elite controllers. *PLoS ONE* 2013;8:e78146.
12. Nowroozalizadeh S, Månsson F, da Silva Z, et al. Microbial translocation correlates with the severity of both HIV-1 and HIV-2 infections. *J Infect Dis* 2010;201:1150–4.
13. Tschaikowsky K, Hedwig-Geissing M, Schmidt J, et al. Lipopolysaccharide-binding protein for monitoring of postoperative sepsis: complementary to C-reactive protein or redundant?. *PLoS One* 2011;6:e23615.

14. Weiss J. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) and lipopolysaccharide-binding protein (LBP): structure, function and regulation in host defence against Gram-negative bacteria. *Biochem Soc Trans.* 2003;31:785–790.
15. Vassallo M, Mercié P, Cottalorda J, et al. The role of lipopolysaccharide as a marker of immune activation in HIV-1 infected patients: a systematic literature review. *Virology Journal.* 2012;9:174.
16. Chevalier MF, Petitjean G, Dunyach-Remy C, et al. The Th17/Treg ratio, IL-1RA and sCD14 levels in primary HIV infection predict the T-cell activation set point in the absence of systemic microbial translocation, *PLoS Pathogens* 2013;9:e1003453.
17. Romero-Sánchez M, González-Serna A, Pacheco YM, et al. Different biological significance of sCD14 and LPS in HIV-infection: importance of the immunovirology stage and association with HIV-disease progression markers. *Journal of Infection* 2012;65:431–438.
18. Jiang W, Lederman MM, Hunt P, 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;199: 1177-1185.
19. Hunt PW, Brenchley J, Sinclair E, et al. Relationship between T cell activation and CD4+ T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy, *Journal of Infectious Diseases* 2008;197:126–133.
20. Abad-Fernández M, Vallejo A, Hernández-Novoa B, et al. Correlation between different methods to measure microbial translocation and its association with immune activation in long-term suppressed HIV-1infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2013;64:149-53.
21. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med.* 2006;12:1365-1371.
22. Somsouk M, Estes JD, Deleage C, et al. Gut epithelial barrier and systemic inflammation during chronic HIV infection. *AIDS* 2015;29:43-51.
23. Mavigner M, Cazabat M, Dubois M, et al. Altered CD4+ T cell homing to the gut impairs mucosal immune reconstitution in treated HIV-infected individuals. *J Clin Invest.* 2012;122:62-69.
24. Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, et al. Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J Virol.* 2003;77:11708–17.

25. Hofer U and Speck RF. Disturbance of the gut-associated lymphoid tissue is associated with disease progression in chronic HIV infection. *Seminars in Immunopathology* 2009;31:257-266.
26. Sandler NG, Wand H, Law M, et al. Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV Infection. *J Infect Dis.* 2011;203:780–790.
27. Marchetti G, Cozzi-Lepri A, Merlini E, et al. Microbial translocation predicts disease progression of HIV-infected antiretroviral-naive patients with high CD4+ cell count. *AIDS* 2011;25:1385–94.
28. Reus S, Portilla J, Sanchez-Paya J, et al. Low-level HIV viremia is associated with microbial translocation and inflammation. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2013;129–34.
29. Redd AD, Gray RH and Quinn TC. Is microbial translocation a cause or consequence of HIV disease progression? *Journal of Infectious Diseases* 2011;203:744–745.
30. Kelesidis T, Kendall MA, Yang OO, et al. Biomarkers of microbial translocation and macrophage activation: association with progression of subclinical atherosclerosis in HIV-1 infection. *J Infect Dis.* 2012;206:1558–1567.
31. Blodget E, Shen C, Gupta SK, et al. Relationship between Microbial Translocation and Endothelial Function in HIV Infected Patients. *PloS ONE* 2012;7:e42624.
32. Manner IW, Baekken M, Kvale D et al. Markers of microbial translocation predict hypertension in HIV-infected individuals. *HIV Medicine* 2013;14:354-361.
33. Funderburg NT, Mayne E, Sieg SF, et al. Increased tissue factor expression on circulating monocytes in chronic HIV infection: relationship to in vivo coagulation and immune activation. *Blood* 2010;115:161–167.
34. Pandrea I, Cornell E, Wilson C, et al. Coagulation biomarkers predict disease progression in SIV-infected nonhuman primates. *Blood* 2012;120:1357–1366.
35. Marks MA, Rabkin CS, Engels EA, et al. Markers of microbial translocation and risk of AIDS-related lymphoma. *AIDS* 2013;27:469–474.
36. Ancuta P, Kamat A, Kunstman KJ, et al. Microbial translocation is associated with increased monocyte activation and dementia in AIDS patients. *PLoS One* 2008;3:e2516.
37. De Oca Arjona MM, Marquez M, Soto MJ, et al. Bacterial Translocation in HIV-Infected Patients With HCV Cirrhosis: Implication in Hemodynamic Alterations and Mortality. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2011;56:420–7.

