



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

**Dottorato di Ricerca in Malattie Infettive,
Microbiologia e Sanità Pubblica
XXXI CICLO**

**Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie
Infettive**

**Il metabolismo del triptofano in HIV-1:
ruolo dei probiotici nell'asse intestino-
cervello**

Tutors:

Prof. Vincenzo Vullo

Prof.ssa Gabriella d'Ettore

Dottorando:

Giuseppe Corano Scheri

Matricola 1243802

ANNO ACCADEMICO 2017-2018

INTRODUZIONE	3
STRUTTURA E MORFOLOGIA DEL VIRUS DELL'IMMUNODEFICENZA UMANA (HIV)...	5
Geni strutturali.....	8
Geni regolatori	10
Geni accessori.....	11
CICLO REPLICATIVO DI HIV-1	12
Adsorbimento e penetrazione	12
Scapsidamento	13
Retrotrascrizione.....	13
Integrazione	14
Espressione e regolazione dei geni virali.....	15
Assemblaggio, gemmazione e maturazione	15
Variabilità genetica.....	17
Trasmissione dell'infezione	18
STORIA CLINICA DELL'INFEZIONE.....	20
Infezione acuta o primaria	20
Infezione cronica	21
Fase sintomatica o di AIDS conclamato.....	21
HIV reservoir	22
TERAPIA E CONTROLLO	23
Terapia antiretrovirale	23
Resistenze ai farmaci.....	25
Vaccinoterapia	26
Immunoterapia	27
FUNZIONE E CONSERVAZIONE DELLA BARRIERA INTESTINALE.....	28
MICROBIOTA	29
RUOLO DEL MICROBIOTA.....	31
ASPETTI GENERALI DEI PROBIOTICI.....	32
HIV-Associated Neurocognitive Disorder (HAND) ed HIV.....	36
IDO-1 E IL METABOLISMO DEL TRIPTOFANO	37
IL VIRUS HIV NELL'INTESTINO E RUOLO DEI PROBIOTICI.....	38
SCOPO DELLO STUDIO	44
MATERIALI E METODI	45
Popolazione in studio	45

Disegno dello studio	46
Lavorazione dei campioni.....	46
Citometria a flusso	47
Isolamento DNA batterico da campioni fecali.....	47
Real-Time PCR	48
Saggio ELISA.....	48
Metaboliti fecali	49
Analisi virologica	49
Analisi statistica.....	49
RISULTATI	51
Popolazione studio.....	51
Tollerabilità del prodotto e sicurezza.....	51
Immunoattivazione	52
IFN γ mRNA.....	54
IDO-1 mRNA.....	55
Quantificazione del triptofano.....	57
Serotonina.....	58
Neopterina e infiammazione nel SNC	59
DISCUSSIONE	61
BIBLIOGRAFIA	65

INTRODUZIONE

Il virus dell'immunodeficienza umana (HIV, *Human Immunodeficiency Virus*) è l'agente responsabile della *sindrome da immunodeficienza acquisita* (AIDS), caratterizzata da un grave abbattimento della risposta cellulo-mediata dovuta alla perdita dei linfociti T. Dati epidemiologici recenti, dall'*UNAIDS World AIDS Day Report del 2015*(1), stimano che nel mondo ci siano circa 37 milioni di infetti e tra questi 2 milioni sono i nuovi casi individuati nel 2014, mentre i decessi registrati sono circa 1,2 milioni (Figura 1). Oggi circa 15.8 milioni di soggetti con infezione da HIV hanno la possibilità di accedere ad una terapia antiretrovirale di combinazione (cART), ma di questi solo 8 milioni fanno uso di terapie. Il virus fu scoperto nel 1983 dal Dott. Luc Montagnier insieme alla Dott.ssa Françoise Barré-Sinoussi e al Dott. Robert Gallo, con la conseguente vincita del Premio Nobel per la medicina nel 2008. Nonostante gli anni passati dalla scoperta del virus, ad oggi non esiste una cura o un vaccino in grado di portare a guarigione le persone affette da questa infezione o a prevenirne il contagio; questo ha portato negli anni, con l'aumento delle persone contagiate e della mortalità attribuita ad essa, la sindrome dell'AIDS al quarto posto tra le cause di morte. La malattia è trasmissibile per via parenterale, sessuale o materna. La regione nel mondo più colpita è l'Africa (2,3), questo è dovuto alla grave situazione di povertà e alla carenza igienico-sanitaria presente nel paese. Il problema africano non è da sottovalutare, infatti la continua crescita del numero di malati limita la possibilità di circoscrivere la malattia. Inoltre l'elevato numero di mutazioni determina un problema di farmaco resistenza dovuto al continuo instaurarsi di forme ricombinanti sconosciute. Naturalmente ciò non avviene in paesi sviluppati grazie alla maggiore ricchezza e alle condizioni sanitarie ma soprattutto grazie alla cART che ha notevolmente aumentato le aspettative di vita dei pazienti e ha trasformato l'AIDS da malattia mortale a patologia cronica.

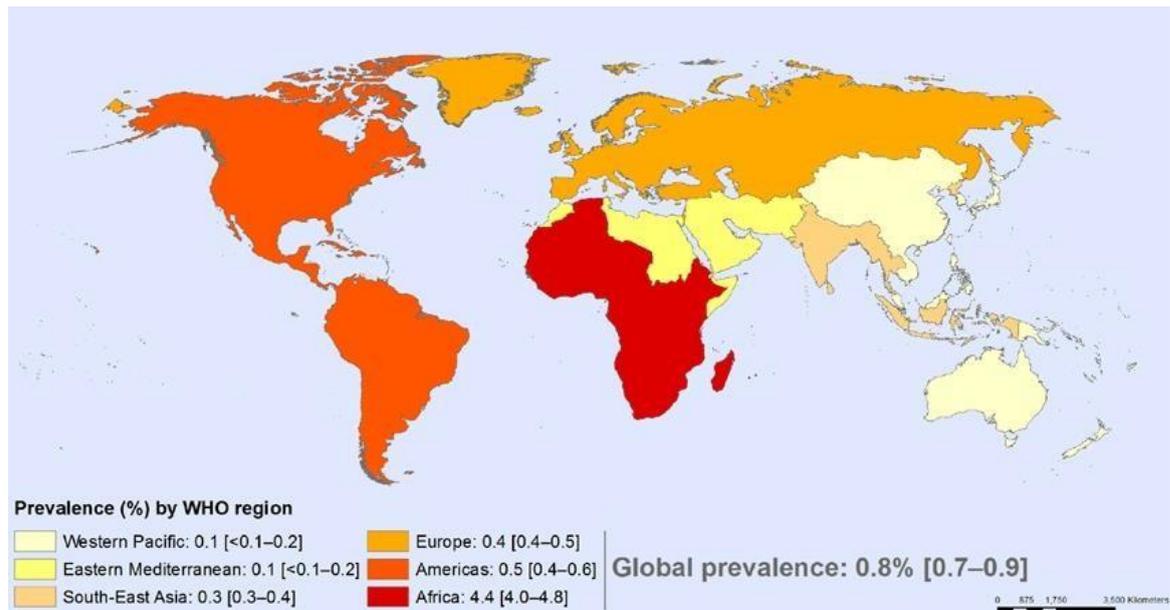


Figura 1: Prevalenza dell'infezione da HIV (WHO 2015).

Il virus HIV fa parte della famiglia *Retroviridae*, che comprende tre sottofamiglie: Oncovirinae, Spumavirinae e Lentivirinae. Gli Oncovirus potrebbero portare a una trasformazione neoplastica delle cellule infettate; gli Spumavirus sono stati isolati in pochi casi di patologia umana e la loro correlazione eziopatogenetica con eventuali malattie associate rimane poco chiara; i Lentivirus, di cui fa parte HIV, sono responsabili di infezioni di tipo cronico con lungo periodo di incubazione. I Retrovirus presentano un genoma costituito da due molecole di RNA monocatenario a polarità positiva rappresentando gli unici virus con genoma diploide ad RNA. Nei Retrovirus l'RNA è retrotrascritto in DNA, grazie all'enzima *trascrittasi inversa*; il DNA integrato in seguito nel genoma cellulare è sottoposto ai comuni processi cellulari di trascrizione e traduzione per esprimere i geni virali. La famiglia *Retroviridae* comprende diversi virus in grado di infettare i vertebrati e in grado di causare diversi tipi di emopatie, patologie immunitarie, tumori e malattie neuronali degenerative. I Lentivirus determinano l'immunosoppressione infettando direttamente le cellule del sistema immunitario, causando un abbattimento della risposta immunitaria, la formazione di immunocomplessi e la produzione di fattori di soppressione e di autoanticorpi. I Lentivirus sono virus rivestiti, con genoma ad RNA che fuoriescono dalla cellula infettata per gemmazione dalla membrana cellulare producendo virioni maturi di circa 100nm di diametro. Essi possono essere suddivisi in ulteriori due

gruppi in base al tropismo nei confronti delle diverse cellule dell'ospite (4): EIAV, OvLV e CAEV replicano prevalentemente in macrofagi, mentre HIV e SIV replicano in macrofagi e linfociti. Questo diverso tropismo cellulare è responsabile delle diverse manifestazioni patologiche dei due gruppi di Lentivirus. I Lentivirus hanno proprietà biologiche distinte da quelle degli altri Retrovirus. Essi, infatti, sono in grado di replicare in cellule non in divisione terminalmente differenziate e hanno un'elevata specie-specificità: infettano solo cellule che derivano dal loro ospite naturale o da specie strettamente correlate. Nonostante ci sia un lungo intervallo di tempo tra l'infezione iniziale e lo sviluppo della malattia, un'attiva replicazione virale avviene nelle prime settimane dopo l'infezione: durante questa fase acuta, i Lentivirus si diffondono nell'ospite. I primi siti di replicazione virale includono i linfonodi, la milza e il midollo osseo e questi tessuti funzionano come *reservoirs* per la distribuzione di monociti e linfociti infettati negli altri organi, tra cui il cervello e i polmoni, all'interno dei quali i monociti maturano in macrofagi e i linfociti vengono attivati. Ciò determina l'attivazione di fattori di trascrizione cellulari che regolano l'espressione dei geni virali e conseguentemente la produzione di nuovi virioni all'interno di questi tessuti. Tale capacità di rimanere latente è uno dei meccanismi utilizzati dai Lentivirus per eludere il sistema immunitario dell'ospite ed è una delle ragioni per cui le manifestazioni cliniche della patologia indotta dai Lentivirus necessita di mesi o addirittura anni per svilupparsi.

STRUTTURA E MORFOLOGIA DEL VIRUS DELL'IMMUNODEFICENZA UMANA (HIV)

Il virione maturo di HIV ha forma sferica con un diametro di 110 nm ed è rivestito da un envelope o pericapside (Figura 2). Questo è un doppio strato fosfolipidico non di natura virale, ma di origine cellulare ottenuto durante la gemmazione dalla cellula ospite; la fuoriuscita del virione con tale tecnica porta sulla sua superficie anche proteine cellulari (5). All'envelope sono legate le glicoproteine virali gp120 (SU) e gp41 (TM). La porzione C-terminale della gp120 lega l'estremità N-terminale della gp41 a formare degli

eterodimeri di forma triangolare che sporgono dalla superficie del pericapside come protuberanze chiamate "spike". Sulla superficie interna dell'envelope è adesa la matrice, una struttura proteica costituita dall'assemblaggio di diverse unità della proteina p17 disposte in maniera regolare. Ogni molecola di p17 viene miristilata, una molecola di acido miristico viene legata a residui di glicina presenti nella regione N-terminale della proteina. Tale modificazione post- traduzionale permette l'ancoraggio della p17 allo strato lipidico dell'envelope e garantisce un corretto inserimento delle glicoproteine nell'envelope durante le fasi tardive della replicazione garantendo stabilità strutturale (6). Il core o nucleocapside è la struttura più interna della particella densa agli elettroni. Ha una forma troncoconica ed è costituito dalla proteina p24 (CA). Il ruolo di questa struttura è di proteggere il genoma virale costituito da due filamenti di RNA a polarità positiva a cui sono associate due proteine: la proteina p6 e p7 (7). Inoltre, all'interno del nucleocapside sono presenti anche i componenti necessari per la replicazione del virus e per la maturazione dei virioni quali: la proteasi (PR), la trascrittasi inversa (RT), l'RNasi H e l'integrasi (IN), tutte codificate dal gene pol e alcune molecole di tRNA necessarie per l'inizio della replicazione.

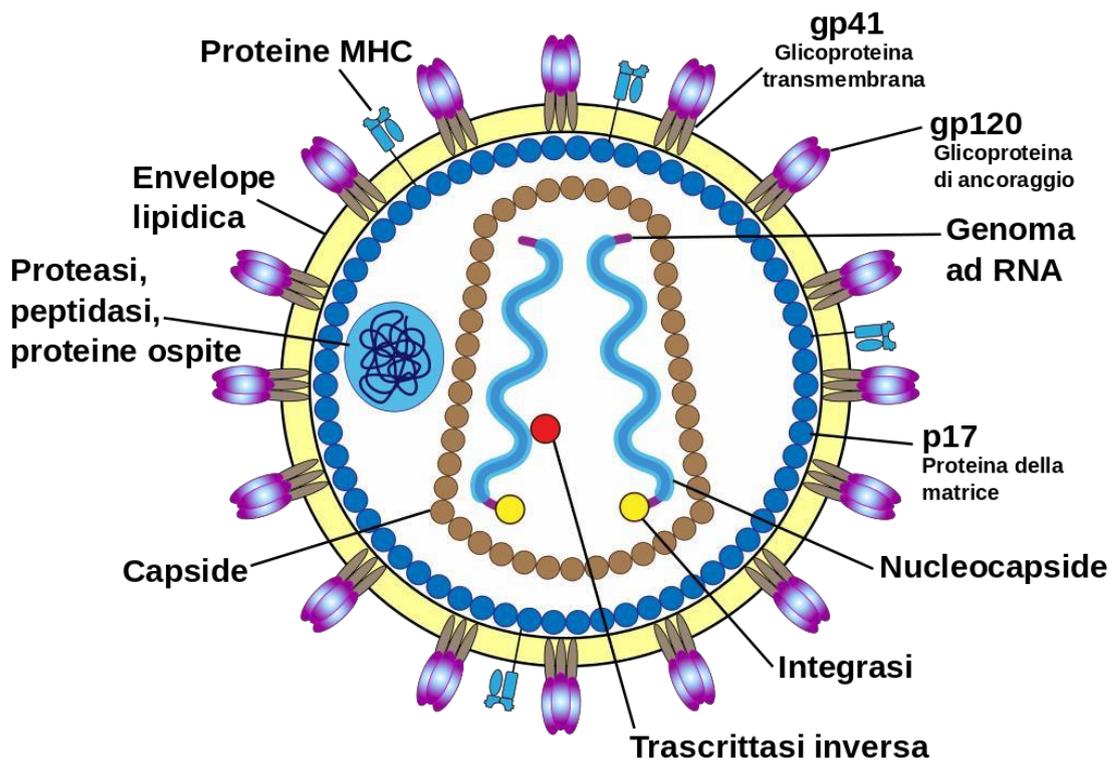


Figura 2: Struttura e morfologia proteica virale

Il genoma di HIV-1 è costituito da due molecole di RNA tra loro uguali a singola catena a polarità positiva (Figura 3). Ogni filamento è formato da circa 9200 nucleotidi e presenta all'estremità 3' una coda di poli-A e all'estremità 5' un Cap, forniti al genoma dal macchinario biosintetico cellulare. Le due catene di RNA sono legate tra loro a livello delle DIS (Dimer Initiation Site), sequenze complementari situate al 5'. Sono presenti LTR (Long Terminal Repeat) agli estremi, due sequenze contenenti elementi regolatori dell'espressione genica. In esse infatti si ritrovano regioni di legame per fattori sia di origine virale che cellulare i quali possono così aumentare o inibire il livello di trascrizione del genoma. Nei LTR (8) si ritrovano siti di poliadenilazione, per il legame di fattori di trascrizione come SP1 e NF- κ B, la sequenza regolatrice TATA, la sequenza di transattivazione, dove si va a legare la proteina Tat, e anche zone con elementi regolatori inibenti sequenze non codificanti e altamente conservate che possiedono informazioni fondamentali per l'integrazione del DNA virale nel genoma cellulare e per la sua trascrizione.

In HIV ci sono tre geni ritenuti principali: *gag* (group-specific antigen) codificante proteine strutturali, *pol* (polymerase) che codifica per gli enzimi virali ed *env* (envelope) che codifica per le proteine dell'envelope. Oltre a questi geni presenti in tutti i Retrovirus, HIV-1 ha nel suo genoma anche i geni regolatori ed accessori: *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu*.

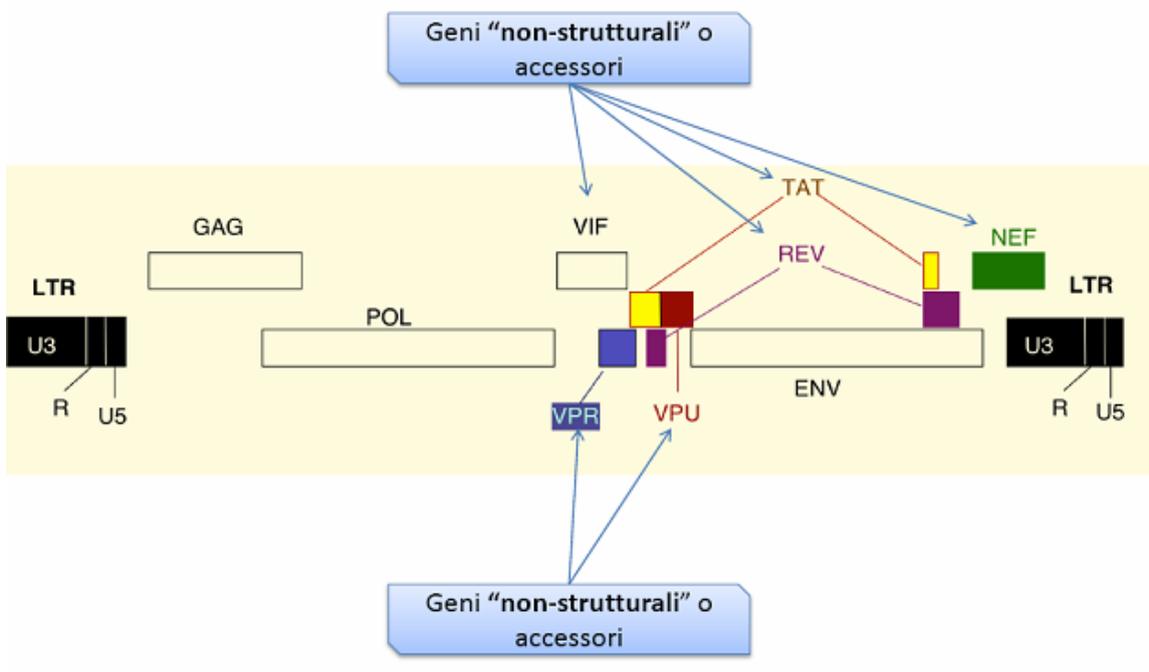


Figura 3: Organizzazione genomica del virus HIV

Geni strutturali

I geni *gag*, *pol* ed *env* sono tradotti in poliproteine e sono successivamente terminalmente strutturate da proteasi virali o cellulari.

Il gene *gag* porta alla traduzione di un precursore con un peso molecolare di 55KDa che successivamente, grazie alle proteasi di origine virale, viene scissa in tre importanti proteine strutturali del virus che sono:

- **p24** (CA) componente capsidico con funzione protettiva e con azioni durante le fasi precoci e tardive del ciclo di replicazione;

- **p17** (MA) fa parte della matrice del virione con funzione nell'assemblaggio dopo la traduzione delle proteine derivate da *env* (9);
- **p15** (NC) scissa in p6 e p7 che collaborano in ordine al rilascio del virus all'esterno della cellula e all'entrata del genoma virale nella molecola preformata.

Il gene *pol* è importante poiché è lui che dopo la formazione della poliproteina porta alla formazione dell'apparato enzimatico proprio del virus costituito da:

- **proteasi** (PR), di 99 amminoacidi, si genera in seguito ad un processo autocatalitico e nella forma matura e attiva è costituita da un dimero responsabile dei tagli proteolitici che portano alla maturazione dei precursori Gag e Gag-Pol; enzima indispensabile per HIV-1 in quanto è stato dimostrato che la sua mancanza porta a virioni non infettanti a causa della presenza di poliproteine non scisse nelle forme attive ed è per questo che nelle terapie sono presenti inibitori delle proteasi che hanno rappresentato una scoperta a livello farmacologico molto importante data la caratteristica di colpire enzimi che non hanno il tasso di mutazione di altri componenti di HIV e che quindi non possono formare farmaco resistenza;
- **trascrittasi inversa** (RT), un eterodimero costituito dalle subunità p51 e p66, è una DNA polimerasi–RNA dipendente che utilizza come templatato un doppio strand di RNA (formato dal genoma virale e dal tRNA^{Lys} complementare alla sequenza PBS al 5' dell'RNA) e genera un ibrido RNA/DNA; l'enzima ha anche attività di RNasiH che degrada l'RNA dall'ibrido, in modo da permettere la formazione di un doppio filamento di DNA (DNA provirale); anche per la trascrittasi inversa sono stati studiati e approvati inibitori di tale enzima essenziale al virus per la propria retrotrascrizione genomica;
- **integrasi** (IN), responsabile dell'integrazione del genoma di HIV-1 all'interno del genoma cellulare, catalizza sia il taglio che la congiunzione degli acidi nucleici (10).

Il gene *env* viene tradotto in una poliproteina altamente glicosilata, la gp161, a sua volta scissa dalla proteasi virale in due glicoproteine necessarie per l'infezione:

- **gp120** (SU) si colloca sulla superficie dell'envelope ed ha una caratteristica molto importante che è l'alta variabilità nei diversi ceppi di HIV, ma anche la presenza di

regioni costanti responsabili del riconoscimento del recettore CD4 presente su linfociti T CD4+, monociti, macrofagi e cellule dendritiche.

- **gp41** (TM) proteina transmembrana legata a gp120, tramite legami non covalenti che consentono la formazione di un eterodimero, implicata nella fusione del pericapside con la membrana plasmatica della cellula ospite.

Geni regolatori

Il virus HIV-1 ha nel suo genoma i geni regolatori:

- **Tat** (Trans Activator of Transcription), composta da due esoni che si sovrappongono in parte al gene *rev* e al gene *env*, la proteina Tat è un transattivatore e amplifica l'espressione di tutti i geni virali aumentando l'efficienza della RNA polimerasi II della cellula. Una volta sintetizzata Tat rientra nel nucleo e lega la sequenza TAR presente nell'LTR al 5' dell'RNA; oltre a ciò Tat, quando viene rilasciata dalle cellule che hanno subito l'infezione, può indurre il rilascio di segnali che portano all'attivazione di fattori di trascrizione;
- **Rev** (Regulator of Virion Expression) porta all'espressione di una proteina di 20 KDa, alla trascrizione dei geni strutturali dopo la fase iniziale in cui prevalgono mRNA che codificano per proteine regolatorie, vi è una fase in cui i valori di Rev raggiungono una determinata soglia che porta all'attivazione dei geni strutturali e, infine, stabilizza gli mRNA ad alto Pm per poi trasportarli attraverso la membrana nucleare, legandosi alla sequenza RRE (Rev Responsive Element) al 3' del trascritto; si può dire che Rev induca la sintesi selettiva delle proteine del virione;
- **Nef** (Negative Expression Regulatory Factor) codifica per una fosfoproteina miristilata di 27 KDa, Nef down-regola l'espressione del CD4 e dell'MHC-I sulla superficie cellulare e in questo modo facilita la capacità delle cellule di sopportare la replicazione virale; questo sistema impedisce il sequestro dei virioni maturi da parte del CD4 della cellula ospite (prevenendo così la superinfezione) e protegge la cellula infettata dal riconoscimento da parte dei linfociti T citotossici (11,12).

Geni accessori

All'interno del genoma del virus HIV sono presenti dei geni definiti accessori:

- **Vpr** è una proteina che viene inclusa nel virione maturo ed induce l'arresto delle cellule infettate in G2; regola il trasporto nucleare del complesso di pre- integrazione ed aumenta la replicazione nelle cellule non in divisione;
- **Vif** previene l'inattivazione dell'HIV inibendo la proteina umana APOBEC (che può tagliare i primi trascritti dell'HIV), il fattore più importante dell'immunità innata coinvolto nella resistenza all'infezione attraverso la deaminazione della citidina del DNA provirale (13,14);
- **Vpu**, presente solo in HIV-1 ma non HIV-2 e SIV, ha un dominio trans membrana ed ha la capacità di indurre la degradazione del CD4 in modo ubiquitina- dipendente; quest'attività permetterebbe un rilascio più efficiente delle particelle virali, in quanto si è visto che le molecole di CD4 appena sintetizzate possono legarsi ad Env appena sintetizzato nel reticolo endoplasmatico, rendendolo così non disponibile per la formazione del virione (15).

CICLO REPLICATIVO DI HIV-1

Il ciclo replicativo di HIV-1 può essere suddiviso in varie fasi (Figura 4): assorbimento e penetrazione, scapsidamento, retrotrascrizione e integrazione, espressione e regolazione dei geni virali, assemblaggio, gemmazione e maturazione.

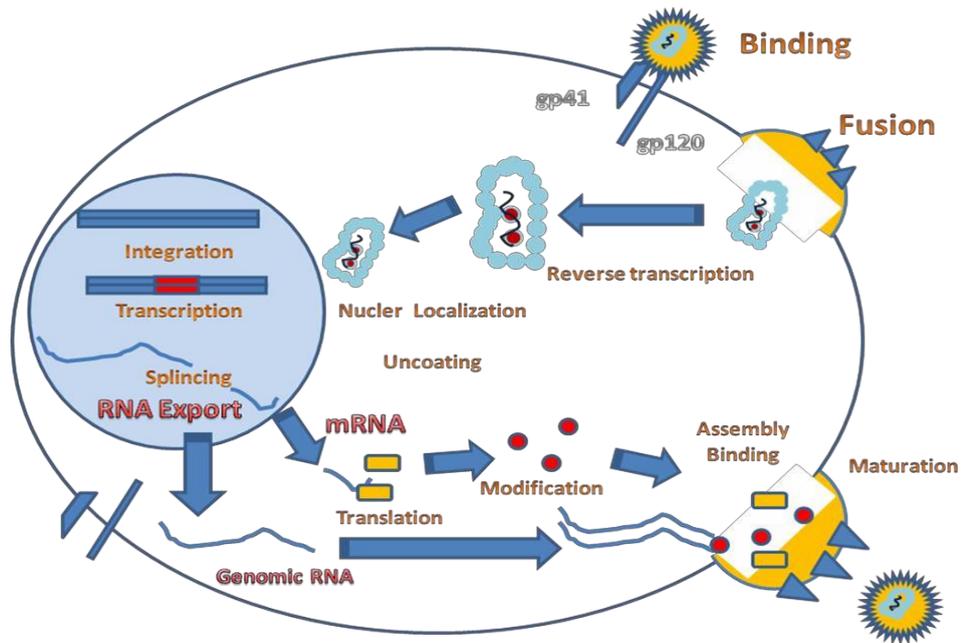


Figura 4: Ciclo replicativo del virus HIV

Adsorbimento e penetrazione

Il primo evento è il riconoscimento delle cellule target da parte del virus attraverso l'interazione tra la glicoproteina virale gp120 e il recettore cellulare CD4 che ha il ruolo di riconoscere l'antigene attraverso le proteine del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (MHC II) ed è localizzato sulla superficie dei linfociti T helper, sulle cellule dendritiche, sulle cellule della linea monocito-macrofagica (incluse le cellule della microglia del sistema nervoso), (Figura 5). Successivamente al legame tra la gp120 e il CD4, la glicoproteina inizia un cambiamento conformazionale che porta all'esposizione dei siti che determinano il legame con i corecettori essenziali al virus per poter entrare nella cellula ospite. Questi appartengono alla famiglia dei recettori per le chemochine: in particolare,

CCR5 lega le β -chemochine ed è utilizzato da ceppi di HIV-1 macrofago-tropici (M-tropici); CXCR4 ha come ligandi naturali le α -chemochine ed è specifico per i ceppi di HIV-1 linfotropici (T-tropici). Il CD4/gp120/corecettore induce un ulteriore cambiamento di conformazione nella glicoproteina virale che porta all'esposizione del peptide di fusione, presente all'estremità N-terminale della gp41 e la sua introduzione nella membrana cellulare. Questi eventi, dunque, consentono la fusione dell'envelope virale con la membrana cellulare e l'ingresso del core virale nel citoplasma.

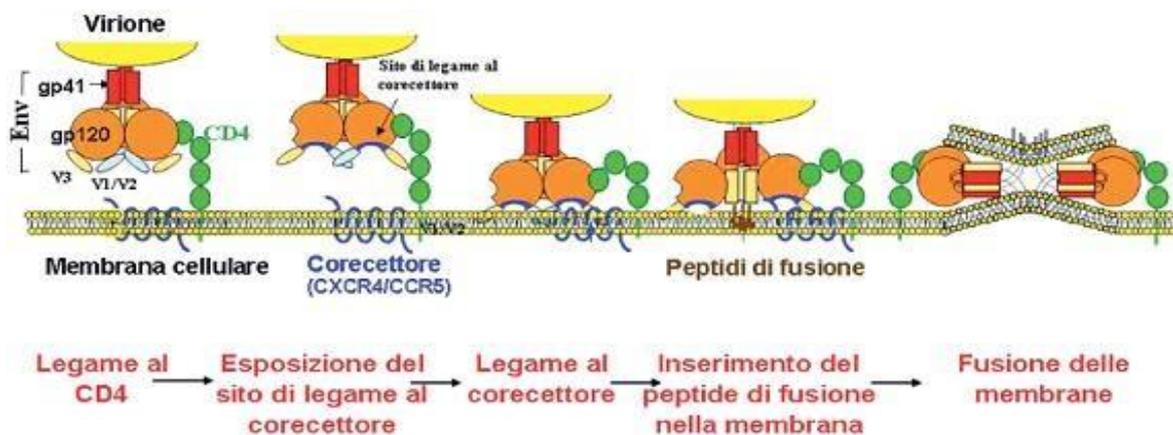


Figura 5: Meccanismo di legame e fusione del virus HIV

Scapsidamento

Il meccanismo ad oggi non è completamente noto ma esperimenti di mutagenesi hanno identificato nella proteina p24 la possibile responsabile. Infatti, aumentando la stabilità della proteina si impedisce l'attività della retrotrascrittasi (16). Inoltre è stato ipotizzato che la presenza di p24 nel citoplasma, dopo l'evento di fusione, destabilizzi l'organizzazione del core del virione e promuova lo scapsidamento (17).

Retrotrascrizione

Una volta disassemblato il *core*, il genoma virale è predisposto per essere retrotrascritto da parte della Trascrittasi Inversa (RT) del virus presente nel virione. RT è una DNA polimerasi RNA-dipendente e come tale polimerizza soltanto in direzione 5'→3'. Per

l'inizio della retro-trascrizione di HIV-1 l'enzima necessita di un innesco che è fornito dal tRNA di origine cellulare, quello della lisina (Lys), che si appaia perfettamente alla sequenza PBS localizzata a valle della regione R-U5 al 5' del genoma virale. Avviene quindi la sintesi del primo filamento di DNA, con la formazione di un ibrido RNA/DNA, costituito dalla catena di RNA originale (positiva) e dalla catena complementare di DNA (negativa). Tale ibrido è il substrato dell'attività di RNasiH (svolta dall'RT stessa) che degrada l'RNA, liberando l'ssDNA. La degradazione avviene solo parzialmente, evitando le regioni PPT ricche in purine che servono da innesco per la sintesi del DNA a polarità positiva. In seguito, l'RNasiH rimuove il tRNA ancora legato, rilasciando la molecola bicatenaria lineare di DNA. Questo meccanismo replicativo consente la produzione di copie della sequenza PBS, utilizzata per continuare la sintesi del DNA fino alle regioni U3-R-U5 e sintetizzare le sequenze LTR. Si ottiene, quindi, il DNA provirale completo che costituisce il complesso di preintegrazione (PIC) unitamente all'integrasi, alla p17 e alla vpr e a proteine cellulari. Il PIC viene trasportato verso il nucleo attraverso un meccanismo di trasporto attivo.

Integrazione

Una volta all'interno del nucleo, il genoma virale viene integrato nel genoma cellulare ad opera dell'enzima virale integrasi. L'integrazione è un processo fondamentale nel ciclo vitale dei retrovirus: il DNA virale deve integrarsi ed utilizzare l'apparato cellulare di trascrizione e replicazione (18–20). L'integrasi riconosce in modo altamente specifico le due LTR, crea due tagli sfalsati nel DNA cellulare e vi inserisce il dna provirale. Per un'integrazione efficiente sono coinvolte anche proteine cellulari. Il genoma virale integrato prende il nome di provirus. Il provirus si può integrare in molteplici copie e in molte localizzazioni cromosomiche diverse. Sembra siano preferiti i geni attivi anche se regioni di eterocromatina siano spesso siti di integrazione. Il provirus viene trascritto quasi immediatamente in cellule che si replicano attivamente ma alcune cellule T (memoria) infettate entrano in uno stato di quiescenza e, di conseguenza, il genoma entra in uno stato latente, trascrizionalmente inattivo, fino a quando il linfocita viene attivato (dall'antigene o da altri stimoli). Linfociti T quiescenti, latentemente infettati, costituiscono il reservoir virale non raggiungibile dal sistema immune dell'ospite né dai farmaci (che

colpiscono solo il virus in attiva replicazione (21).

Espressione e regolazione dei geni virali

Il provirus viene trascritto dall'estremità 5' fino all'estremità 3' dalla DNA polimerasi II cellulare per produrre RNA precursori della stessa lunghezza del genoma. L'espressione del provirus richiede l'intervento di fattori trascrizionali cellulari (tra cui NF-AT, NF-kB, Sp1, AP-1) che devono essere attivati da fattori cellulari e porta alla formazione di tre classi di trascritti: RNA genomico per la progenie virale, RNA messaggero che sarà tradotto nel citoplasma per dare origine alle proteine Gag e Gag-Pol, e 30 RNA messaggeri che alternativamente saranno *spliced* e tradotti nel citoplasma per produrre proteine di *env* e proteine accessorie. Inizialmente, in assenza del transattivatore tat, il livello di trascrizione è basso. Gli RNA precursori vengono trasportati nel citoplasma con un meccanismo rev-indipendente ma prima del trasporto vengono eliminati gli introni dai trascritti multiply-spliced che vengono tradotti per produrre le proteine regolatorie Tat, Rev e Nef che ritornano poi nel nucleo. Con il procedere della trascrizione i livelli di Tat e Rev aumentano e gli RNA precursori vengono trasportati al citoplasma con un meccanismo rev-dipendente che non prevede lo *splicing* prima del trasporto. In questa fase vengono tradotti nel citoplasma mRNA *unspliced* e *singly spliced* per le proteine Gag, Pol, Env, Vpr, Vif e Vpu.

Assemblaggio, gemmazione e maturazione

Alcune evidenze sperimentali suggeriscono che l'HIV-1 si assembli e gemmi a livello dei microdomini della membrana plasmatica denominati *lipid rafts* arricchiti di sfingolipidi e colesterolo. La poliproteina Gag è importante nei processi di assemblaggio e gemmazione mentre i prodotti di processamento derivati sono importanti per l'infettività virale. Il precursore Gag contiene quattro regioni conservate che svolgono funzioni distinte durante l'assemblaggio:

- dominio matrice (MA), localizzato all'estremità amminotermine, ha il compito di dirigere la poliproteina Gag alla membrana plasmatica della cellula ospite, di mediarne l'associazione ad essa e di reclutare le glicoproteine dell'*envelope* nei virioni;

- dominio capsidico (CA), in posizione centrale nel precursore Gag, riveste un ruolo importante nel promuovere le interazioni Gag-Gag durante l'assemblaggio; CA sembra essere coinvolto anche nelle interazioni tra Gag e il citoscheletro della cellula ospite per permettere il trasporto anterogrado degli intermedi di assemblaggio virale alla membrana cellulare;
- dominio nucleocapsidico (NC), presente all'estremità carbossiterminale della poliproteina Gag, è un dominio molto conservato perché NC risulta critico durante la replicazione retrovirale in quanto è coinvolto in molteplici aspetti: i) insieme a CA, media le interazioni Gag-Gag durante l'assemblaggio; ii) permette la selettiva incorporazione del genoma nei virioni, mediante il riconoscimento del segnale di *packaging* Ψ sull'RNA virale; ed iii) ha un ruolo nelle fasi tardive del ciclo replicativo virale di HIV-1 e, in particolare, negli eventi di gemmazione e di rilascio dei virioni dalla membrana plasmatica della cellula ospite (22,23);
- Peptide p6, situato all'estremità carbossiterminale del precursore, è essenziale per il rilascio dei virioni assemblati dalle cellule infettate mediante l'interazione con le proteine citoplasmatiche del complesso ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*) per terminare la polimerizzazione di Gag.

I virus neoformati che gemmano dalla membrana della cellula ospite si trovano ancora in uno stato immaturo. La maturazione virale inizia durante (o immediatamente dopo) la gemmazione ed è guidata dalla proteasi virale che idrolizza la poliproteina Gag-Pro- Pol dando origine ai prodotti proteici finali: MA, CA, NC e p6. Le proteine processate si riarrangiano per creare il virione maturo con il capsidico che tende ad acquisire la caratteristica forma conica. Il virione così formato è pronto ad infettare una nuova cellula.

Variabilità genetica

Ad oggi, sono noti due sierotipi di HIV: HIV-1 e HIV-2 (isolato nel 1986 da pazienti originari dell'Africa Occidentale). Il primo dei due è prevalentemente localizzato in Europa, America e Africa centrale. HIV-2, invece, si trova per lo più in Africa occidentale e Asia e determina una sindrome clinicamente più moderata rispetto al ceppo precedente.

Inoltre, HIV-1 comprende tre principali gruppi (24,25): gruppo M (Main o Major), gruppo O (Outlier) e gruppo N (Non M, Non O o New) ed un solo caso di HIV-P. I gruppi N e O sono filogeneticamente distanti dal gruppo M e derivano da successive introduzioni del virus che infetta gli scimpanzé SIV_{CPZ} nella popolazione umana. Il gruppo O contiene circa 30 sottotipi, ritrovati soprattutto in alcuni Paesi dell'Africa Occidentale come il Cameroon. Ha una prevalenza inferiore al gruppo M, ma maggiore del gruppo N. Questo, infatti, è estremamente raro ed è stato isolato per la prima volta nel 1998 in Cameroon. Il gruppo M è responsabile della maggior parte delle infezioni nel mondo e comprende 11 sottotipi o clades designati con le lettere da A a K (25–27). Tali clades hanno una diversa distribuzione geografica: il sottotipo A è diffuso in Africa Centrale e Occidentale, il sottotipo B in America e in Europa, il clade C è presente in Asia, in Africa Orientale e in Africa Meridionale. Sebbene discendano da un antenato comune, ogni clade presenta un proprio comportamento biologico ed è geneticamente diverso dagli altri. Nel corso delle epidemie, a causa di frequenti superinfezioni, due virus appartenenti a due sottotipi diversi possono incontrarsi all'interno della cellula infettata e ricombinare attraverso il *Drift Antigenico* il proprio materiale genetico per creare nuovi virus ibridi che prendono il nome di "forme circolari ricombinanti" o CRFs. Questi possono diventare predominanti dal punto di vista epidemiologico a causa della loro maggiore capacità replicativa e/o per una maggiore capacità di adattamento dell'ospite. I maggiori CRF sono costituiti da CRF02_AG, prevalente in Africa occidentale, CRF01_AE, che predomina in Asia sud-orientale, e CRF07_BC e CRF08_BC, prevalenti in Cina.

Trasmissione dell'infezione

Il virus si trasmette principalmente attraverso tre vie:

- 1) il contatto sessuale, la via più frequente di trasmissione, sia tra partners omosessuali che eterosessuali; la trasmissione del virus può avvenire con rapporti sessuali, in quanto HIV è contenuto nel liquido seminale e nelle secrezioni cervico-vaginali femminili e può quindi contagiare le cellule suscettibili invadendo l'organismo attraverso lo strato mucoso della vagina, della vulva, del pene, del retto e del cavo orale o raggiungendo direttamente le cellule bersaglio attraverso lesioni delle mucose;
- 2) parenterale, cioè attraverso sangue infetto; possono, quindi, veicolare l'infezione le trasfusioni di sangue o di emoderivati infetti, l'inoculazione di piccole quantità di sangue contaminato attraverso lo scambio di siringhe contaminate tra tossicodipendenti o per contatto accidentale con aghi o altri strumenti attraverso lesioni percutanee (per lo più in ambito medico-laboratoristico);
- 3) materno-fetale (verticale), può avvenire durante la gravidanza per passaggio transplacentare, durante il periodo perinatale, evento più frequente, o con l'allattamento al seno (Figura 6).