38. Balagopal A, Philp FH, Astemborski J, et al. Human immunodeficiency virus-related microbial translocation and progression of hepatitis C: HIV, HCV, Microbial Translocation and Liver Disease. *Gastroenterology* 2008;135:226–233.
39. Sandler NG, Koh C, Roque A, et al. Host response to translocated microbial products predicts outcomes of patients with HBV or HCV infection. *Gastroenterology* 2011;141:1220–1230.
40. French AL, Evans CT, Agniel DM, et al. Microbial Translocation and Liver Disease Progression in Women Coinfected With HIV and Hepatitis C Virus. *J Infect Dis.* 2013;208:679–689.
41. Gazzola L, Tincati C, Bellistri GM, et al. The absence of CD4R T cell count recovery despite receipt of virologically suppressive highly active antiretroviral therapy: clinical risk, immunological gaps, and therapeutic options. *Clin Infect Dis* 2009;48:328–337.
42. Benveniste O, Flahault A, Sterkers G, et al. Mechanisms involved in the low-level regeneration of CD4+ cells in HIV-1-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy who have prolonged undetectable plasma viral loads. *J Infect Dis.* 2005;191:1670-1679.
43. Massanella M, Negro E, Perez-Alvarez N, et al. CD4 T-cell hyperactivation and susceptibility to cell death determine poor CD4 T-cell recovery during suppressive HAART. *AIDS* 2010;24:959–68.
44. Wallet MA, Rodriguez CA, Yin L, Saporta, et al. Microbial translocation induces persistent macrophage activation unrelated to HIV-1 levels or T-cell activation following therapy. *AIDS* 2010;24:1281–90.
45. Marchetti G, Bellistri GM, Borghi E, et al. Microbial translocation is associated with sustained failure in CD4+ T-cell reconstitution in HIV-infected patients on long-term highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2010;22:2035–8.
46. Merlini E, Bai F, Bellistri GM, et al. Evidence for polymicrobial flora translocating in peripheral blood of HIV-infected patients with poor immune response to antiretroviral therapy. *PLoS One* 2011;6:e18580.
47. Jiang W, Lederman MM, Hunt P, 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;199:1177-1185.
48. Piconi S, Trabattoni D, Gori A, et al. Immune activation, apoptosis, and Treg activity are associated with persistently reduced CD4+ T-cell counts during antiretroviral therapy. *AIDS* 2010;24:1991–2000.