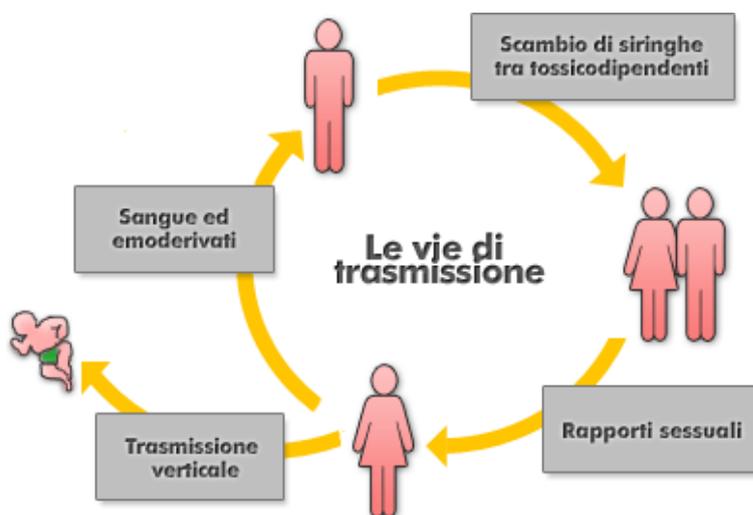


Figura 6: Modalità di trasmissione dell'infezione HIV

Pur essendo il virus presente nella saliva e nelle lacrime, non è stata segnalata fino ad oggi alcuna trasmissione dell'infezione in soggetti esposti soltanto a questi liquidi biologici.

La carica virale è il più importante fattore predittivo dell'infezione: la probabilità di contagio è massima nella fase acuta dell'infezione, si riduce nei mesi successivi per aumentare di nuovo negli stadi terminali della malattia (28).

Dati epidemiologici indicano che la coinfezione con altri agenti patogeni a trasmissione sessuale e la presenza di lesioni genitali aumentino il rischio di trasmissione dell'infezione. Infatti, lesioni e processi infiammatori a carico del tratto genitale favoriscono la distruzione della barriera mucosale ed aumentano il numero di cellule bersaglio di HIV, favorendo la penetrazione del virus.

La seconda via di trasmissione, in ordine di frequenza, è l'inoculo di sangue infetto o di derivati ematici. Nel caso di inoculazione di sangue infetto la probabilità di trasmissione è altissima (90%), ma questo rischio è stato di fatto eliminato, nei paesi industrializzati, si è notevolmente ridotta dopo l'introduzione nel 1985 del test di screening anticorpale per HIV (29) effettuato sul sangue donato. Rimane un problema aperto, invece, in quei paesi in cui i sistemi sanitari soffrono di scarso controllo, come accade nei paesi del Terzo Mondo. Il rischio di acquisire l'infezione in seguito ad una lesione percutanea è minore con gli aghi pieni, come quelli da sutura, rispetto agli aghi cavi, come quelli utilizzati per le iniezioni. Per tale motivo, in quest'ultimo caso, sono interessati principalmente i tossicodipendenti e questa via di trasmissione rimane non infrequente.

Per quanto riguarda la trasmissione perinatale, causa della maggior parte dei casi in età pediatrica, il rischio di contagio dipende dalla carica virale materna. Oltre alla viremia materna, anche lesioni della barriera emato-placentare possono aumentare il rischio di trasmissione verticale dell'infezione.

La via materno fetale è fonte di contagio soprattutto nei paesi in via di sviluppo (35% di probabilità), ove nella maggior parte dei casi nessun provvedimento sanitario è messo in atto al fine di ridurre la probabilità di trasmissione materno-fetale dell'infezione. Nei paesi come quelli europei, in cui la madre venga sottoposta a terapia cART durante la gravidanza, il parto sia cesareo e l'allattamento sia artificiale o naturale, secondo le più recenti linee guida, il rischio di trasmissione si è ridotto a circa l'1%.

STORIA CLINICA DELL'INFEZIONE

L'infezione da HIV, nella maggioranza dei casi, progredisce secondo un andamento caratterizzato essenzialmente da tre fasi distinte e include una fase di infezione primaria, con una sindrome acuta di gravità variabile, un periodo prolungato di latenza clinica e uno stadio finale di malattia caratterizzato da un aumento della suscettibilità alle infezioni opportunistiche e alle malattie neoplastiche (Figura 7).

Tutto il processo si svolge, senza un'adeguata terapia cART, nell'arco di 7 -10 anni e porta alla morte del soggetto. A questo quadro fanno eccezione i Long Term Non Progressors (LTNP) che mantengono lungo il decorso della malattia una percentuale di cellule CD4+ nella norma e bassi livelli di RNA virale nel plasma.

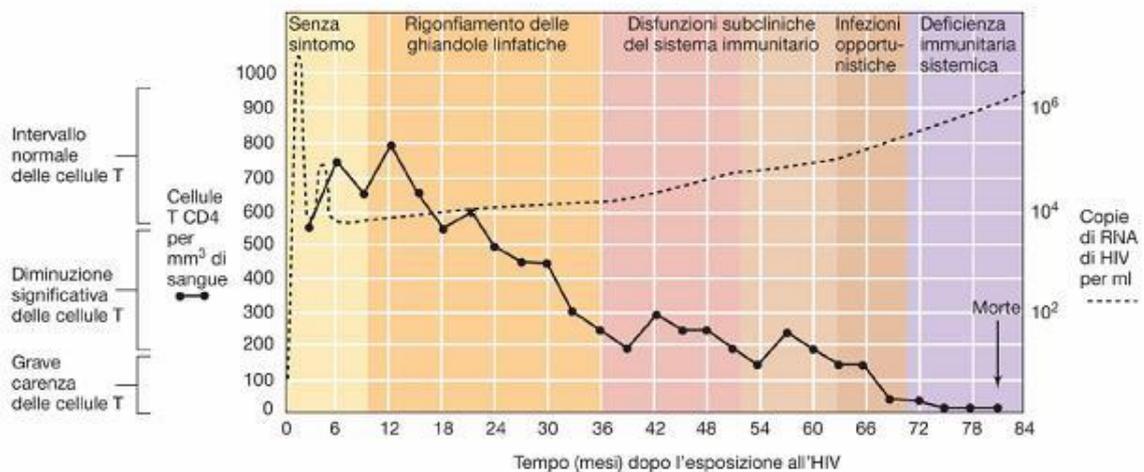


Figura 7: Decorso clinico dell'infezione

Infezione acuta o primaria

L'infezione acuta o primaria è il periodo immediatamente successivo al contagio ed è caratterizzato da una abbondante replicazione virale associata ad elevati livelli di virus nel plasma (viremia plasmatica $>10^6$ copie di HIV-RNA/ml) che sarebbe responsabile della disseminazione del virus a livello degli organi linfoidi (soprattutto nei linfonodi, ma anche nella milza, tonsille e tessuto linfoide, che sono i tessuti più ricchi in linfociti CD4+). Questa disseminazione avviene ancor prima della risposta anticorpale, che si attiva

alcune settimane dopo l'infezione (1 settimana-3 mesi), perciò tale intervallo è detto "periodo finestra", mentre la comparsa degli anticorpi è detta "sierconversione". In seguito ad un'efficace risposta immunitaria la viremia nel sangue si abbassa drasticamente; durante la fase acuta si assiste inoltre ad un calo sistemico e drastico dei linfociti CD4+, che però è solo transitorio, poiché si verifica una normalizzazione dei valori una volta attivata la risposta anticorpale.

L'infezione acuta decorre spesso in modo asintomatico oppure può tradursi, entro 2-6 settimane dal contagio, in sintomi simili a quelli di una sindrome influenzale o mononucleosica: febbre, malessere, ingrossamento dei linfonodi, stanchezza.

Infezione cronica

Lo sviluppo della risposta immunitaria specifica e la riduzione della viremia nel sangue periferico segnano il passaggio dalla fase acuta a quella cronica, clinicamente latente, caratterizzata dalla mancanza di sintomi. La durata della fase asintomatica può essere variabile ed è legata alla gravità dell'infezione primaria, alle caratteristiche dei virus infettanti, allo stato di immunità dell'ospite e all'uso di terapie antiretrovirali. Questa fase, clinicamente latente, può durare parecchi anni ma non corrisponde ad una latenza biologica in quanto la replicazione virale continua negli organi linfoidi. In questa fase si assiste inoltre a una progressiva diminuzione del numero di linfociti CD4+ circolanti e alla comparsa di difetti funzionali a carico sia dei linfociti CD4+ che di quelli CD8+ e dei monociti e dei macrofagi, a cui si associa un progressivo deterioramento del sistema immunitario.

Fase sintomatica o di AIDS conclamato

La progressiva immunodeficienza e l'immunoattivazione cronica caratteristiche delle infezioni da HIV portano all'insorgenza di infezioni opportunistiche e neoplasie che caratterizzano l'AIDS; queste patologie sono spesso multiple e contribuiscono ad un rapido deterioramento clinico. Il progredire dell'immunodepressione si riflette in una diminuzione dei linfociti CD4 (nelle fasi finali meno di 200 linfociti/ μ l) e in difetti funzionali

soprattutto in monociti - macrofagi, mentre la viremia (che in fase asintomatica si era assestata tra 1000 e 10000 copie RNA/ml) aumenta progressivamente fino a 10^6 , 10^7 copie RNA/ml (30). Questo deterioramento conduce alla fase clinicamente sintomatica della malattia che si manifesta inizialmente con linfadenopatia persistente (stadio "LAS", *Lympho- Adenopatic Sindrome*), seguito da una fase di perdita di peso, astenia, anemia, febbre, diarrea, ipergammaglobulinemia, che è definita stadio "ARC", ovvero *AIDS-related complex*. L'insorgenza di infezioni opportunistiche (fase di AIDS conclamato) (31) sono la principale causa di morte; tra queste le più frequenti sono: toxoplasmosi viscerale, polmonite da *Pneumocystis carinii* (colpisce il 75% dei pazienti) e da Citomegalovirus, infezione erpetica disseminata.

HIV reservoir

L'HIV può persistere sotto forma di provirus integrato in particolari distretti, sia tissutali che cellulari, definiti *reservoir*, che costituiscono dei veri e propri serbatoi per il virus. In questi, le forme virali competenti per la replicazione persistono per un periodo di tempo prolungato e con proprietà cinetiche più stabili rispetto al pool principale (32).

Le terapie antiretrovirali attualmente disponibili sono in grado di mantenere una profonda soppressione dei livelli plasmatici di HIV RNA al di sotto delle 50 copie/ml per lunghi intervalli di tempo. Nel caso di sospensione della terapia i livelli di virus presenti nel plasma risalgono rapidamente a valori rilevabili nell'arco di poche settimane (33), anche nel caso in cui la cART è stata iniziata nel corso dell'infezione acuta (34).

In seguito a varie evidenze (35,36), si è giunti alla conclusione che il virus HIV può persistere nei *reservoir* sotto forma di provirus integrato, che in seguito a riattivazione è in grado di replicarsi e rappresentano il maggior ostacolo all'eradicazione dell'infezione (37).

Le cellule T CD4+ quiescenti infettate con il virus rappresentano uno dei maggiori ostacoli all'eradicazione; per numerosi motivi sono considerate il maggior contributo all'instaurazione e al mantenimento dei *reservoir* virali. Esistono due diverse popolazioni di cellule T CD4+ quiescenti: naive e della memoria suddivise in cellule della memoria centrale (T_{CM}) e transitoria (T_{TM}) che rappresentano il *reservoir* principale di DNA provirale integrato (38). Sebbene l'infezione di questi sottotipi cellulari sia tipica

dell'infezione da HIV, i linfociti T della memoria rappresentano il serbatoio ideale per il mantenimento a lungo termine del genoma virale. Questo serbatoio virale sarebbe quindi il principale responsabile della persistenza dell'infezione anche in corso di un efficace terapia cART.

Inoltre, poiché tali cellule sono quiescenti e non subiscono divisioni cellulari né vanno incontro a processi di attivazione, il loro apparato trascrizionale è tale da creare le condizioni ideali per favorire la latenza virale. Nonostante questo all'interno delle cellule può comunque avere luogo una produzione virale limitata ma sufficiente a mantenere un pool di cellule infettate produttivamente.

Il 98% dei linfociti di tutto l'organismo è contenuto nei tessuti linfoidei, di conseguenza, nei pazienti trattati con cART, l'HIV RNA si concentra maggiormente negli organi linfatici primari (tonsille e midollo osseo) e secondari come il GALT (gut-associated lymphoid tissue), i linfonodi, la milza ed il timo e solo da ultimo nel plasma. Sia il DNA che l'RNA virali possono essere rilevati nei linfonodi dopo due anni di trattamento, anche quando la carica virale nel plasma, nel fluido cerebro spinale e nelle secrezioni genito-urinarie non è rilevabile. Nonostante la terapia cART, HIV è in grado di persistere nel GALT per molti anni e la concentrazione del DNA provirale riscontrata nei linfociti T CD4+ di questo distretto è di molto superiore a quella del sangue periferico.

TERAPIA E CONTROLLO

Terapia antiretrovirale di combinazione (cART)

I virus sono parassiti intracellulari obbligati, per questo i farmaci devono essere selettivi per inibire le funzioni del virus senza danneggiare la cellula ospite. Sono state individuate sequenze particolari che possono essere bersagli della terapia antivirale. Attualmente i farmaci approvati dalla FDA (Food and Drugs Administration) per il trattamento dell'infezione da HIV, si dividono, in base al loro meccanismo d'azione in grado di bloccare varie fasi della replicazione virale, in quattro categorie principali:

- **Inibitori della trascrittasi inversa**, gli inibitori della RT inibiscono la replicazione virale dopo l'entrata del virus nella cellula ospite ma prima dell'integrazione, (nucleoside reverse transcriptase inhibitors – **NRTIs**: ad es. AZT, DDI, Tenofovir,

abacavir,ecc) ed inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa (non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors –**NNRTIs**: ad es. sustiva, nevirapine, delavirdina, rilpivirina);

- **Inibitori della proteasi**, prevengono la maturazione dei virioni determinando il rilascio di particelle non infettanti (protease inhibitors – **PI**: ad es,darunavir, atazanavir, ritonavir, indinavir, etc.);
- **Inibitori dell'integrasi**, il meccanismo d'azione degli INI consiste nell' inibizione dell'inserimento del DNA virale nel DNA umano e quindi, nel blocco della capacità dell'HIV di replicare e infettare nuove cellule (integrase inhibitors – **INI**: raltegravir, dolutegravir, elvitegravir, ecc);
- **Inibitori d'ingresso**, inibiscono l'ingresso del virus tramite due meccanismi, la fusione (T-20) ed il legame con un recettore di membrana, CCR5 (Maraviroc); gli antagonisti del CCR5 sono gli unici farmaci antiretrovirali che inibiscono un recettore cellulare e non una proteina virale.

La storia del trattamento dell'infezione HIV inizia nel 1987 con l'introduzione del primo NRTI, la **zidovudina**; negli anni successivi a questa si sono aggiunti altri farmaci della stessa classe utilizzati dapprima in monoterapia poi come terapia duplice (1994). La vera "rivoluzione terapeutica" è iniziata nel 1996-1997 con l'introduzione degli **inibitori delle proteasi** e, successivamente, con **gli inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa**; l'avvento dei nuovi farmaci ha dato inizio all'era della **cART** e consiste nell'uso di tre o più farmaci appartenenti a due o più differenti classi di inibitori. Grazie alla combinazione di farmaci la mortalità è notevolmente diminuita trasformando una malattia mortale in una patologia cronica a lunga decorrenza. Mentre la monoterapia produce di solito abbastanza rapidamente forme mutanti di HIV resistenti al farmaco, l'associazione terapeutica in genere rallenta la selezione dei mutanti perché agisce a vari livelli della replicazione. Tuttavia la cART non riesce ad eradicare il virus, che rimane in forma latente nelle cellule infettate, ed è gravata, soprattutto per quanto riguarda le prime classi di farmaci introdotte, da effetti collaterali classificati come a breve e a lungo termine.

Resistenze ai farmaci

L'alta velocità di replicazione di HIV causa mutazioni che si accumulano nel genoma virale, portando alla diminuzione dell'efficacia antivirale del farmaco e rendendo inattivo ciascun componente del regime terapeutico. La comparsa di mutazioni è un fenomeno naturale dovuto agli elevati tassi di replicazione di HIV e alla incapacità della RNA-polimerasi di correggere errori di trascrizione. Il trattamento terapeutico induce una pressione selettiva sul virus favorendo l'insorgenza di ceppi virali resistenti in grado di sopravvivere e replicare. Le varianti farmaco-resistenti possono essere generate *de novo* durante la terapia, oppure possono originare da un pool di provirus integrati prima dell'inizio della terapia, considerando che in un singolo individuo HIV esiste un insieme di varianti geneticamente differenti, descritte come *quasispecie*. Quando la terapia non è più pienamente efficace si parla di "fallimento terapeutico". I problemi legati al fallimento terapeutico sono dovuti prevalentemente alla farmaco-resistenza e all'inadeguata concentrazione dei farmaci causata a sua volta da fattori come la mancata aderenza del paziente, la farmacocinetica e la tossicità. La farmaco-resistenza è una conseguenza di una non completa soppressione della replicazione virale. Vi sono tre tipi di fallimento terapeutico nel paziente HIV positivo e sono spesso correlati tra loro:

- virologico quando è determinato dall'aumento della carica virale;
- immunologico, consiste nella diminuzione delle cellule T CD4+, non necessariamente legato ad un aumento della carica virale;
- clinico, riguarda la comparsa di una malattia o infezione opportunistica.

Per ridurre il rischio che insorgano resistenze è necessario ottimizzare l'aderenza del paziente alla terapia e utilizzare più farmaci in combinazione tra loro, ma è comunque documentato un fallimento terapeutico, nel primo anno di cura, nel 50% dei pazienti che iniziano la terapia cART.

L'uso di "cocktail" di farmaci, di solito due analoghi nucleosidici e non nucleosidici e un inibitore della proteasi, oltre a rallentare lo sviluppo di farmaco-resistenza, sembra in grado di ridurre la tossicità cronica del farmaco, poiché permette di ottenere lo stesso effetto con dosaggi inferiori dello stesso (39).

Vaccinoterapia

La vaccinoterapia comprende le metodiche di immunizzazione a uso terapeutico, e la produzione *in vitro* di cellule condizionate (in maniera specifica e non).

Per lo sviluppo di vaccini terapeutici si stanno considerando i seguenti approcci:

- 1) **ARCELIS**, cellule dendritiche autologhe “pulsate” con antigeni di HIV isolate da paziente e reinfuse; successiva interruzione della terapia cART, ha comportato una riduzione della carica virale e un ritardo nella necessità di riprendere la terapia rispetto al gruppo di controllo (40);
- 2) **Vacc 4x**, peptidi basati sulla p24 (Gag) somministrati 4 volte per via intradermica (ID), seguiti dall'interruzione della terapia cART; ha determinato la necessità di riprendere la terapia dopo 70 settimane, contro le 16 del gruppo di controllo, ed una rallentata perdita dei CD4+ (41);

DERMAVIR, 15 proteine di HIV inserite in un sistema di nano particelle che interagiscono con le cellule di Langerhans (LC), e si auto-assemblano in VLPs; le LC dell'epidermide trasportano le nanoparticelle (infuse per via intradermica) a livello dei linfonodi drenanti dove maturano in cellule dendritiche (DC) e avendo quindi la possibilità, dopo aver processato le proteine, di presentare gli antigeni alle cellule T; ha causato una riduzione della viremia in assenza di cART (42);

- 3) **GTU** (Gene Transport Unit) multi HIV-DNA plasmidico codificante per Rev, Nef, Tat e Gag e per diversi epitopi delle cellule T di Pol e Env somministrato (sistema che assicura un alto livello di espressione degli antigeni selezionati e conferisce un'aumentata immunogenicità al DNA); ha determinato un aumento di cellule CD4+ e una diminuzione della viremia in uno studio clinico di fase II in Sud-Africa (43);
- 4) **Vaccino Tat**, subunità vaccinali basate sulla proteina regolatoria Tat per ottenere una risposta immune diretta verso gli antigeni che sono espressi precocemente durante il ciclo di replicazione virale, questo potrebbe portare a un contenimento dell'infezione o addirittura ad una infezione abortiva; sia gli anticorpi anti-Tat sia i CTL specifici per Tat sono stati correlati con una riduzione della viremia e una lenta progressione verso l'AIDS. In uno studio clinico di fase II di immunizzazione terapeutica con Tat su volontari HIV-infetti trattati con cART, i pazienti vaccinati presentano un significativo aumento sia delle cellule T CD4+, che delle cellule B

rispetto al gruppo di riferimento non vaccinato, un significativo recupero funzioni ale del sistema immunitario (aumento di cellule T regolatorie e della memoria) ed una marcata riduzione dello stato di attivazione immunologica cronica (linfociti CD8+/CD38+ e marcatori sierici di infiammazione, come la beta 2-microglobulina o la neopterina) che è ritenuta causa primaria di molte complicazioni patologiche legate all'infezione da HIV, incluso l'invecchiamento precoce (44).