49. Klatt NR, Funderburg NT and Brenchley JM. Microbial translocation, immune activation and HIV disease. *Trends Microbiol.* 2013;21:6–13.
50. Costello EK, Lauber CL, Knight R, et al. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* 2009;18:326:1694-7.
51. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003;361:512-9
52. Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *NATURE* 2010;464:59-65.
53. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *NATURE* 2011;473:174-80.
54. Manichanh C, Rigottier-Gois L, Pelletier E, et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 2006;55:205 -211.
55. Gorkiewicz G, Thallinger GG, Stocker G, et al. Alterations in the Colonic Microbiota in Response to Osmotic Diarrhea. *PLoS ONE* 2013;8:e55817.
56. Turnbaugh PJ, Mardis ER, et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *NATURE* 2006;444:1027-31.
57. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *NATURE* 2013;500:541-6.
58. Price LB, Liu CM, Engelthaler D, et al. Community Analysis of Chronic Wound Bacteria Using 16S rRNA Gene-Based Pyrosequencing: Impact of Diabetes and Antibiotics on Chronic Wound Microbiota. *PLoS ONE* 2009;4:e6462.
59. Qin J, Li Y, Cai Z, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *NATURE* 2012;490:55-60.
60. Zeng H, Lazarova DL, and Bordonaro M. Mechanisms linking dietary fiber, gut microbiota and colon cancer prevention. *World Journal of Gastrointestinal Oncology* 2014;6:41– 51.
61. Tran L, Greenwood-Van Meerveld B. Age-associated remodeling of the intestinal epithelial barrier. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.*2013;68:1045–1056.
62. Blaser M, Bork P, Fraser C, et al. The microbiome explored: recent insights and future challenges. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11:1–5.
63. Mutlu EA, Keshavarzian A, Losurdo J, et al. A compositional look at the human gastrointestinal microbiome and immune activation parameters in HIV infected subjects, *PLoSPathogens* 2014;10:IDe1003829.

64. Dillon SM, Lee EJ, Kotter CV, et al. An altered intestinal mucosal microbiome in HIV-1 infection is associated with mucosal and systemic immune activation and endotoxemia. *Mucosal Immunol.* 2014;7:983-94.
65. Dinh DM, Volpe GE, Duffalo C, et al. Intestinal microbiota, microbial translocation, and systemic inflammation in chronic HIV infection. *J Infect Dis.* 2015;211:19–27.
66. Ellis CL, Ma ZM, Mann SK, 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.
67. Gori A, Tincati C, Rizzardini G et al. Early impairment of gut function and gut flora supporting a role for alteration of gastrointestinal mucosa in human immunodeficiency virus pathogenesis. *Journal of Clinical Microbiology* 2008;46:757–758.
68. Perez-Santiago J, Gianella S, Massanella M, et al. Gut lactobacillales are associated with higher CD4 and less microbial translocation during HIV infection. *AIDS* 2013;27:1921–1931.
69. Vujkovic-Cvijin I, Dunham RM, Iwai S, et al. Dysbiosis of the gut microbiota is associated with HIV disease progression and tryptophan catabolism. *Science Translational Medicine* 2013;5:193ra91.
70. Lozupone CA, Rhodes ME, Neff CP, et al. HIV-induced alteration in gut microbiota: driving factors, consequences, and effects of antiretroviral therapy. *Gut Microbes* 2014;5:562–570.
71. Noguera-Julian M, Rocafort M, Guillén Y, et al. Gut Microbiota Linked to Sexual Preference and HIV Infection. *EBioMedicine* 2016;5:135-46.
72. Rajasuriar R, Khoury G, Kamarulzaman A, et al. Persistent immune activation in chronic HIV infection: do any interventions work? *AIDS* 2013;27:1199-208.
73. Assimakopoulos SF, Dimitropoulou D, Marangos M, et al. Intestinal barrier dysfunction in HIV infection: pathophysiology, clinical implications and potential therapies. *Infection* 2014;42:951-9.
74. Gori A, Rizzardini G, Van't Land B, et al. Specific prebiotics modulate gut microbiota and immune activation in HAART-naive HIV-infected adults: results of the “COPA” pilot randomized trial. *Mucosal Immunol. NATURE* 2011;4:554–563.
75. Heilpern D, Szilagyi A. Manipulation of intestinal microbial flora for therapeutic benefit in inflammatory bowel diseases: review of clinical trials of probiotics, prebiotics and synbiotics. *Rev Recent Clin Trials* 2008;3:167–184.