Immunoterapia

L'Immunoterapia, anche detta "Terapia Biologica", è un approccio metodologico che non agisce direttamente sulla malattia o sulle sue cause, ma attraverso l'attivazione ed il potenziamento del sistema immunitario che viene stimolato a reagire ed eliminare gli elementi estranei. La cART convenzionale coinvolge la combinazione di sostanze che agiscono a vari livelli cellulari, proteggendo le cellule T CD4+ non infette dall'infezione HIV, inibendo l'entrata virale o le funzioni "post entry". La terapia ART colpisce la produzione del virus dalle cellule infettate, ma non riesce ad eliminare il virus. Le cellule che producono virus ed il virus circolante possono riattivare l'infezione se la terapia ART è discontinua. Il virus libero può anche attivare le cellule determinando un'infiammazione cronica.

Gli anticorpi monoclonali (mAbs) che si legano ed inattivano le proteine dell'envelope neutralizzano efficientemente il virus e perciò prevengono la diffusione dell'infezione. Questo può aver il vantaggio di facilitare l'eliminazione delle particelle virali e delle cellule che producono virus attraverso un meccanismo anticorpo-dipendente e in particolare la citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC), diminuendo, così, potenzialmente il *reservoir* virale e prevenendo l'immunoattivazione.

FUNZIONE E CONSERVAZIONE DELLA BARRIERA INTESTINALE

La superficie della mucosa intestinale è la più grande area del corpo a contatto con l'ambiente esterno; svolge un ruolo chiave nel bloccare l'accesso di sostanze potenzialmente nocive. L'epitelio e lo strato di muco, rivestendo l'intestino, rappresentano la prima linea di difesa dell'ospite e la barriera meccanica essenziale che evita il contatto tra gli ambienti interni e quelli esterni bloccando il passaggio di antigeni, tossine e prodotti microbici agendo così come componente dell'immunità innata (45). La barriera intestinale è dotata di diversi livelli di meccanismi di difesa per limitare la traslocazione degli antigeni nel lume. In un intestino normale, la barriera epiteliale è costituita da uno strato di giunzioni strette enterocitiche (*tight junctions*), giunzioni di ancoraggio e da desmosomi che impediscono il passaggio di microbi, da cellule caliciformi che secernono muco, e dalle cellule di Paneth. Le cellule epiteliali intestinali (IECs) possono rispondere agli stimoli microbici, sostenere le funzioni di barriera e partecipare alle risposte immunitarie (46,47). La funzione della barriera epiteliale dipende da complessi giunzionali formati da proteine transmembrana, come le claudine che formano canali paracellulari per piccoli cationi e acqua. Le cellule di Paneth possono limitare la penetrazione batterica attraverso i recettori Pattern Recognition Receptors (PRR) e la secrezione di mucine e proteine antimicrobiche (AMP), creando una barriera fisica e biochimica alla penetrazione microbica e alle cellule immunitarie (48). Le cellule epiteliali intestinali producono segnali immunoregolatori per tollerare le cellule immunitarie, limitando l'infiammazione allo stato stazionario e dirigendo le risposte delle cellule immunitarie innate e adattive contro agenti patogeni e batteri commensali. Le cellule epiteliali specializzate, chiamate cellule M, mediano il campionamento costante di antigeni luminali, sia i microrganismi che le macromolecole possono ottenere l'ingresso attraverso le cellule M (49). I batteri commensali inducono la produzione di citochine da parte delle IEC attraverso la segnalazione dei PRR, favorendo lo sviluppo di cellule dendritiche (DC) e macrofagi con proprietà tollerogeniche (50,51). I microrganismi commensali possono regolare le funzioni di barriera, controllando la produzione di muco da cellule caliciformi (52) o l'espressione di AMPs. Nelle condizioni omeostatiche, le IECs non rispondono agli stimoli dei TLR, mentre un'espressione TLR aumentata è stata osservata in condizioni infiammatorie. I TLR fungono da collegamento tra le alterazioni

del microbiota e l'omeostasi immunitaria (53). I TLR promuovono la proliferazione delle cellule epiteliali, la secrezione di IgA nel lume intestinale, l'espressione di peptidi antimicrobici (54) e svolgono un ruolo nell'omeostasi della barriera intestinale (55). L'espressione di proteine dalle giunzioni strette è stata modulata dall'attivazione dei TLR (56) e durante le patologie infiammatorie vengono compromesse le giunture epiteliali provocando una maggiore traslocazione batterica nella lamina propria, che vanno a sostenere la risposta infiammatoria. Molti fattori possono alterare la permeabilità intestinale e le infezioni del tratto gastrointestinale possono essere responsabili dell'assorbimento nutritivo alterato, dei livelli di micronutrienti esauriti e della secrezione dei rifiuti. Come conseguenza dell'attività microbica e del rilascio di peptidi o tossine solubili, ci sono alterazioni nei componenti degli enterociti e nel loro metabolismo, portando ad una rottura della barriera epiteliale e alla conseguente translocazione microbica nell'intestino (57). Inoltre, lo stile di vita e i fattori alimentari, compresi gli alimenti alcolici e energetici, possono aumentare la permeabilità intestinale (58). La conseguente permeabilità aumenta l'infiammazione intestinale cronica, strettamente connessa al sistema immunitario, come osservato nell'associazione esistente tra infiammazione e disfunzione della barriera in diverse malattie dell'intestino. La corretta attività di difesa della barriera epiteliale è supportata dal microbiota, che influenza il metabolismo cellulare e la proliferazione, la manutenzione e la riparazione dell'integrità della barriera, l'acquisizione dei nutrienti e la regolazione dell'energia, la risposta infiammatoria e l'angiogenesi.

IL MICROBIOTA

Il corpo umano è abitato da un esteso numero di batteri, virus e altri organismi eucarioti unicellulari. L'insieme dei microrganismi che vivono in pacifica coesistenza con il loro ospite umano viene definito "microbiota" o "microflora normale". La composizione e il ruolo dei batteri che fanno parte di questa comunità è stata estensivamente studiata in questi ultimi anni, mentre il ruolo dei virus e degli altri eucarioti che popolano il nostro corpo resta ancora poco conosciuto e da definire. Il microbiota umano consiste di una biomassa con circa 10^{14} cellule batteriche, numero che è dieci volte superiore di quello

delle cellule procariotiche dell'organismo adulto (59). Il microbiota colonizza virtualmente ogni zona del corpo umano che sia esposta all'ambiente esterno. I microbi abbondano sulla pelle e nelle vie respiratorie, nelle vie urogenitali e nel tratto gastrointestinale (GIT); quest'ultimo è di gran lunga l'organo più colonizzato: da solo alberga più del 70% di tutti i microbi del corpo umano e ha un'area stimata di circa 200 m².

La maggior parte del microbiota intestinale è composta di anaerobi obbligati che superano per numerosità gli anaerobi e gli aerobi facoltativi di 2-3 ordini di grandezza. Il numero delle cellule batteriche presenti nel GIT di un mammifero mostra un *continuum* crescente in senso oro-aborale, variando da 10³ batteri/g nello stomaco e duodeno, a 10⁴-10⁷ nel digiuno e nell'ileo, fino a oltre 10¹² cellule/g nel cieco e colon destro. Nello stomaco la concentrazione batterica è bassa perché l'ambiente acido distrugge quasi tutti i batteri che lo attraversano, agendo così come prima barriera difensiva verso la contaminazione dall'esterno. La maggior parte dei batteri risiede nella parte inferiore dell'apparato digerente, specialmente nell'intestino crasso, poiché nel tratto più prossimale anche la bile e le secrezioni pancreatiche risultano tossiche o poco favorevoli per la crescita della maggior parte dei microrganismi. Durante il parto, e immediatamente dopo, i batteri che costituiscono il microbiota urogenitale e cutaneo materno, e anche provenienti dall'ambiente circostante, colonizzano assai rapidamente il GIT del neonato. Dopo questa prima fase il microbiota subisce una seconda trasformazione, presumibilmente influenzata principalmente dalle caratteristiche del regime alimentare, fino a che, all'età di circa 4 anni, risulta abbastanza stabilizzato nella sua composizione, assai simile a quella dell'adulto. Esiste un equilibrio complesso e assai variabile fra i diversi microrganismi che risiedono normalmente nel GIT, dove svolgono un ruolo unitario ed essenziale per il mantenimento dell'omeostasi, per lo svolgimento dei processi digestivi e metabolici e per la regolazione del sistema immunitario locale dell'organismo ospite (60,61). Anche se alcune specie batteriche del microbiota possono essere agenti patogeni facoltativi, l'interazione costante fra l'ospite e i microbi residenti risulta solitamente favorevole alla salute dell'ospite, con un equilibrio fra le specie batteriche che favorisce i simbionti non patogeni.

La distribuzione del microbiota non è omogenea nell'ambiente intestinale. La superficie epiteliale è separata dal lume, da uno strato di muco abbastanza compatto, chimicamente complesso e di spessore superiore a 700 nanometri. La consueta rappresentazione

dell'iconografia tradizionale che vede la microflora immediatamente sovrastante la superficie epiteliale è pertanto errata e il microbiota, presente libero nel lume e in immediata prossimità della superficie delle cellule epiteliali, differisce significativamente dalla flora che popola l'interno dello strato di muco, sia quantitativamente che qualitativamente. Numerose evidenze scientifiche indicano oggi che nei secoli si è determinata una co-evoluzione dell'ospite e del suo microbiota, fortemente condizionata da fattori ambientali, dalla struttura genica dell'ospite e dall'integrità del suo sistema immunitario, sia locale che sistemico (62).

RUOLO DEL MICROBIOTA

Il microbiota nel tratto intestinale regola la risposta immune sistemica locale influenzando lo sviluppo e la reattività del tessuto linfoide associato all'intestino (GALT) fin dall'età infantile (63). La colonizzazione microbica precoce determina lo sviluppo dei meccanismi immuni umorali, legati alla produzione locale di IgA secretorie e di IgM, particolarmente importanti nella fase precoce della risposta immune e per lo sviluppo di tolleranza alimentare. L'equilibrio delle differenti sottopopolazioni di linfociti T helper (Th) è cruciale. Dopo il riconoscimento dell'antigene ("priming"), i linfociti B e Th attivati migrano e proliferano attivamente, con produzione locale di citochine e di IgA. Il priming dell'antigene determina, da parte dei Th attivati, la produzione "a cascata" di citochine diverse, in grado di determinare due tipi di risposta immunitaria, a impronta prevalentemente pro-infiammatoria, e quindi potenzialmente nociva, o antinfiammatoria. Il GALT deve ottemperare a due funzioni apparentemente contrastanti: deve essere tollerante nei confronti del microbiota luminale sovrastante e impedire l'induzione di una risposta immunitaria esuberante e, al tempo stesso, controllarne la crescita eccessiva ed evitare la traslocazione batterica dal lume alla mucosa con la possibile disseminazione sistemica. Il ruolo centrale del microbiota nello sviluppo delle difese immunitarie mediate dal GALT non è sorprendente, considerando che la mucosa intestinale rappresenta la più grande superficie di contatto con gli antigeni dell'ambiente esterno e che la microflora residente che ricopre la mucosa del GIT rappresenta normalmente la maggior parte degli antigeni presentati alle cellule immuni residenti (16). Negli ultimi anni numerose evidenze

hanno messo in risalto il ruolo potenziale del microbiota nell'eziopatogenesi di malattie diverse, con interessanti possibili ricadute terapeutiche (64). Le malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD), ad esempio, sono caratterizzate da una risposta immunitaria anomala nei confronti di antigeni endoluminali e del microbiota stesso, che determina e auto- mantiene un quadro di flogosi cronica tissutale. L'estrema conseguenza del subset infiammatorio con risposta immune alterata può essere lo sviluppo del cancro associato alle IBD. Il ruolo del microbiota nella patogenesi della sindrome del colon irritabile (IBS) e nel determinismo dei sintomi e della loro severità deve ancora essere chiarito, ma studi recenti hanno chiarito che fino al 50% delle IBS può essere indotto da un episodio isolato di gastroenterite tossinfettiva in grado di determinare sia alterazioni qualitative e quantitative nella flora come pure disfunzione immune. Recentemente è stato postulato che cambiamenti qualitativi nel microbiota intestinale, con sviluppo di una flora in grado di degradare maggiormente le sostanze nutrienti assorbibili, sono implicati nella patogenesi dell'obesità e della sindrome metabolica associata alla steato-epatite non alcolica.

ASPETTI GENERALI DEI PROBIOTICI

L'assunzione di probiotici può ridurre il rischio di malattie associate con disfunzione della barriera intestinale. I meccanismi con cui i probiotici possono influenzare la funzione di barriera sono anche un'area di interesse, anche se molti studi hanno dimostrato che i probiotici aumentano la funzione di barriera aumentando il muco, i peptidi antimicrobici e la produzione di IgA, nonché aumentando l'adesione competitiva per gli agenti patogeni e l'integrità delle cellule epiteliali (TJ).

Come descritto dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), i probiotici sono "microrganismi vivi che quando somministrati in quantità adeguate, conferiscono un beneficio alla salute dell'ospite". Il termine probiotico significa "a favore della vita" (dalla particella latina *pro*, a favore di, e dall'aggettivo greco *biotikos*, da *bios*, vita). Storicamente, il concetto di probiotici è iniziato intorno al 1900 dalla vincitrice del Nobel, Elie Metchnikoff, che ha scoperto che il consumo di batteri vivi (*Lactobacillus Bulgaricus*) in yogurt o nel latte fermentato migliora le caratteristiche biologiche del tratto

gastrointestinale (65). Studi recenti hanno indicato che i probiotici possono essere utilizzati per il trattamento e la prevenzione di enterocolite necrotizzante nei neonati prematuri, riduzione del tempo di pianto nei bambini con coliche, riduzione della durata della diarrea pediatrica acuta e gestione dei sintomi in sindrome dell'intestino irritabile, prevenzione della diarrea associata agli antibiotici, ulcera gastrica e molti altri tipi di malattie. Tuttavia, gli integratori alimentari sono ora ampiamente disponibili ai consumatori in genere sotto forma di prodotti lattiero-caseari coltivati che hanno aggiunto nella formulazione diversi ceppi di probiotici. Anche più recentemente all'interno del mercato dei consumatori, sono stati sviluppati 'probiotic shots' per cui possono essere consumati come capsule. Contenuti all'interno di questi integratori alimentari possono esistere molteplici ceppi di batteri. Tuttavia, i ceppi più comuni appartengono alle specie di *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, che hanno dimostrato benefici per la salute. In questo senso entrambi questi ceppi batterici sono noti per essere coinvolti in funzioni fisiologiche essenziali come la stimolazione della risposta immunitaria, la prevenzione della colonizzazione microbica/batterica patogena e opportunistica, la produzione di acidi grassi a catena corta, il metabolismo delle sostanze cancerogene e la sintesi delle vitamine come le vitamine B e K (66,67). I probiotici esercitano un effetto di regolazione sulla barriera epiteliale in modi diversi. Con un'azione diretta sull'epitelio intestinale, il probiotico aumenta la sintesi e la secrezione della mucina da parte delle cellule caliciformi; i batteri probiotici sono inoltre in grado di produrre diverse forme molecolari di batteriocine e competono con gli agenti patogeni e commensali per le sedi di legame con le mucine o sulle cellule epiteliali, impedendo una colonizzazione nociva e contribuendo alla funzione della barriera mucosa; i probiotici migliora la stabilità delle *tight-junctions*, con riduzione della permeabilità epiteliale agli agenti patogeni e ai loro prodotti e determina una *down-regulation* a livello nucleare dell'espressione di geni che codificano per citochine ad azione pro-infiammatoria.

È stato recentemente dimostrato che i batteri commensali modulano l'espressione di geni che sono implicati in funzioni intestinali essenziali, compresa l'omeostasi della barriera mucosale, l'assorbimento di sostanze trofiche, l'angiogenesi e la maturazione intestinale postnatale. I probiotici determinano anche la *down-regulation* dell'apoptosi cellulare. L'induzione aberrante di apoptosi da parte di stimoli diversi, anche di natura batterica, può essere causa di malattia a livello del tratto gastrointestinale. I processi apoptotici in

condizioni di normale salute mantengono un equilibrio fra proliferazione e degenerazione cellulare, mentre un'apoptosi incontrollata può determinare danno tissutale indotto da sostanze tossiche rilasciate da un eccesso di cellule in degenerazione (68).

I probiotici esercitano effetti positivi sull'immunità mucosale aumentando la proliferazione di linfociti B secernenti IgA nella lamina propria, promuovendo la secrezione di IgA nello strato mucoso endoluminale. Inoltre, i probiotici possono alterare la composizione e l'espressione genica a livello del microbiota, con potenziamento indiretto della barriera attraverso i batteri commensali (Tabella 1), (69). I probiotici rappresentano un approccio terapeutico-nutrizionale economico e sicuro, esente da effetti collaterali negativi a lungo termine e di sperimentata efficacia nel trattamento di malattie immunologiche, digestive e respiratorie (70).

L'efficacia terapeutica dei probiotici è stata valutata in studi clinici randomizzati e controllati per diverse patologie dell'intestino, sia in ambito pediatrico che nell'adulto (71–76).

MECCANISMO D'AZIONE DEI PROBIOTICI
Inibizione di microrganismi patogeni:
<ul style="list-style-type: none"> • Riduzione del pH intraluminale • Secrezione di batteriocine • Competizione alimentare • Competizione per loci di adesione epiteliale
Miglioramento della barriera epiteliale e mucosa:
<ul style="list-style-type: none"> • Aumento della sintesi e secrezione di IgAs* • Stimolazione della secrezione di mucine • Aumento della produzione di SCFA** • Stabilizzazione delle tight junctions
Controllo dei meccanismi di omeostasi cellulare:
<ul style="list-style-type: none"> • Aumento della sintesi di citochine antinfiammatorie • Riduzione della sintesi di citochine proinfiammatorie • Ridotta induzione di apoptosi cellulare
*IgAs: immunoglobuline A secretorie; **SCFA: acidi grassi a catena corta

Tabella 1: Meccanismo di azione dei probiotici

HIV-Associated Neurocognitive Disorder (HAND) ed HIV-1.

Il termine HAND (HIV-associated neurocognitive disorder) indica lo spettro di disfunzioni neurocognitive associate all'infezione da HIV-1.

Il virus dell'HIV-1 entra nel SNC durante le fasi iniziali dell'infezione e la sua persistenza, insieme all'infiammazione cronica, contribuiscono allo sviluppo dell'HAND (Saylor).

Malgrado le sempre crescenti conoscenze a tal riguardo, non c'è ancora un trattamento specifico per questo tipo di disordini neurocognitivi. Inoltre i disturbi legati ad HAND permangono anche negli individui in trattamento con cART, sebbene esso sia in grado di ridurre la percentuale (77,78).

Una delle ragioni che impediscono la totale risoluzione di disturbi neurocognitivi anche in seguito a soppressione virologica, è il fatto che l'encefalo sembra essere un reservoir del virus, nel quale si assiste ad una replicazione persistente di HIV-1 che contribuisce allo sviluppo di HAND(79). Tutto questo impatta negativamente sulla qualità della vita dei pazienti HIV-1 positivi.