76. Mengheri E. Health, probiotics, and inflammation. *J Clin Gastroenterol*. 2008;42:S177–S178.
77. Dai C, Zhao DH, and Jiang M. VSL#3 probiotics regulate the intestinal epithelial barrier in vivo and in vitro via the p38 and ERK signaling pathways. *International Journal of Molecular Medicine* 2012;29:202–208.
78. Cunningham-Rundles S, Ahrné S, Johann-Liang R, et al. Effect of probiotic bacteria on microbial host defense, growth and immune function in human immunodeficiency virus type- 1 infection. *Nutrients* 2011;3:1042–1070.
79. Trois L, Cardoso EM, Miura E. Use of probiotics in HIV-infected children: a randomized double-blind controlled study. *J Trop Pediatr*. 2008;54:19–24.
80. Anukam KC, Osazuwa EO, Osadolor HB, et al. Yogurt containing probiotic lactobacillus rhamnosus GR-1 and L. reuteri RC-14 helps resolve moderate diarrhea and increases CD4 count in HIV/AIDS patients. *J Clin Gastroenterol*. 2008;42:239–243.
81. Hummelen R, Chagalucha J, Butamanya NL, et al. Effect of 25 weeks probiotic supplementation on immune function of HIV patients. *Gut Microbes* 2011;2:80-85.
82. Irvine SL, Hummelen R, Hekmat S. Probiotic yogurt consumption may improve gastrointestinal symptoms, productivity, and nutritional intake of people living with human immunodeficiency virus in Mwanza, Tanzania. *Nutr Res*. 2011;31:875–881.
83. Klatt NR, Canary LA, Sun X, et al. Probiotic/prebiotic supplementation of antiretrovirals improves gastrointestinal immunity in SIV-infected macaques, *The Journal of Clinical Investigation* 2013;123:903–907.
84. Yang OO, Kelesidis T, Cordova R, et al. Immunomodulation of antiretroviral drug-suppressed chronic HIV-1 infection in an oral probiotic double-blind placebo-controlled trial. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2014;30:988–995.
85. Ortiz AM, Klase ZA, DiNapoli SR, et al. IL-21 and probiotic therapy improve Th17 frequencies, microbial translocation, and microbiome in ARV-treated, SIV-infected macaques. *Mucosal Immunology* 2016;9:458–467. d'Ettorre G, Ceccarelli G, Giustini N, et al. Probiotics reduce inflammation in antiretroviral treated, HIV-infected individuals: Results of the “Probio-HIV” clinical trial. *PLoS One* 2015;10:137200.
86. Kelesidis T, Pothoulakis C. Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. *Therap Adv Gastroenterol*. 2012;5:111–125.
87. Zanello G, Meurens F, Berri M, et al. *Saccharomyces boulardii* effects on gastrointestinal diseases. *Curr Issues Mol Biol*. 2009;11:47–58.

88. McFarland LV. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World J Gastroenterol*. 2010;16:2202–2222.
89. Canonici A, Pellegrino E, Siret C, et al. *Saccharomyces boulardii* improves intestinal epithelial cell restitution by inhibiting avb5 Integrin activation state. *PLoS One* 2012;7:e45047.
90. Dalmasso G, Cottrez F, Imbert V, et al. *Saccharomyces boulardii* inhibits inflammatory bowel disease by trapping T cells in mesenteric lymph nodes. *Gastroenterology* 2006;131:1812–1825.
91. Thomas S, Przesdzing I, Metzke D, et al. *Saccharomyces boulardii* inhibits lipopolysaccharide-induced activation of human dendritic cells and T cell proliferation. *Clin Exp Immunol*. 2009;156:78–87.
92. Thomas S, Metzke D, Schmitz J, et al. Anti-inflammatory effects of *Saccharomyces boulardii* mediated by myeloid dendritic cells from patients with crohn's disease and ulcerative colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011;301:G1083–G1092.
93. Pothoulakis C. Review article: anti-inflammatory mechanisms of action of *Saccharomyces boulardii*. *Aliment Pharmacol Ther*. 2009;30:826–833.
94. Im E, Pothoulakis C. Recent advances in *Saccharomyces boulardii* research. *Gastroenterol Clin Biol*. 2010;34:S62–S70.
95. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Kirsch S, et al. Functional biostructure of colonic microbiota (central fermenting area, germinal stock area and separating mucus layer) in healthy subjects and patients with diarrhea treated with *Saccharomyces boulardii*. *Gastroenterol Clin Biol*. 2010;34 Suppl 1:S79-92.
96. Tincati C, Biasin M, Bandera A, et al. Early initiation of highly active antiretroviral therapy fails to reverse immunovirological abnormalities in gut-associated lymphoid tissue induced by acute HIV infection. *Antivir Ther*. 2009;14:321–330.
97. Nwosu FC, Avershina E, Wilson R, et al. Gut Microbiota in HIV Infection: Implication for Disease Progression and Management. *Gastroenterol Res Pract*. 2014;2014:803185.
98. Vyboh K, Jenabian MA, Mehraj V, et al. HIV and the gut microbiota, partners in crime: breaking the vicious cycle to unearth new therapeutic targets. *J Immunol Res*. 2015;2015:614127.
100. Kuller LH, Tracy R, Belloso W, et al. Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection. *PLoS Med*. 2008;5:e203.
101. Duprez DA, Neuhaus J, Kuller LH, et al. Inflammation, coagulation and cardiovascular disease in HIV-infected individuals. *PLoS One* 2012;7:e44454.