Un ruolo chiave sembra giocare l'infiammazione. I monociti circolanti attivati sembrano essere fondamentali per l'introduzione di HIV-1 nell'encefalo, attraversando la barriera emato-encefalica, così come anche per il mantenimento dell'infezione (80–82).

Una delle questioni principali che rimangono senza risposta è come mai lo stimolo infiammatorio nel SNC sia mantenuto anche in seguito a soppressione virologica tramite cART. Uno dei meccanismi più probabili nel sostenere lo stimolo infiammatorio nella microglia potrebbe derivare dai prodotti microbici circolanti derivanti dalla intensa traslocazione microbica che deriva dai batteri intestinali, ove si assiste ad un drammatico cambiamento della composizione del microbiota (83).

Uno dei principali marker di infiammazione a livello del SNC è la neopterina (84). Questa molecola viene prodotta dai macrofagi in seguito a stimolazione tramite Interferon gamma (IFN γ), è un marker di attivazione monocitaria e la sua espressione è fortemente associata all'insorgenza di HAND (85–88). Studi recenti dimostrano che i livelli di neopterina nel SNC sono più elevati nei pazienti HIV-1 naive rispetto a quelli in terapia cART, così come in questi ultimi risulta essere comunque più elevate dei controlli sani, evidenziando il fatto che nemmeno la cART è in grado di normalizzare l'espressione di questo marker (86,89).

È ormai ben noto come la composizione del microbiota intestinale è associata con alterazioni di tipo comportamentale e neurocognitivo, contribuendo a definire “ l'asse microbiota-

intestino-cervello” come una estensione del già noto concetto di “asse intestino-cervello”(90). Quest’ultimo è solitamente usato per descrivere l’esistenza di una rete di comunicazione bidirezionale tra il SNC e l’intestino, incluso il sistema nervoso enterico.

Durante l’infezione da HIV-1, il danno a livello della mucosa intestinale e la conseguente traslocazione microbica determinano un aumento della produzione di IFN γ e di attivazione cronica del sistema immunitario (91,92).

Inoltre, la modificazione della microflora intestinale che si osserva nei pazienti con infezione da HIV-1, può influenzare il sistema immunitario mucosale e stimolare lo sviluppo di un microambiente pro-infiammatorio persistente (93).

IDO-1 E IL METABOLISMO DEL TRIPTOFANO

Recentemente il metabolismo del triptofano è stato considerato un importante fattore che influenza la qualità della vita dei pazienti con infezione da HIV-1, a causa dell’effetto tossico che alcuni suoi metaboliti esercitano sul SNC.

Insieme al disequilibrio legato alla mucosa intestinale, in HIV-1 si verifica un’alterazione del pathway del metabolismo del triptofano, che coinvolge in particolare l’enzima Interferon indotto IDO-1 (indoleamine 2,3-dioxygenase 1) (94,95).

Il triptofano è uno dei 9 amminoacidi essenziali, che l’uomo non è in grado di sintetizzare da se, ma che viene assunto tramite l’alimentazione o ottenuto in seguito al turnover delle proteine. Il triptofano rappresenta un componente critico di molte funzioni metaboliche e può agire come un fattore determinante sull’umore, la cognizione e il comportamento (80,96).

Il triptofano viene principalmente utilizzato nella sintesi delle proteine e per la produzione di molecole come la serotonina (5-hydroxytryptamine [5-HT]), la nicotinamide adenine dinucleotide (NAD/NADH), attraverso il pathway di biosintesi delle chinurenine (97).

La chinurenina è il primo metabolita stabile ad essere sintetizzato quando il triptofano è ossidato sotto l’azione di IDO-1 o IDO-2 (98).

Nei soggetti con infezione da HIV-1 i livelli di triptofano periferici dipendono principalmente dall’attività di IDO-1 e molti studi hanno dimostrato come l’elevata conversione del triptofano in chinurenina è correlata con dei livelli di immunoattivazione maggiori (98–102). La maggiore degradazione del triptofano mediata da IDO-1, oltre a ridurre i livelli di serotonina, è in grado di produrre una concentrazione più elevata di alcuni intermedi metabolici

neurotossici, come la 3-idrossichinurenina (3-HK), l'acido antralinico (3-HAA) e l'acido chinolinico (QUIN), o neuroprotettivi, come l'acido picolinico (PIC) (103–107).

Nel contesto di un'infezione da HIV-1 tutto questo sembra essere associato all'insorgenza di danni a livello neuronale (87,99,108–110).

Inoltre l'attività di IDO-1 e del catabolismo del triptofano è stata associata con una maggiore progressione in AIDS (98,111).

Durante l'infezione da HIV-1, a causa della perdita di integrità della mucosa intestinale e della relativa traslocazione microbica, l'attivazione cronica del sistema immunitario stimola la produzione di IFN γ e di conseguenza di IDO-1 (91,92). La chinurenina che viene prodotta dalla via metabolica di IDO-1 è inoltre un regolatore negativo della proliferazione dei linfociti T (112), mentre l'acido chinolinico è associato all'insorgenza di disordini neurocognitive (113). Inoltre IDO-1 sembra regolare negativamente la frequenza di una particolare sottopopolazione linfocitari associata alla mucosa intestinale, ovvero i linfociti T-helper 17 (Th17) durante l'infezione da HIV-1 (114,115).

RUOLO DEL VIRUS HIV-1 NELL'INTESTINO E FUNZIONE DEI PROBIOTICI NELL'INFEZIONE

L'infezione da HIV-1 induce un danno rapido e sostanziale ai tessuti linfoidei associati all'intestino (GALT), con un massivo esaurimento dei linfociti T helper di tipo 17, un sottogruppo di cellule T CD4+ che controllano i batteri intestinali, secernendo diverse citochine tra cui l'IL-17 e l'IL-22 (Figura 8) (116). La perdita di questo sottogruppo di cellule T helper CD4+ può facilitare la progressione della malattia permettendo la traslocazione di prodotti batterici come il lipopolisaccaride nel circolo sanguigno causando un attivazione sistemica dei linfociti T (117).

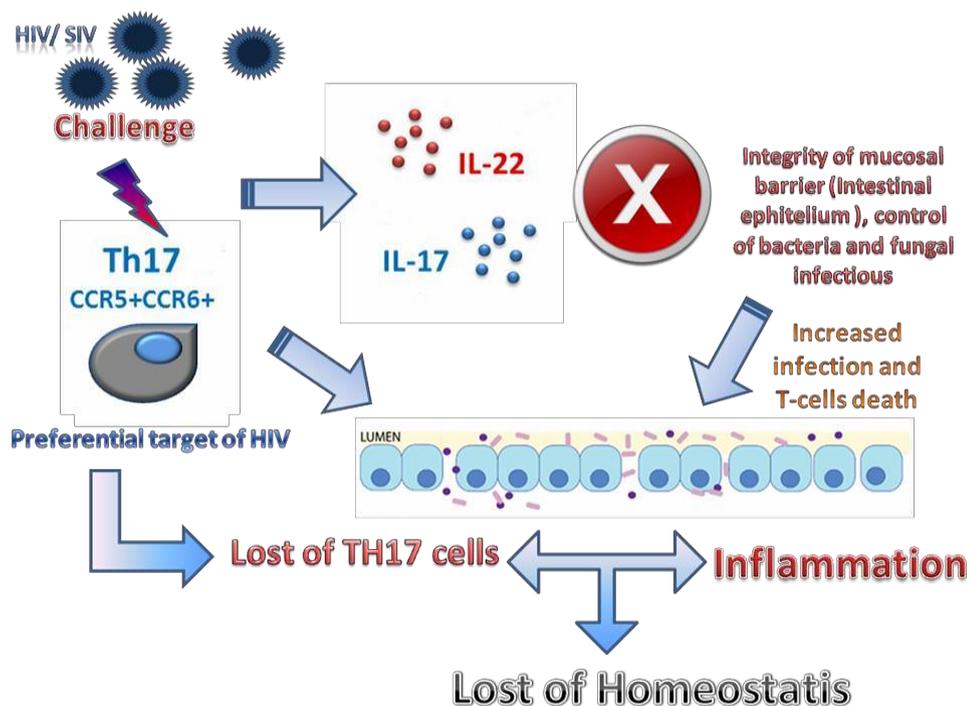


Figure 8: Perdita delle cellule Th17 con conseguenti disturbi quali la variazione della composizione del microbioma, la traslocazione microbica e l'attivazione immunitaria.

Negli individui sani, i batteri intestinali aiutano a controllare i patogeni nocivi, educano il sistema immunitario e aiutando la digestione (118), ma l'alterazione di questa composizione batterica molto complessa sono state associate a patologie come l'infezione da HIV-1 (119), la malnutrizione (120,121), l'infiammazione cronica, l'aterosclerosi (122,123) e suscettibilità alle infezioni opportunistiche. Considerando l'importante ruolo che l'immunità innata e adattativa svolgono nella formazione della composizione del microbiota intestinale (124), e comprendendo come la composizione differisce nei soggetti con infezione da HIV-1, questa è associata a cambiamenti altamente caratteristici nella struttura della comunità intestinale che la cART non ripristina.

Il ruolo di HIV-1 nel tratto gastrointestinale degli esseri umani è stato studiato dal 1984. Kotler e colleghi hanno osservato che gli individui infetti da HIV-1 presentavano anomalie istologiche della mucosa gastrointestinale, del malassorbimento e della diminuzione dei linfociti dopo diarrea, aumento dell'infiammazione gastrointestinale, aumento della permeabilità intestinale e malassorbimento dell'acido biliare. Di conseguenza, hanno osservato infiltrati infiammatori dei linfociti e danni allo strato epiteliale gastrointestinale,

tra cui atrofia villosa, iperplasia criptica e bruciore villosa (125). Infatti, ci sono evidenze di danni causati da HIV-1 alle barriere epiteliali negli individui infetti da tale infezione. La disfunzione della barriera intestinale è il modo principale per la traslocazione microbica e la successiva attivazione immunitaria (126).

I fattori che contribuiscono al disagio o alla disfunzione gastrointestinale includono infezioni opportunistiche (di solito con <100 CD4+ cellule T/ml), reazioni farmacologiche, malassorbimento, sovrapposizione batterica, malattia funzionale dell'intestino (diarrea, prevalentemente), infiammazione delle mucose, che è una forma di malattia intestinale infiammatoria (IBD) (127,128). I cambiamenti patologici del tratto gastrointestinale sono da tempo noti come caratteristica dell'infezione da HIV-1 (Figura 9).

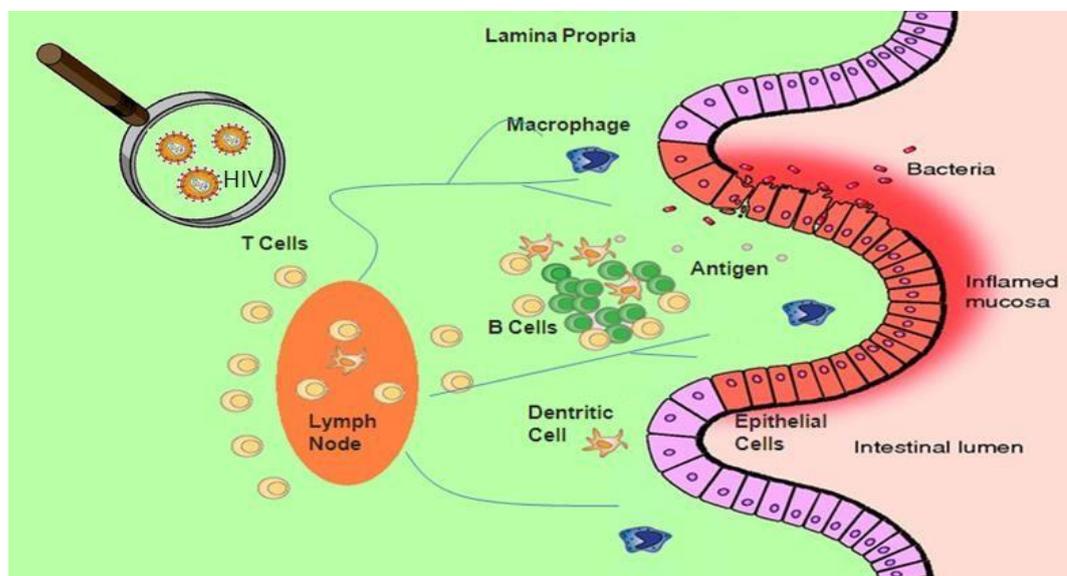


Figure 9: Mucosa intestinale con vasta infiammazione nei soggetti con infezione da HIV-1

Alcuni studi hanno fornito approfondimenti meccanici sulle cause sottostanti l'enteropatia HIV-1 e la diminuzione delle cellule T delle cellule CD4, ma sono necessari ulteriori studi per aumentare la nostra comprensione delle conseguenze a lungo termine dell'assalto sul tratto GI (129). Anche se i danni strutturali e immunologici alla mucosa si verificano rapidamente durante la fase acuta dell'infezione, gli individui infetti da HIV-1 non si arrendono a infezioni opportunistiche fino a quando le cellule T CD4+ del sangue periferico sono diminuite sotto 200 cellule per microlitro. Diversi studi hanno dimostrato che la degradazione del tratto GI porta alla traslocazione microbica, associata

all'attivazione immunitaria e alla progressione della malattia. Tuttavia, il relativo contributo della traslocazione microbica e di altri fattori di attivazione immunitaria non è completamente compreso (130). Il tratto GI è un sito di infezione virale massiccia, esaurimento delle cellule CD4+, apoptosi enterocitaria, danno epiteliale e fibrosi dei tessuti linfoidei. Pertanto l'infezione da HIV-1 potrebbe essere abbastanza ragionevolmente considerata una malattia del tratto gastrointestinale. Uno dei fattori più importanti per valutare l'immunità mucosa nell'infezione da HIV-1 è il numero di cellule T CD4+ nel ventre. Gli studi hanno dimostrato che le cellule CD4+ T delle cellule mucose che esprimono CCR5 e le cellule CD4+ periferiche specifiche per l'HIV-1 che esprimono marcatori di homotraslocazione intestinale, integrin- β 7 e CCR6, sono esaurite in entrambe le fasi acute e croniche dell'infezione da HIV-1 (131). Anche i ruoli protettivi delle cellule della mucosa intestinale Th17 nell'infezione da HIV-1 sono molto importanti, ma durante la malattia l'esaurimento delle cellule Th17 è stato collegato a perdere l'integrità epiteliale della mucosa e provoca molteplici effetti deleteri, tra cui la traslocazione microbica e l'infiammazione delle ghiandole (132,133). Una grande percentuale di cellule Th17 si perde durante la fase acuta dell'infezione. In parte, le reazioni immunitarie funzionali della mucosa sono necessarie per mantenere l'integrità dell'epitelio intestinale. Oltre al loro ruolo protettivo, le cellule Th17 supportano l'omeostasi enterocitica mediante secrezione dell'interleuchina IL-17 e IL-22 e reclutamento delle cellule NK (134). Durante l'infezione da HIV-1, le cellule CCR5+ CCR6+ Th17 sono esaurite nella bocca a causa del targeting diretto dei recettori CCR5 da virioni HIV-1. Inoltre, il lipopolisaccaride batterico (LPS) può anche provocare l'esaurimento delle cellule T CD4+, dato che la stimolazione LPS è nota per aumentare l'espressione di CCR5 su queste cellule. Inoltre, in individui infetti da HIV-1, la riduzione delle cellule Th17 sembra essere concomitante con un aumento del numero di cellule regolatrici CD4+ T (Treg). Il rapporto Low Th17/Treg è stato correlato con livelli elevati di 16S rDNA al plasma che suggeriscono la traslocazione microbica (135). Una parte fondamentale della funzione di barriera della mucosa intestinale è orchestrata dal microbiota intestinale che coesiste con l'ospite in una simbiosi reciprocamente vantaggiosa. Le evidenze attualmente disponibili suggeriscono che il microbioma intestinale è coinvolto nello sviluppo di infiammazione e di attivazione immunitaria sistemica a causa della traslocazione microbica negli individui infetti da HIV-1. Questa attivazione immunitaria può svolgere un ruolo fondamentale per la persistenza del virus, il principale ostacolo per trovare una cura per l'infezione da HIV-1. Nonostante

i nuovi e efficaci farmaci, la cART non ha risolto i problemi legati all'attivazione immunitaria e alle condizioni infiammatorie delle persone con HIV-1 e, tuttavia, cercando di trovare approcci sicuri e ben tollerati, impedire o controllare questi problemi sembrano essere essenziale (136,137). Alcuni studi hanno esaminato finora l'uso di probiotici nell'infezione da HIV-1. I disturbi gastrointestinali come la stitichezza, la diarrea e il gonfiore sono molto comuni durante l'infezione da HIV-1 (138). Recentemente, alcuni studi hanno utilizzato probiotici come approccio terapeutico nella malattia infiammatoria intestinale (IBD) per inibire i batteri patogeni, proteggere l'epitelio intestinale e produrre citochine antiinfiammatorie (Figura 10) (75). Inoltre, in questo contesto, è stata osservata anche un'aumentata produzione di IgA, diminuzione dell'attivazione delle cellule dendritiche e minore stimolazione non specifica delle cellule immunitarie (139). Alcuni studi hanno somministrato diversi tipi di formulazioni probiotiche per valutare il loro impatto sull'infezione da HIV-1 e in particolare su alcuni risultati come: diarrea, conta CD4+ e traslocazioni microbiche. Tre studi hanno riportato i benefici dei probiotici nella diarrea associata all'HIV-1. Uno studio che usava *Lactobacillus rhamnosus* (140) e uno con *Saccharomyces boulardii* riportarono sintomi di mitigazione e effetti benefici (141). Al contrario, uno studio che utilizza *Lactobacillus rhamnosus* e un altro studio utilizzando una miscela di *Bifidobacterium* e *Streptococcus thermophilus* non ha mostrato alcun beneficio nella diarrea associata all'HIV-1 (142,143). Questi risultati sono risultati inconcludenti e sono necessari ulteriori studi per valutare gli effetti di diversi tipi di probiotici nella diarrea HIV-1. Recentemente alcuni studiosi hanno valutato gli effetti delle diverse formulazioni probiotiche sui conteggi delle cellule CD4+. Due studi con *Lactobacillus rhamnosus* (142,144) e uno studio utilizzando *Lactobacillus casei* sp. Shirota (145) non ha riportato alcun effetto sui conteggi delle cellule CD4+. È interessante notare, invece, che il miglioramento delle cellule CD4+ è stato osservato in altri studi utilizzando una miscela di diverse specie di batteri. Ad esempio, studi con batteri *Lactobacillus* e/o *Bifidus* hanno mostrato un trend crescente nelle frequenze delle cellule CD4+ (145,146). Inoltre, un mix di più di due ceppi batterici sembrerebbe avere risultati migliori. Per esempio, in uno studio, in seguito all'aggiunta una miscela di batteri probiotici contenenti *Lactobacillus* (*casei*, *acidophilus*, *plantarum*, *delbrueckii*), *Bifidobacteria* (*breve*, *infantis*, *longum*) e *Streptococcus* (*salivarius*, *faecium*) si è ottenuto un aumento del numero di cellule CD4+ (147). Questi risultati suggeriscono che alcuni tipi specifici di probiotici potrebbero essere più utili per migliorare il numero delle cellule

CD4+. La valutazione della traslocazione microbica dopo l'integrazione probiotica è un altro aspetto interessante nell'infezione da HIV-1. Alcuni studi hanno mostrato una riduzione delle citochine proinfiammatorie come IL-6, IL-12, TGF-beta, hsCRP dopo l'utilizzo di un mix dei batteri probiotici *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacteria lactis* (148), *Saccharomyces boulardi* (149) e *Lactobacillus casei* sp. Shirota (54). Inoltre, insieme con la riduzione dell'infiammazione, alcuni di questi studi hanno mostrato una riduzione di alcuni marcatori di traslocazione microbica, come la proteina legante LPS (149) e il livello del DNA batterico (16S rDNA) nel plasma (148). Tuttavia, i probiotici contenenti ceppi di *Lactobacillus* e *Bifidobacteria*, che sono i principali batteri esauriti nei soggetti positivi di HIV-1, hanno dimostrato di essere associati ad un aumento dei numeri e delle frequenze delle cellule CD4+, nonché una riduzione della traslocazione pro-infiammatoria e microbica marcatori.