102. Miller H, Ferris R, Phelps BR. The effect of probiotics on CD4 counts among people living with HIV: A systematic review. *Benef Microbes*. 2016;7:345-51.
103. Van den Nieuwboer M, Brummer RJ, F. Guarner F, et al. The administration of probiotics and synbiotics in immune compromised adults: is it safe?. *Beneficial Microbes* 2015;6:3-17
104. Troseid M, Nowak P, Nyström J, et al. Elevated plasma levels of lipopolysaccharide and high mobility group box-1 protein are associated with high viral load in HIV-1 infection: reduction by 2-year antiretroviral therapy. *AIDS* 2010;24:1733–1737.
105. Vázquez-Castellanos JF, Serrano-Villar S, Latorre A, et al. Altered metabolism of gut microbiota contributes to chronic immune activation in HIV-infected individuals. *Mucosal Immunol*. 2015;8:760-72.
106. Vaziri ND, Wong J, Pahl M, et al. Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora. *Kidney Int*. 2013;83:308-15.
107. Ciubotaru I, Green SJ, Kukreja S, et al. Significant differences in fecal microbiota are associated with various stages of glucose tolerance in African American male veterans. *Transl Res*. 2015;166:401-11.
108. Moreno-Indias I, Sánchez-Alcoholado L, García-Fuentes E, et al. Insulin resistance is associated with specific gut microbiota in appendix samples from morbidly obese patients. *Am J Transl Res*. 2016;8:5672-5684.
109. Klase Z, Ortiz A, Deleage C, et al. Dysbiotic bacteria translocate in progressive SIV infection. *Mucosal Immunol*. 2015;8:1009-1020.
110. Williams B, Mirmonsef P, Boucher CA, et al. A Summary of The First HIV Microbiome Workshop 2015. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2016;32:935-941.
111. Monachese M, Cunningham-Rundles S, Diaz MA et al., Probiotics and prebiotics to combat enteric infections and HIV in the developing world: a consensus report, *Gut microbes* 2011;2:198–207.
112. Schunter M, Chu H, Hayes TL et al., Randomized pilot trial of a synbiotic dietary supplement in chronic HIV-1 infection, *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2012;12:84.
113. Cahn P, Ruxrungtham K, Gazzard B, et al. The Immunomodulatory Nutritional Intervention NR100157 Reduced CD4+ T-Cell Decline and Immune Activation: A 1-Year Multicenter Randomized Controlled Double-Blind Trial in HIV-Infected Persons Not Receiving Antiretroviral Therapy (The BITE Study). *Clin Infect Dis*. 2013;57:139–146.

114. Stiksrud B, Nowak P, Nwosu FC, et al. Reduced levels of D-dimer and changes in gut microbiota composition after probiotic intervention in HIV-infected individuals on stable ART. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2015;70:329-337.
115. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Schulz S, et al. Functional anatomy of the colonic bioreactor: Impact of antibiotics and *Saccharomyces boulardii* on bacterial composition in human fecal cylinders. *Syst Appl Microbiol.* 2016;39:67-75.