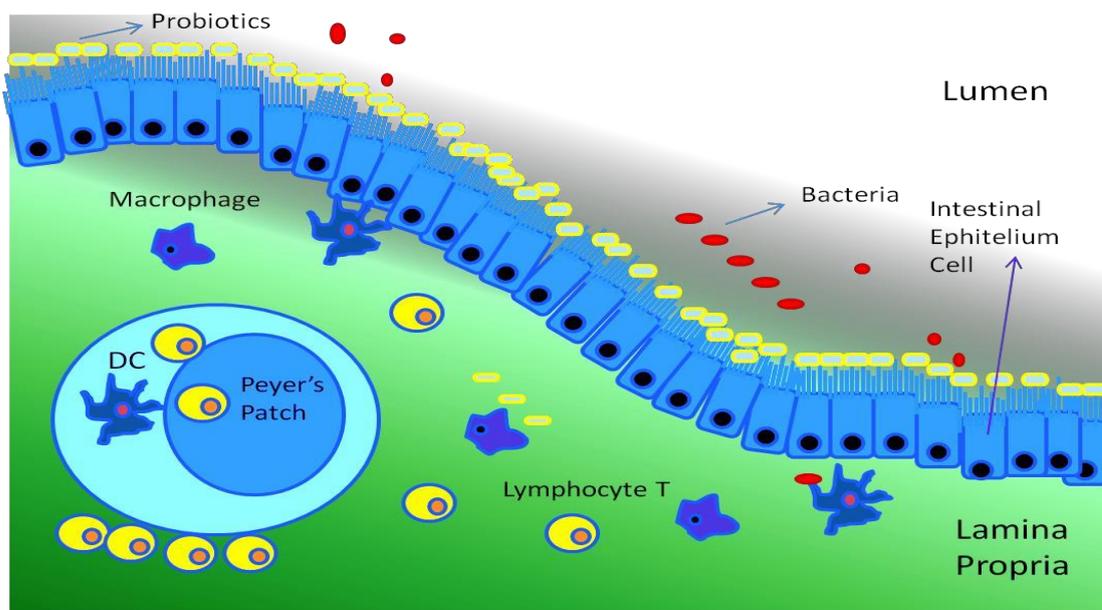


Figura 10: Mucosa intestinale dopo l'integrazione di Probiotici

SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo dello studio è stato quello di studiare l'effetto della supplementazione probiotica sul metabolismo del triptofano e la sua relazione con l'infiammazione nel SNC.

Abbiamo quindi condotto uno studio pilota longitudinale in una popolazione di soggetti HIV -1 positivi in cART, per verificare se la supplementazione con probiotici contenenti 8 ceppi di batteri, era in grado di modificare:

- I livelli di neopterin nel liquido cerebrospinale;
- L'espressione dell'mRNA di IDO e dell'IFN γ misurato sui linfociti della lamina propria intestinale (LPL) e nel sangue periferico (PBMC);
- Il metabolismo del triptofano
- I livelli di serotonina.

MATERIALI E METODI

Popolazione in studio

I pazienti sono stati selezionati secondo i seguenti criteri di inclusione: (i) firma del consenso informato; (ii) uomini o donne di almeno 18 anni; (iii) trattamento con cART; (iv) livelli di HIV-1 RNA <37 copie/mL e conta delle cellule T CD4+ > 400 cellule/mm³. I criteri di esclusione considerati erano: (i) conosciuta o sospetta allergia o intolleranza con le specifiche formulazioni dei probiotici; (ii) uso di probiotici o antibiotici durante le 3 settimane precedenti l'arruolamento; (iii) tossicodipendenza; (iv) storia o malattie infiammatorie attuali del piccolo o del largo intestino; (v) diarrea; (vi) qualsiasi malattia corrente, passata o sistemica e (vii) stato di gravidanza. Sono stati arruolati 30 pazienti positivi per HIV-1 in trattamento ART sono reclutati presso la Divisione di Malattie Infettive, Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, Policlinico Umberto I, Università "Sapienza" di Roma.

Tutti i pazienti hanno ricevuto, due volte al giorno per una durata di sei mesi, un integratore probiotico multistrain liofilizzato ad alta concentrazione che include i seguenti ceppi batterici: *Lactobacillus plantarum* DSM24730, *Streptococcus thermophilus* DSM24731, *Bifidobacterium Breve* DSM24732, *L. paracasei* DSM24733,

L. Delbrueckii subsp. *Bulgaricus* DSM24734, *L. acidophilus* DSM 24735, *B. longum* DSM24736, *B. infantis* DSM24737. La preparazione probiotica è stato somministrato per via orale; il dosaggio giornaliero era corrispondente a $1,8 \times 10^6$ batteri liofilici quindi vivi. Lo studio è stato approvato dal consiglio di revisione istituzionale (Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, Università "Sapienza" di Roma) e il Comitato Etico (Policlinico Umberto I Università "Sapienza" di Roma) il 16 gennaio 2014. Tutto i partecipanti allo studio hanno firmato un consenso scritto. Nessun evento avverso è stato osservato durante il follow-up e tutti i soggetti hanno mantenuto un carico virale plasmatico non rilevabile prima e dopo la supplementazione probiotica (HIV-1 RNA [<37 copie / ml]).

Disegno dello studio

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a procedure endoscopiche e a raccolta di sangue prima dell'inizio della supplementazione probiotica (T0) e dopo 6 mesi di trattamento (T6). La preparazione dei pazienti per l'esame endoscopico del colon è stata eseguita con l'uso di lassativi ad alto potere osmotico (PEG) 24 ore prima dell'esame. La procedura endoscopica è stata eseguita con sedazione cosciente (midazolam 5 mg / iv) usando pinze Radial Jaw 4, Boston Scientific, Natick, MA. Tutti gli individui sono stati sottoposti a una colonscopia totale e l'ileoscopia retrograda per almeno 10 cm dall'ileo distale con endoscopio convenzionale o sottile (modello CF o PCF-160 AI, Olympus Medical Europe GmbH, Hamburg, Germania). Sono stati ottenuti campioni (due biopsie da ogni sito) dall'ileo terminale, dal ceco, dal colon ascendente, trasversale e discendente. Inoltre, sono state raccolte biopsie per esami istologici e valutazioni con tecnica di immunoistochimica. Infine, i campioni fecali sono stati raccolti prima della supplementazione; dopo 2 e 6 mesi di integrazione probiotica. Il fenotipo dei linfociti T e i marcatori di attivazione immunitaria sono stati analizzati sulle cellule mononucleate del sangue periferico appena isolate (PBMCs) e sui linfociti della Lamina Propria (LPLs). L'espressione delle citochine sono state valutate dopo stimolazione delle cellule e incubazione overnight sulle sottopopolazioni dei linfociti T.

Lavorazione dei campioni

Sono stati raccolti circa 20 ml di sangue a paziente in provette di tipo Vacutainer contenenti acido etilendiammetraacetico (EDTA), (BD Biosciences, San Jose, CA) in ogni visita prevista dallo studio. Il plasma è stato immediatamente separato mediante centrifugazione e conservato a -80°C per le successive analisi. I PBMCs sono stati separati con centrifugazione su gradiente di densità Ficoll (Lympholyte, Cedarlane Labs, Hornby, Ontario, Canada) e lavati due volte in tampone fosfato salino (PBS 1X). Successivamente i PBMCs estratti sono stati marcati per evidenziare il fenotipo, l'attivazione e sono stati incubati overnight dopo stimolazione. Le biopsie ottenute dai diversi siti intestinali sono state raggruppate tra loro e successivamente trattate. Tutte le biopsie raccolte in RPMI 1640 (serum bovino fetale inattivato al 10%) sono stati lavate

due volte in Wash Media (500 ml HBSS + 5ml L-glutammina + 5 ml PENSTREP), risospese e incubate per 1h a temperatura ambiente in EDTA Solution 5mM (250 µl di EDTA 0,5 M in 25 mL di Wash Media) su agitatore automatico. Successivamente le biopsie sono state digerite mediante incubazione di un'ora a 37°C in RPMI 1640 preriscaldato (serum bovino fetale inattivato al 10%) con 1 mg/mL di Collagenasi (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) e 1,5 U DNase I (Sigma-Aldrich), portando all'isolamento degli LPLs, che sono stati filtrati ulteriormente con un filtro da 70 µm per la separazione definitiva delle cellule ottenute (Becton Dickinson).

Citometria a flusso

Il fenotipo e l'attivazione cellulare sono state valutate mediante analisi citofluorimetriche, sono state condotte analisi sui PBMC e LPL utilizzando anticorpi monoclonali anti-human: CD3-PerCP, CD4-APC-Vio770, CD8-FITC, CD38-APC e HLA-DR-PE (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germania). Abbiamo elaborato una strategia di *gating* per poter condurre l'analisi citofluorimetrica sulle cellule del sangue periferico e intestinali. Le acquisizioni sono state effettuate su Miltenyi Biotec cytometer-MACSQuant Analyzer (otto canali di fluorescenza, tre laser). L'analisi dei *gating* ed i dati sono stati analizzati usando MACSQuantify software 2.5 (Miltenyi Biotec). La stessa strategia di *gating* è stata applicata a tutti i campioni. Sono state effettuate delle strategie di *gating* che comprendessero nell'acquisizione citofluorimetrica almeno 100.000 e 10.000 eventi nei *gating* CD3+ che sono stati analizzati per i PBMCs e gli LPLs, rispettivamente. I controlli isotopici sono stati usati come controlli negativi per differenziare il segnale di fondo non specifico da un segnale specifico anticorpale dei marker CD38 ed HLA-DR.

Isolamento DNA batterico da campioni fecali

Il DNA batterico proveniente da campioni fecali raccolti prima e dopo la supplementazione con probiotici è stato estratto utilizzando il QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germania) [113]. Circa 200 mg di feci sono state risospese in 1,4 mL di ASL lysing buffer del kit, provvisto di biglie di vetro (150-212 µm; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ed omogenizzate. Tale sospensione è stata incubata a 95°C per 5 minuti, e poi eluito in 200 µL di AE buffer fornito dal kit e conservato a -20°C.

Real Time PCR

Successivamente è stata effettuata la Real-Time PCR per valutare i livelli di bifidobatteri. La PCR è stata effettuata su piastre a 96 pozzetti utilizzando l'Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Inc., Norwalk, Conn), [113, 114]. Dopo l'amplificazione è stata effettuata un'analisi della curva di melting per distinguere gli ampliconi bersaglio rispetto i prodotti aspecifici. Le curve standard sono state fatte usando una diluizione con fattore 10 del DNA estratto dal Bifidobacterium breve. Tutti i campioni sono stati analizzati in duplicato in due corse Real-Time PCR indipendenti.

Per l'analisi degli mRNA di IDO-1 e IFN γ nei PBMC e negli LPL è stata usata la Real Time PCR LightCycler 480 instrument (Roche, Basel, Switzerland). L'RNA totale dei PBMC e degli LPL è stato estratto tramite RNeasy Plus Universal Tissue Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e retrotrascritto usando High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). I primer e le sonde sono stati aggiunti alla soluzione di Probes Master Mix (Roche, Basel, Switzerland), in un volume finale di 20 μ L. il gene housekeeping β -glucoronidasi è stato usato come controllo interno. L'espressione genica è stata calcolata usando il metodo comparativo Ct.

Saggio ELISA

I livelli di Serotonina plasmatica e Neopterin nel liquor sono state misurate tramite saggio ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). I livelli di Neopterin dei 13 pazienti HIV-1 positivi sono stati misurati tramite un kit ELISA commerciale (IBL International GmbH, Hamburg, Germany). Il kit si basava sul principio del metodo ELISA competitivo

I livelli di serotonina invece sono stati misurati con un kit basato sul metodo indiretto, con una piastra contenente gli anticorpi anti-serotonina e un anticorpo coniugato, usando il 3,3',5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) come substrato per la rilevazione.

Entrambe le reazioni sono state lette a 450 nm. La quantificazione è stata effettuata comparando l'assorbanza con una curva di riferimento standard, preparata con concentrazioni note.

Metaboliti fecali

Per l'analisi tramite risonanza magnetica nucleare (NMR), 80mg di feci sono state vortexate per 5 minuti insieme ad 1mL di acqua deionizzata e successivamente centrifugate per 15 minuti a 18000 giri a 4°C.

Circa 700mL di supernatante è stato aggiunto a 100 µL di una soluzione con 3-(trimethylsilyl)-propionic-2,2,3,3-d4 acid sodium salt con un buffer fosfato 1-M.

Lo spettro della risonanza magnetica nucleare protonica (¹H-NMR) è stata registrata a 298 K con uno spettrometro AVANCE III (Bruker, Milano, Italia), alla frequenza di 600.13 MHz. Il segnale residuo di HOD (Hydrogen Deuterium Oxide) è stato soppresso tramite presaturazione, mentre altri segnali provenienti da altre molecole sono stati rimossi tramite un filtro Carr-Purcell-Meiboom-Gill. Ogni spettro è stato acquisito sommandone fino a 256 transienti. È stato assunto un ritardo di 8 secondi, tenendo in considerazione il tempo di rilassamento longitudinale di ogni protone sotto osservazione. Lo spettro ottenuto è stato aggiustato per le irregolarità come spiegato da Barbara et al., (150). I segnali del triptofano sono stati assegnati comparando il loro shift chimico e la molteplicità tramite Chenomx software data bank (ver. 8.1; Chenomx Inc., Edmonton, AB, Canada).

Analisi virologica

Le copie di HIV-1 RNA sono state misurate nel plasma utilizzando il sistema Versant kPCR (Siemens Healthcare Diagnostic, Inc., Tarrytown, NY). Il limite di rilevazione era di 37 copie/ml HIV-1 RNA.

Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state svolte tramite i software SPSS, versione 22.00 (IBM, Somers, NY, USA) ed R environment (version 3.2.2; the R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). I dati ottenuti al T0 e al T6 sono stati comparati usando il test di Wilcoxon per campioni appaiati. I risultati, tranne dove espressamente specificato, sono

stati riportati come mediane, ranges e percentuali. Un p-value < 0.05 è stato considerato come statisticamente significativo.

Tutti i grafici sono stati generati usando il software GraphPad Prism (version 5.00; GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

RISULTATI

Popolazione studio

Tutti i partecipanti allo studio erano uomini caucasici (età [media/range]: 42/22-53 anni) ed hanno iniziato la cART durante l'infezione cronica da HIV-1 (conteggio delle cellule T di CD4+ al basale (mediana/IQR): 255/42,75-406,75 cellule/mm³, copie basali di HIV-1 RNA [mediana/IQR]: 5,0/4,81-5,61 Log/ml). Tutti i pazienti erano sotto terapia ART da almeno 6 anni ed erano soppressi virologicamente (<37 copie HIV-1 RNA/ml) da almeno un anno e il numero di cellule CD4+ mediana era di 674 cellule/mm³ (IQR, 564-824 cellule/mm³).

Tollerabilità del prodotto e sicurezza

In tutti i partecipanti allo studio, l'adesione auto-segnalata alla supplementazione probiotica è stata eccellente e non sono state riportate reazioni avverse da parte dei pazienti o identificate dai medici. Tutti i soggetti hanno mantenuto una carica virale non rilevabile dopo l'assunzione dei probiotici e il numero mediano di linfociti T CD4+ era di 683 cellule/mm³ (IQR, 610-818 cellule/mm³). Per valutare se tutti i pazienti con infezione da HIV-1 erano conformi al protocollo, abbiamo misurato i livelli di *Bifidobacteria* spp. in campioni di feci raccolti prima, dopo 2 e 6 mesi di trattamento e abbiamo riscontrato che i *Bifidobacteria* spp. fecali aumentavano significativamente in tutti i pazienti rispetto al loro basale prima del trattamento, a partire da due mesi di integrazione (p=0,019) rimanendo stabile per tutto lo studio (Figura 11), confermando l'aderenza dei pazienti al regime. Box e whisker plots sono basati sulle copie del gene in Log 16S rRNA per grammo di campione. La linea orizzontale al centro di ogni casella rappresenta la mediana, mentre i bordi superiore e inferiore della casella rappresentano rispettivamente il 75% e il 25% percentili. P <0,05 (T0 vs T2); P <0,05 (T0 vs T6), utilizzando il test Wilcoxon.

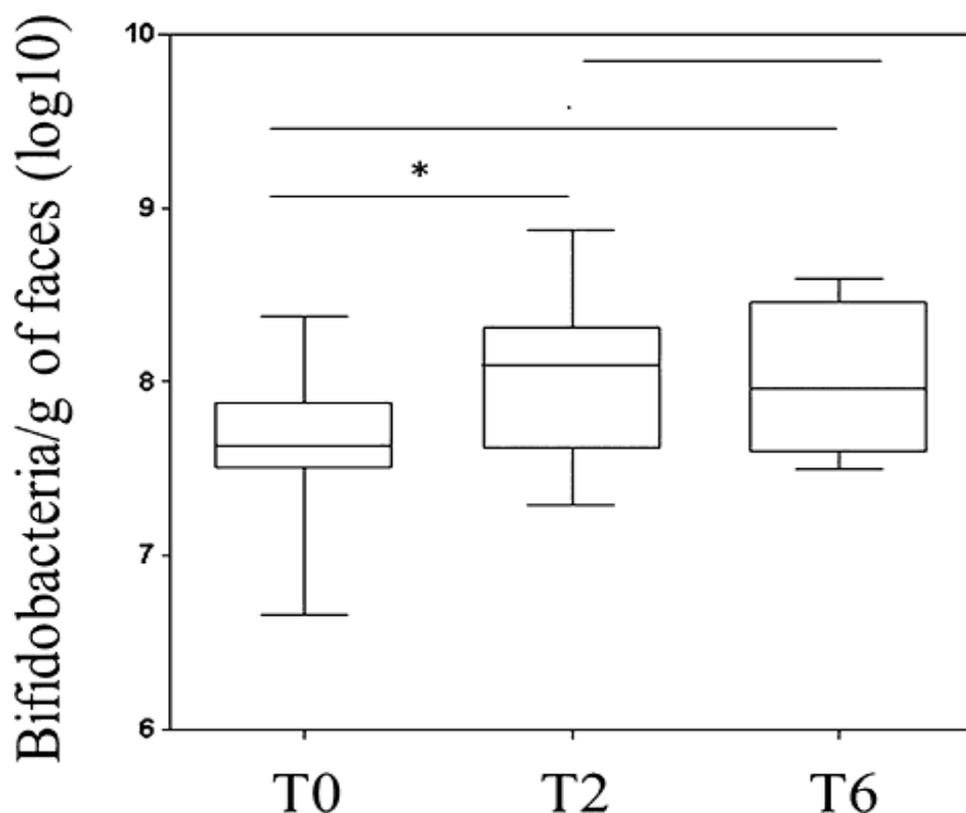


Figura 11: Bifidobatteri nei campioni fecali di soggetti infetti da HIV-1 durante la fase iniziale (T0) e dopo 2 (T2) e 6 mesi (T6) di integrazione probiotica

Immunoattivazione

In prima analisi abbiamo valutato i livelli di immunoattivazione dei PBMC e degli LPL, misurando la frequenza dei linfociti T CD4+ esprimenti CD38+ ed HLA-DR+ prima (T0) e dopo 6 mesi di supplementazione probiotica (T6).

Considerando i PBMC, è stata osservata una riduzione significativa dei livelli di linfociti T CD4+CD38+HLA-DR+ al T6 (mediana: 0.18 [IQR: 0.04-0.32]) in confronto al T0 (mediana: 0.80 [IQR: 0.37-2.16]); $p = 0.008$.

Lo stesso andamento è stato osservato anche nei linfociti della lamina propria, dove i livelli di immunoattivazione diminuiscono al T6 (mediana: 0.5 [IQR: 1.8-0.1]) rispetto al T0 (mediana: 1.9 [IQR: 5.8-1.5]); $p = 0.005$.

Le frequenze di espressione dei marker di immunoattivazione in PBMC ed LPL sono osservabili rispettivamente nelle Figure 12 e 13.

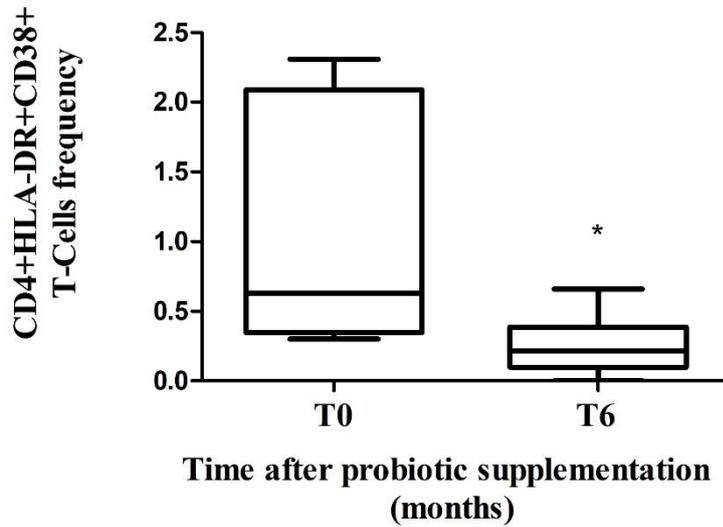


Fig.12 Frequenza di espressione dei linfociti T CD4+CD38+HLA-DR+ nei PBMC di 30 soggetti con infezione da HIV-1 prima (T0) e dopo sei mesi (T6) di supplementazione probiotica. * $p < 0.05$

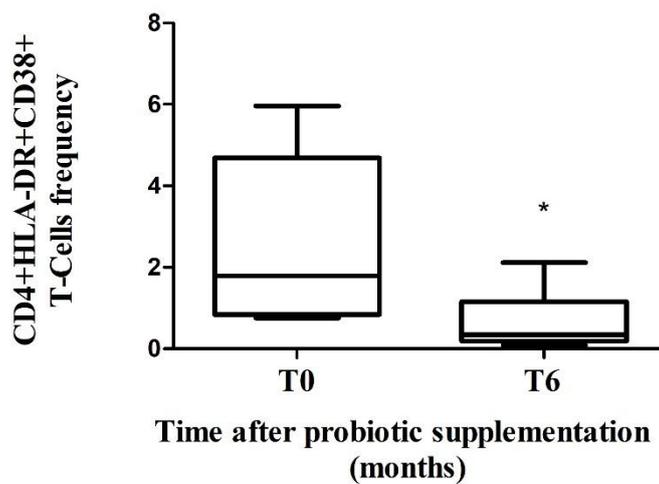


Fig.13 Frequenza di espressione dei linfociti T CD4+CD38+HLA-DR+ negli LPL di 30 soggetti con infezione da HIV-1 prima (T0) e dopo sei mesi (T6) di supplementazione probiotica. * $p < 0.05$

IFN γ mRNA

L'attivazione del sistema immunitario genera la forte produzione di IFN γ , principalmente nelle cellule dendritiche e nei linfociti. In seguito alla riduzione dei livelli di immunoattivazione riscontrati dopo 6 mesi di supplementazione probiotica, abbiamo valutato gli effetti sull'espressione dell'mRNA di IFN γ sia nei PBMC che negli LPL. Come mostrato in Figura 14, nei PBMC è stata osservata una riduzione dei livelli di mRNA di IFN γ al T6 (mediana: 8.60 [IQR: 2.06-23.80]) rispetto al T0 (mediana: 1.06 [IQR: 0.32-2.97]); $p = 0.09$, sebbene questo risultato non raggiunga la significatività statistica. Allo stesso modo, negli LPL osserviamo una riduzione significativa dell'mRNA di IFN γ al T6 (mediana: 0.06 [IQR: 0.01-0.2]) rispetto al T0 (mediana: 0.7 [IQR: 3.1- 0.18]); $p=0.01$, Figura 15.

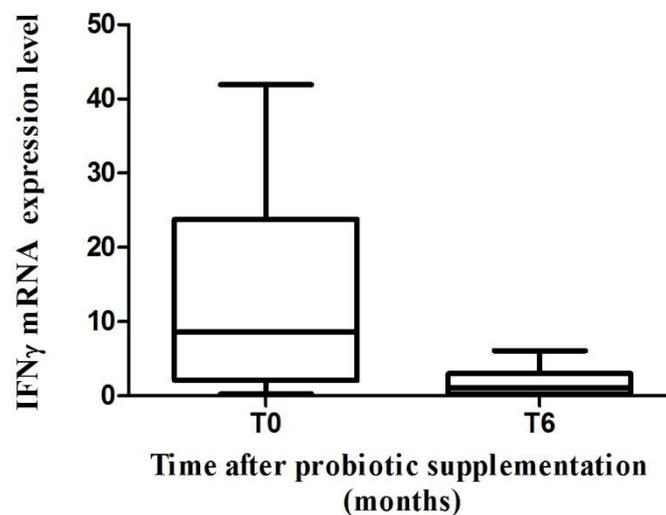


Fig.14 Livelli di espressione dell'mRNA di IFN γ nei PBMC in 30 soggetti con infezione da HIV-1 prima (T0) e dopo sei mesi (T6) di supplementazione probiotica. * $p<0.05$

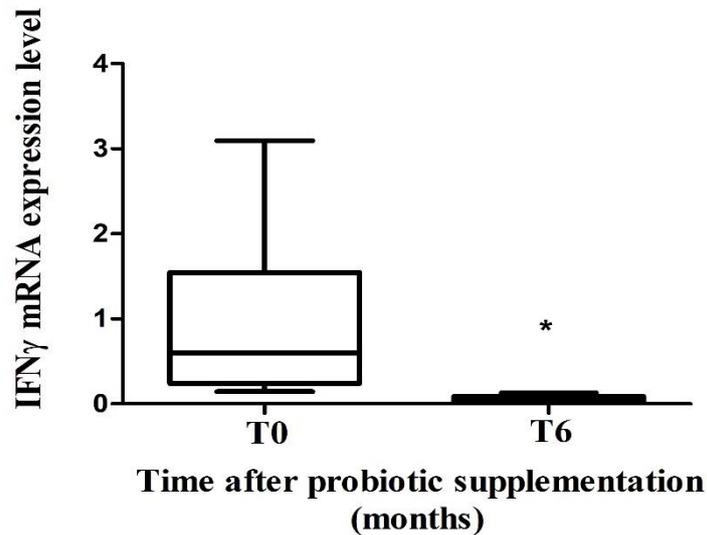


Fig.15 Livelli di espressione dell'mRNA di IFN γ negli LPL in 30 soggetti con infezione da HIV-1 prima (T0) e dopo sei mesi (T6) di supplementazione probiotica. * $p < 0.05$

IDO-1 mRNA

Poiché l'IFN γ è il principale attivatore di IDO-1, abbiamo misurato i livelli di mRNA di quest'ultimo, sia nei PBMC che negli LPL, per verificare se ci fosse una modulazione o meno in seguito alla riduzione dei livelli di mRNA di IFN γ .

In prima analisi abbiamo verificato una riduzione significativa dei livelli di mRNA di IDO-1 nei PBMC al T6 (mediana: 0.0034 [IQR: 0.001-0.006]) rispetto al T0 (mediana: 0.052 [IQR: 0.0024-0.18]), $p = 0.04$, Figura 16.

Anche a livello intestinale si osserva una riduzione significativa di mRNA di IDO-1, come suggerito dall'analisi sugli LPL, nei quali si ha una ridotta espressione al T6 (mediana: 0.01 [IQR: 0.008-0.05]) rispetto a quella osservata al T0 (mediana: 0.05 [IQR: 0.31-0.02]), $p = 0.002$, Figura 17.

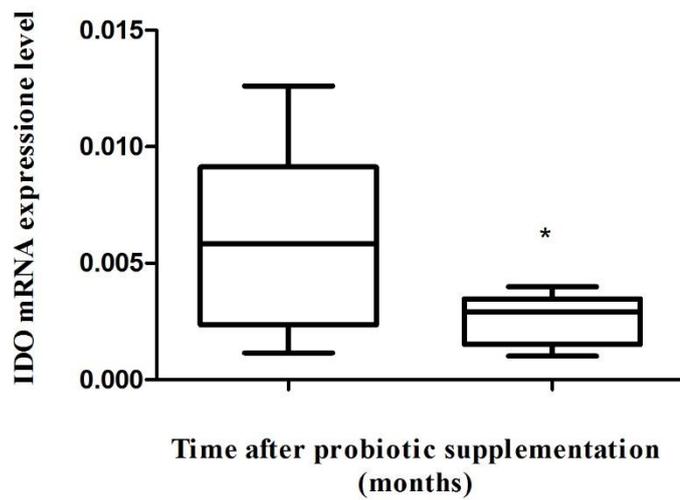


Fig.16 Livelli di espressione dell'mRNA di IDO-1 nei PBMC di 30 soggetti con infezione da HIV-1 prima (T0) e dopo sei mesi (T6) di supplementazione probiotica. * $p < 0.05$

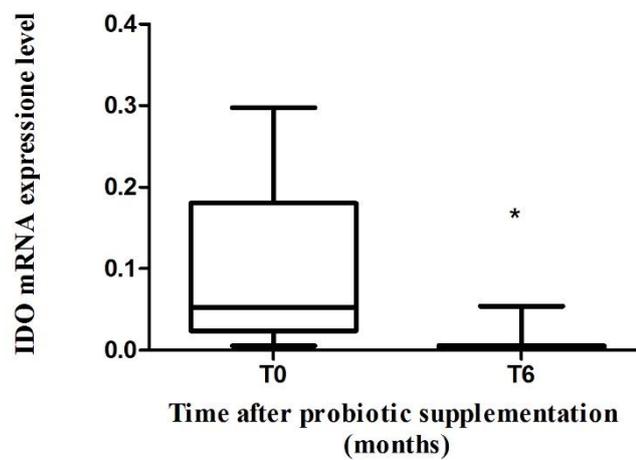


Fig.17 Livelli di espressione dell'mRNA di IDO-1 negli LPL di 30 soggetti con infezione da HIV-1 prima (T0) e dopo sei mesi (T6) di supplementazione probiotica. * $p < 0.05$

Quantificazione del triptofano

Per valutare se la riduzione di IDO-1 osservata in PBMC ed LPL possa influenzare il metabolismo del triptofano, abbiamo quantificato i livelli di triptofano nei campioni di feci della nostra popolazione, attraverso un'analisi metabolomica usando la $^1\text{H-NMR}$.

I risultati ci mostrano una significativa riduzione dei livelli di triptofano nelle feci dopo 6 mesi di supplementazione probiotica T6 (mediana: 64.3 [IQR: 76-58]) rispetto al T0 (mediana: 61 [IQR: 77-63]), $p = 0.031$, Figura 18.

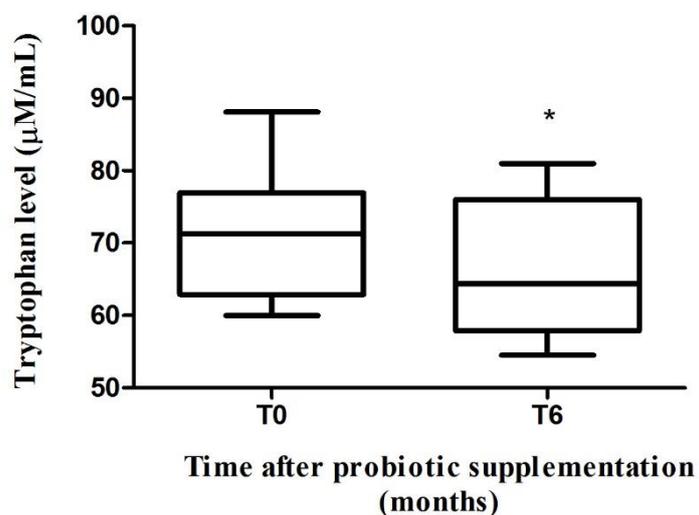


Fig.18 Livelli di triptofano nelle feci di 30 soggetti con infezione da HIV-1 prima (T0) e dopo sei mesi (T6) di supplementazione probiotica. * $p < 0.05$

Serotonina

Per meglio comprendere la relazione fra la supplementazione probiotica, il metabolismo del triptofano e la funzione neurocognitiva, abbiamo valutato le variazioni nei livelli di serotonina nel siero prima e dopo 6 mesi di supplementazione probiotica.

I risultati ci hanno permesso di osservare un aumento significativo dei livelli di serotonina nel siero al T6 (mediana: 185.3ng/mL [IQR: 292 – 104.4]) se comparato col T0 (mediana: 80.04ng/mL [IQR: 148.3 – 45.11]), $p = 0.008$, Figura 19. Tali risultati ci suggeriscono la possibilità di un possibile modulazione della via metabolica del triptofano verso la classica via di sintesi della serotonina, piuttosto che verso la via delle chinurenine guidata dall'azione di IDO-1.

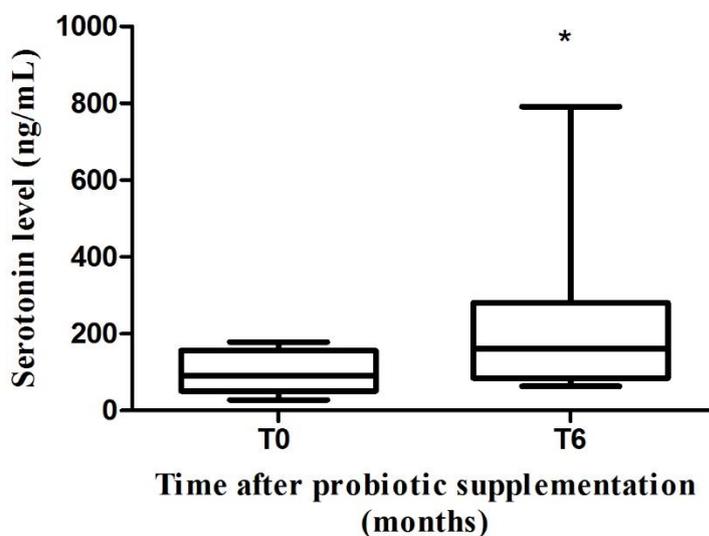


Fig.19 Livelli di serotonina nel siero di 30 soggetti con infezione da HIV-1 prima (T0) e dopo sei mesi (T6) di supplementazione probiotica. * $p < 0.05$

Neopterin e infiammazione nel SNC

Per valutare se la supplementazione probiotica era in grado di agire sulla modulazione dell'infiammazione a livello del SNC, abbiamo misurato i livelli di neopterin nel liquido cefalorachidiano dei 30 pazienti della nostra popolazione HIV-1 positiva.

Abbiamo trovato una significativa riduzione della neopterin al T6 (mediana: 25nmol/L [IQR: 42 – 19]) rispetto al T0 (mediana: 38 nmol/L [IQR: 63 – 23]), $p = 0.004$, Figura 20.

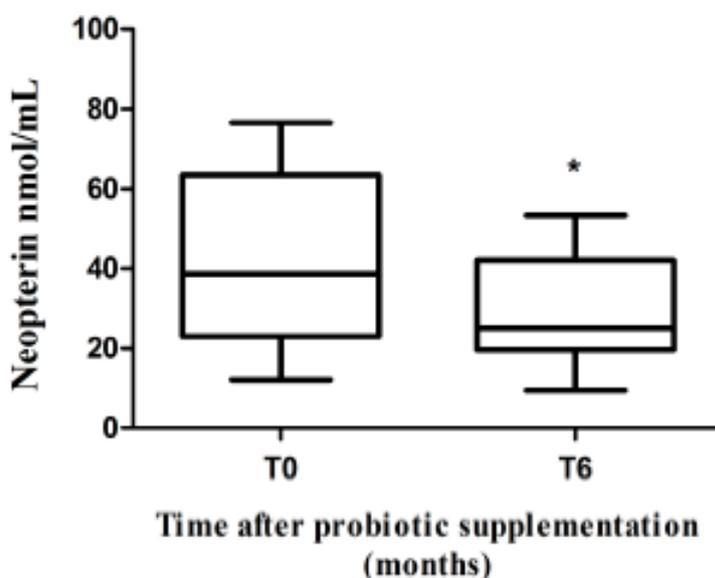


Fig.20 Quantificazione della neopterin nel liquor di 30 soggetti con infezione da HIV-1 prima (T0) e dopo sei mesi (T6) di supplementazione probiotica. * $p < 0.05$

In seguito abbiamo valutato se esistesse una relazione fra i livelli diIDO-1 nel tratto gastrointestinale e l'infiammazione a livello del SNC, misurando la correlazione fra l'mRNA diIDO-1 negli LPL e la neopterin nel liquor.

Come è mostrato in Tabella 2, al T0 è presente una forte correlazione fra le due variabili

($r = 0.94$; $p = 0.004$) che aumentano entrambe in maniera consistente. In seguito a supplementazione probiotica invece, si ha una significativa riduzione dell'mRNA di IDO-1 negli LPL e della neopterin nel liquor al T6 ($r = -0.31$; $p = 0.5$), con la perdita della correlazione fra le due variabili.

Questi dati suggeriscono che la modulazione del microbiota tramite probiotico può modulare il metabolismo del triptofano, giocando un ruolo importante anche nell'infiammazione mediata dalla neopterin nel SNC.

	IDO mRNA T0	IDO mRNA T6
Neopterin T0	$p = 0.004$; $r = 0.94$	NA
Neopterin T6	NA	$p = 0.54$; $r = -0.31$

Spearman's rho coefficient was used to assess the correlations between neopterin and IDO levels; significant correlations are highlighted in bold. NA = not applicable.

Tabella 2. Correlazione tra i livelli di espressione dell'mRNA di IDO-1 negli LPL e di neopterin nel liquor di 30 soggetti con infezione da HIV-1 prima (T0) e dopo sei mesi (T6) di supplementazione probiotica. * $p < 0.05$

DISCUSSIONE

In questo studio abbiamo valutato la relazione fra la supplementazione probiotica e la modulazione dell'asse intestino-cervello in pazienti con infezione da HIV-1 in soppressione virologica e sotto terapia cART, con particolare attenzione a quello che è il ruolo del metabolismo dell'enzima IDO-1 nel regolare le vie metaboliche del triptofano, della serotonina e dell'infiammazione a livello del SNC.

Il primo effetto rilevante osservato in seguito alla supplementazione con probiotico per sei mesi è stato la riduzione dei livelli di immunoattivazione, espressi come frequenza di linfociti T CD4+CD38+HLA-DR+, nel sangue periferico e nell'intestino.

Una delle ipotesi principali che spiega questa evidenza, è il fatto che i probiotici possano competere con le altre specie batteriche che attivano il sistema immunitario, e che essi possano agire down-modulando i TLR e l'attivazione immunitaria ad essi legata (117). La riduzione dell'attivazione dei linfociti T porta ad un decremento dei livelli di espressione dell'mRNA di IFN γ sia nell'intestino che nel periferico, sebbene in quest'ultimo non raggiunga la significatività statistica.

Alla luce di ciò, abbiamo poi misurato i livelli di espressione dell'mRNA di IDO-1 sia nei PBMC che negli LPL. Infatti, è ben noto che l'attività di questo enzima è influenzata dall'IFN γ , che è la citochina che lo attiva maggiormente, ed è legato al disequilibrio che si verifica nel rapporto tra Th17 e T regolatorie (151).

I nostri risultati hanno dimostrato una riduzione significativa dei livelli di mRNA di IDO-1 sia nei PBMC che negli LPL in seguito a supplementazione probiotica. Questo dato risulta pertanto molto interessante, poiché è evidente che nei soggetti con infezione da HIV-1, ci sia una forte alterazione del metabolismo del triptofano, di cui IDO-1 è uno degli attori principali (115).

Con l'obiettivo di indagare se la riduzione di IDO-1 potesse avere delle conseguenze sulla via metabolica del triptofano, abbiamo focalizzato la nostra attenzione sui livelli di serotonina nel siero e triptofano nelle feci.

Uno dei principali effetti dell'attività di IDO-1 infatti, è lo switch della via metabolica del triptofano, che invece di essere utilizzato per la produzione di serotonina, entra nella via metabolica delle chinurenine, generando anche metaboliti neurotossici. Pertanto IDO-1 risulta essere un enzima cruciale nell'insorgenza della HAND nei soggetti HIV-1 positivi (103).

I nostri risultati mostrano un significativo aumento della serotonina nel siero, con la

concomitante riduzione del quantitativo di triptofano nelle feci dopo 6 mesi di supplementazione probiotica.

Questi risultati, analizzati nel complesso mostrano come una modulazione dell'enzima IDO-1 possa giocare un ruolo chiave nel regolare le vie metaboliche del triptofano. Sembra infatti, che la riduzione della sua espressione possa favorire un ripristino della corretta via metabolica che dal triptofano porta alla produzione della serotonina, il cui incremento è stato osservato nel siero dei nostri pazienti. Inoltre, un maggiore utilizzo del triptofano nella via di biosintesi della serotonina, sembra essere coadiuvata dalla significativa riduzione dello stesso amminoacido nelle feci al T6.

Una possibile speculazione sull'elevata quantità di triptofano espulso nelle feci al T0 è data dal fatto che, IDO-1 potrebbe non solo favorire l'entrata del triptofano nella via delle chinurenina, ma in qualche modo potrebbe essere coinvolto anche nell'inibizione della via di produzione della serotonina, favorendo quindi una maggiore escrezione di triptofano nelle feci.

L'impatto dei probiotici sul microbiota, inoltre, è fondamentale anche perché in grado di favorire la colonizzazione di batteri come i Bifidobatteri o i Lattobacilli, popolazioni naturalmente presenti nella microflora intestinale. Queste popolazioni batteriche sono molto meno presenti nell'intestino dei soggetti con infezione da HIV-1, i quali invece hanno elevate quantità di Proteobatteri, Actinobatteri ed Enterobatteri (152).

Uno degli effetti principali che questi cambiamenti hanno sul metabolismo del triptofano, è ben descritto in letteratura. Infatti le specie batteriche che colonizzano l'intestino di soggetti HIV-1 positivi sono essi stessi in grado di alterare il metabolismo del triptofano, producendo enzimi analoghi ad IDO-1, che utilizzano il triptofano per la produzione di chinurenine (115). Al contrario, i Lactobacilli soprattutto, sono in grado di bloccare la produzione di IDO-1, mantenendo quindi una normale regolazione delle vie metaboliche del triptofano (153).

Inoltre, IDO-1 sembra essere fortemente correlato all'infiammazione nel SNC che si verifica in HIV-1. Infatti la produzione di sostanze neurotossiche derivanti dalla forte attivazione del pathway molecolare delle chinurenine, è associato con lo sviluppo di disordini neurocognitivi (104,154).

Questa condizione clinica si verifica anche e soprattutto durante l'infezione da HIV-1 (155,156), dove uno dei principali marker di infiammazione a livello del SNC è la neopterina. Nel nostro studio abbiamo misurato i livelli di neopterina nel liquor prima e dopo 6 mesi di supplementazione probiotica, osservando una riduzione significativa della

stessa. La neopterinina è attivata dall'IFN γ . Poiché anche IDO-1 è attivato dall'IFN γ , abbiamo valutato se fra neopterinina e IDO-1 ci fosse una correlazione ai due tempi. Al T0, infatti, osserviamo una correlazione positiva e statisticamente significativa fra le due variabili. Questa condizione sembra favorire la produzione di molecole neurotossiche e un aumento dell'infiammazione a livello del SNC. Tale correlazione invece non è più presente al T6, dove in seguito alla riduzione di IFN γ , si osserva la down-regolazione dell'mRNA di IDO-1 e un abbassamento dei livelli di neopterinina.

Inoltre la neopterinina è fortemente associata con la comparsa di disordini neurocognitivi (157) e la sua riduzione sembra essere un fattore chiave nel contrastarne l'insorgenza. La supplementazione probiotica sembra favorire questa riduzione, sia attraverso una riduzione dell'immunoattivazione e quindi della produzione di IFN γ , che fa aumentare i livelli di neopterinina, sia attraverso una modulazione dell'attività di IDO-1 e delle molecole neurotossiche che ne derivano, le quali potrebbero favorire l'infiammazione a carico del SNC.

Inoltre è ipotizzabile che la neopterinina misurata nel liquor sia correlata alla microflora intestinale. Infatti alcuni studi descrivono il tratto gastrointestinale come "l'impalcatura che collega il SNC e il microbiota"(158). Infatti è ben noto che l'infezione da HIV-1 influenza la permeabilità intestinale (159,160) e l'immunità mucosale (161,162), anche se i meccanismi che ci sono alla base sono ancora poco noti, ma tra questi sta emergendo sempre di più il ruolo del metabolismo del triptofano.

Ridurre l'attivazione del pathway di IDO-1 attraverso la supplementazione probiotica, potrebbe rompere il circolo vizioso che si instaura nell'asse intestino-cervello e prevenire i disturbi neurocognitivi che insorgono nei pazienti con infezione da HIV-1.

Questo studio presenta delle limitazioni, come la mancanza della valutazione dell'attività di IDO-1 che viene valutata mediante il rapporto tra chinurenina e triptofano e la mancata quantificazione delle principali molecole prodotte dal metabolismo delle chinurenine, come l'acido chinolinico e l'acido picolinico.

Inoltre, visto che il metabolismo del triptofano è fortemente influenzato dalle popolazioni batteriche che colonizzano l'intestino dei soggetti HIV-1 positivi (115), e poiché la riduzione di IDO-1 è associata con un aumento delle cellule Th17 nell'intestino, come è stato osservato di recente in modelli di primati con infezione da SIV (Simian Immunodeficiency Virus) trattati con probiotico per 6 mesi (153), sarebbe molto utile analizzare i cambiamenti nella composizione del microbiota di questi soggetti, dopo 6 mesi di supplementazione probiotica.

Infine, è molto probabile che non tutti i probiotici siano in grado di generare gli stessi effetti, poiché sono molti i prodotti disponibili e molto diverse sono la qualità e la quantità di batteri presenti in ognuno.

In conclusione, questo studio mette in evidenza la complessa relazione tra la supplementazione probiotica, l'infiammazione e il metabolismo del triptofano nei soggetti con infezione da HIV-1 trattati con cART. La supplementazione probiotica in questi soggetti è associata con la riduzione dell'immunoattivazione nel sangue periferico e nell'intestino, con la conseguente riduzione dell'espressione degli mRNA di IFN γ e di IDO-1, un aumento di serotonina nel siero, la riduzione del triptofano espulso nelle feci e la netta diminuzione della neopterinina nel liquor. Questi dati sembrano suggerire che l'azione del probiotico sul microbiota intestinale è in grado di modulare l'asse intestino-cervello, e più in particolare il metabolismo del triptofano, che sembra avere un ruolo chiave nell'insorgenza dei disturbi neurocognitivi associati all'infezione da HIV-1.

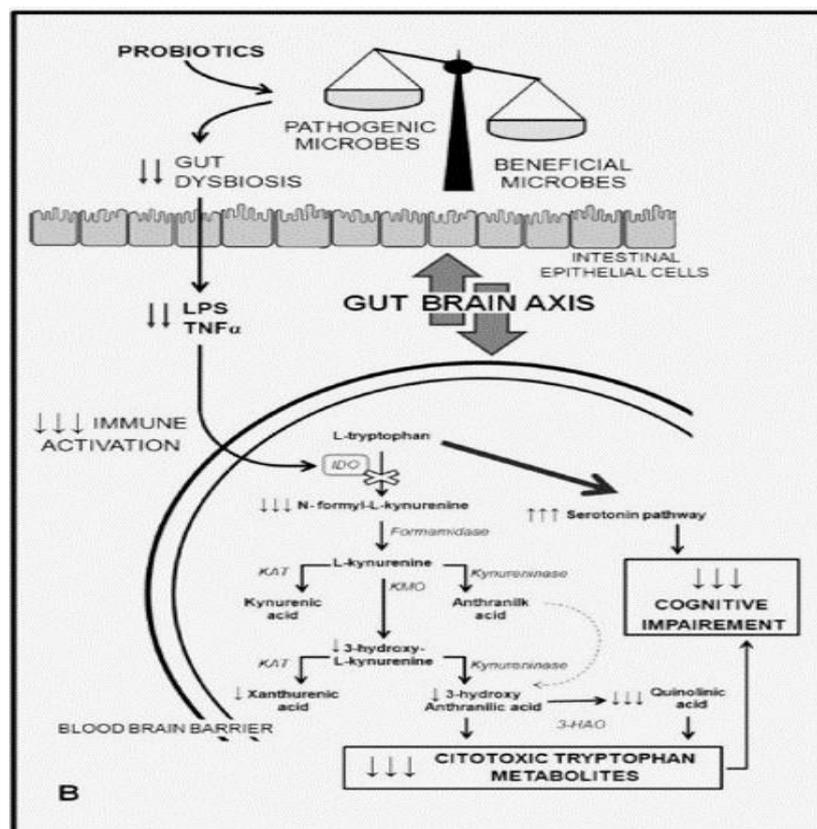


Fig.21 Risultati dello studio.

BIBLIOGRAFIA

1. AIDS_by_the_numbers_2015_en.pdf [Internet]. [cited 2018 Jun 21]. Available from: http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/AIDS_by_the_numbers_2015_en.pdf
2. Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science*. 2000 Jan 28;287(5453):607–14.
3. Heeney JL, Dalgleish AG, Weiss RA. Origins of HIV and the evolution of resistance to AIDS. *Science*. 2006 Jul 28;313(5786):462–6.
4. Clements JE, Zink MC. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections. *Clin Microbiol Rev*. 1996 Jan;9(1):100–17.
5. Chertova E, Chertov O, Coren LV, Roser JD, Trubey CM, Bess JW, et al. Proteomic and biochemical analysis of purified human immunodeficiency virus type 1 produced from infected monocyte-derived macrophages. *J Virol*. 2006 Sep;80(18):9039–52.
6. Role of the Gag Matrix Domain in Targeting Human Immunodeficiency Virus Type 1 Assembly [Internet]. [cited 2018 Jun 21]. Available from: <http://jvi.asm.org/content/74/6/2855>
7. Demirov DG, Freed EO. Retrovirus budding. *Virus Res*. 2004 Dec;106(2):87–102.
8. Masuda T, Kuroda MJ, Harada S. Specific and independent recognition of U3 and U5 att sites by human immunodeficiency virus type 1 integrase in vivo. *J Virol*. 1998 Oct;72(10):8396–402.
9. Spearman P, Wang JJ, Vander Heyden N, Ratner L. Identification of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein domains essential to membrane binding and particle assembly. *J Virol*. 1994 May;68(5):3232–42.
10. Engelman A, Mizuuchi K, Craigie R. HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer. *Cell*. 1991 Dec 20;67(6):1211–21.
11. Deacon NJ, Tsykin A, Solomon A, Smith K, Ludford-Menting M, Hooker DJ, et al. Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science*. 1995 Nov 10;270(5238):988–91.
12. Kirchhoff F, Greenough TC, Brettler DB, Sullivan JL, Desrosiers RC. Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *N Engl J Med*. 1995 Jan 26;332(4):228–32.
13. Chiu Y-L, Soros VB, Kreisberg JF, Stopak K, Yonemoto W, Greene WC. Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells. *Nature*. 2005 May 5;435(7038):108–14.
14. Stopak K, de Noronha C, Yonemoto W, Greene WC. HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol Cell*. 2003 Sep;12(3):591–601.

15. Binette J, Cohen EA. Recent advances in the understanding of HIV-1 Vpu accessory protein functions. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metab Disord*. 2004 Dec;4(4):297–307.
16. Forshey BM, von Schwedler U, Sundquist WI, Aiken C. Formation of a human immunodeficiency virus type 1 core of optimal stability is crucial for viral replication. *J Virol*. 2002 Jun;76(11):5667–77.
17. Briggs JAG, Simon MN, Gross I, Kräusslich H-G, Fuller SD, Vogt VM, et al. The stoichiometry of Gag protein in HIV-1. *Nat Struct Mol Biol*. 2004 Jul;11(7):672–5.
18. Panganiban AT, Temin HM. The terminal nucleotides of retrovirus DNA are required for integration but not virus production. *Nature*. 1983 Nov 10;306(5939):155–60.
19. Colicelli J, Goff SP. Mutants and pseudorevertants of Moloney murine leukemia virus with alterations at the integration site. *Cell*. 1985 Sep;42(2):573–80.
20. Cobrinik D, Katz R, Terry R, Skalka AM, Leis J. Avian sarcoma and leukosis virus pol-endonuclease recognition of the tandem long terminal repeat junction: minimum site required for cleavage is also required for viral growth. *J Virol*. 1987 Jun;61(6):1999–2008.
21. Pruss D, Bushman FD, Wolffe AP. Human immunodeficiency virus integrase directs integration to sites of severe DNA distortion within the nucleosome core. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jun 21;91(13):5913–7.
22. Popov S, Popova E, Inoue M, Göttlinger HG. Human immunodeficiency virus type 1 Gag engages the Bro1 domain of ALIX/AIP1 through the nucleocapsid. *J Virol*. 2008 Feb;82(3):1389–98.
23. Dussupt V, Javid MP, Abou-Jaoudé G, Jadwin JA, de La Cruz J, Nagashima K, et al. The nucleocapsid region of HIV-1 Gag cooperates with the PTAP and LYPXnL late domains to recruit the cellular machinery necessary for viral budding. *PLoS Pathog*. 2009 Mar;5(3):e1000339.
24. Simon F, Maucière P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Müller-Trutwin MC, Saragosti S, et al. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med*. 1998 Sep;4(9):1032–7.
25. Renjifo B, Essex M. HIV-1 Subtypes and Recombinants. In: *AIDS in Africa* [Internet]. Springer, Boston, MA; 2002 [cited 2018 Jul 2]. p. 263–81. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/0-306-47817-X_16
26. Robertson DL, Sharp PM, McCutchan FE, Hahn BH. Recombination in HIV-1. *Nature*. 1995 Mar 9;374(6518):124–6.
27. Geretti AM. HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management. *Curr Opin Infect Dis*. 2006 Feb;19(1):1–7.
28. Kelly RJ, Gray RH, Sewankambo NK, Serwadda D, Wabwire-Mangen F, Lutalo T, et al. Age differences in sexual partners and risk of HIV-1 infection in rural Uganda. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999. 2003 Apr 1;32(4):446–51.

29. Erice A, Rhame FS, Heussner RC, Dunn DL, Balfour HH. Human immunodeficiency virus infection in patients with solid-organ transplants: report of five cases and review. *Rev Infect Dis.* 1991 Aug;13(4):537–47.
30. Henrard DR, Phillips J, Windsor I, Fortenberry D, Korte L, Fang C, et al. Detection of human immunodeficiency virus type 1 p24 antigen and plasma RNA: relevance to indeterminate serologic tests. *Transfusion (Paris).* 1994 May;34(5):376–80.
31. Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS. The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med.* 1993 04;328(5):327–35.
32. Blankson JN, Persaud D, Siliciano RF. The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. *Annu Rev Med.* 2002;53:557–93.
33. Chun TW, Davey RT, Ostrowski M, Shawn Justement J, Engel D, Mullins JI, et al. Relationship between pre-existing viral reservoirs and the re-emergence of plasma viremia after discontinuation of highly active anti-retroviral therapy. *Nat Med.* 2000 Jul;6(7):757–61.
34. Markowitz M, Jin X, Hurley A, Simon V, Ramratnam B, Louie M, et al. Discontinuation of antiretroviral therapy commenced early during the course of human immunodeficiency virus type 1 infection, with or without adjunctive vaccination. *J Infect Dis.* 2002 Sep 1;186(5):634–43.
35. Chun TW, Finzi D, Margolick J, Chadwick K, Schwartz D, Siliciano RF. In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency. *Nat Med.* 1995 Dec;1(12):1284–90.
36. Chun TW, Stuyver L, Mizell SB, Ehler LA, Mican JA, Baseler M, et al. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Nov 25;94(24):13193–7.
37. Alexaki A, Liu Y, Wigdahl B. Cellular reservoirs of HIV-1 and their role in viral persistence. *Curr HIV Res.* 2008 Sep;6(5):388–400.
38. Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B, et al. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med.* 2009 Aug;15(8):893–900.
39. O'Connor JL, Smith CJ, Lampe FC, Hill T, Gompels M, Hay P, et al. Failure to achieve a CD4+ cell count response on combination antiretroviral therapy despite consistent viral load suppression. *AIDS Lond Engl.* 2014 Mar 27;28(6):919–24.
40. Routy J-P, Nicolette C. Arcelis AGS-004 dendritic cell-based immunotherapy for HIV infection. *Immunotherapy.* 2010 Jul;2(4):467–76.
41. Jones T. Vacc-4x, a therapeutic vaccine comprised of four engineered peptides for the potential treatment of HIV infection. *Curr Opin Investig Drugs Lond Engl* 2000. 2010 Aug;11(8):964–70.
42. Lisziewicz J, Bakare N, Calarota SA, Bánhegyi D, Szlávik J, Ujhelyi E, et al. Single DermaVir immunization: dose-dependent expansion of precursor/memory T cells against all HIV antigens in HIV-1 infected individuals. *PLoS One.* 2012;7(5):e35416.

43. Vardas E, Stanescu I, Leinonen M, Ellefsen K, Pantaleo G, Valtavaara M, et al. Indicators of therapeutic effect in FIT-06, a Phase II trial of a DNA vaccine, GTU(®)-Multi-HIVB, in untreated HIV-1 infected subjects. *Vaccine*. 2012 Jun 8;30(27):4046–54.
44. Ensoli B, Bellino S, Tripiciano A, Longo O, Francavilla V, Marcotullio S, et al. Therapeutic immunization with HIV-1 Tat reduces immune activation and loss of regulatory T-cells and improves immune function in subjects on HAART. *PloS One*. 2010 Nov 11;5(11):e13540.
45. Nishio J, Honda K. Immunoregulation by the gut microbiota. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2012 Nov;69(21):3635–50.
46. Smith PM, Garrett WS. The gut microbiota and mucosal T cells. *Front Microbiol*. 2011;2:111.
47. Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2014 Mar;14(3):141–53.
48. Shukla SD, Budden KF, Neal R, Hansbro PM. Microbiome effects on immunity, health and disease in the lung. *Clin Transl Immunol*. 2017 Mar 10;6(3):e133.
49. Kucharzik T, Lügering N, Rautenberg K, Lügering A, Schmidt MA, Stoll R, et al. Role of M cells in intestinal barrier function. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;915:171–83.
50. Zeuthen LH, Fink LN, Frokiaer H. Epithelial cells prime the immune response to an array of gut-derived commensals towards a tolerogenic phenotype through distinct actions of thymic stromal lymphopoietin and transforming growth factor-beta. *Immunology*. 2008 Feb;123(2):197–208.
51. Baba N, Samson S, Bourdet-Sicard R, Rubio M, Sarfati M. Commensal bacteria trigger a full dendritic cell maturation program that promotes the expansion of non-Tr1 suppressor T cells. *J Leukoc Biol*. 2008 Aug;84(2):468–76.
52. Kim YS, Ho SB. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep*. 2010 Oct;12(5):319–30.
53. Rogier R, Koenders MI, Abdollahi-Roodsaz S. Toll-Like Receptor Mediated Modulation of T Cell Response by Commensal Intestinal Microbiota as a Trigger for Autoimmune Arthritis [Internet]. *Journal of Immunology Research*. 2015 [cited 2018 Jul 2]. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/jir/2015/527696/>
54. Abreu MT. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(2):131–44.
55. Cario E, Gerken G, Podolsky DK. Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. *Gastroenterology*. 2007 Apr;132(4):1359–74.
56. Melmed G, Thomas LS, Lee N, Tesfay SY, Lukasek K, Michelsen KS, et al. Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2003 Feb 1;170(3):1406–15.

57. Ashida H, Ogawa M, Kim M, Mimuro H, Sasakawa C. Bacteria and host interactions in the gut epithelial barrier. *Nat Chem Biol*. 2011 Dec 15;8(1):36–45.
58. Moreira APB, Texeira TFS, Ferreira AB, Peluzio M do CG, Alfenas R de CG. Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. *Br J Nutr*. 2012 Sep;108(5):801–9.
59. Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature*. 2007 Oct 18;449(7164):811–8.
60. Erwin G, Zoetendal WM de V, Antoon DL, Akkermans, Wilma M, Akkermans-van Vliet, J, Arjan GM de Visser. The Host Genotype Affects the Bacterial Community in the Human Gastrointestinal Tract. *Microb Ecol Health Dis*. 2001 Jan 1;13(3):129–34.
61. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*. 2007 Jul;5(7):e177.
62. Lee YK, Mazmanian SK. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science*. 2010 Dec 24;330(6012):1768–73.
63. Mason KL, Huffnagle GB, Noverr MC, Kao JY. Overview of gut immunology. *Adv Exp Med Biol*. 2008;635:1–14.
64. Guarner F, Malagelada J-R. Gut flora in health and disease. *Lancet Lond Engl*. 2003 Feb 8;361(9356):512–9.
65. Benton D, Williams C, Brown A. Impact of consuming a milk drink containing a probiotic on mood and cognition. *Eur J Clin Nutr*. 2007 Mar;61(3):355–61.
66. Logan AC, Venket Rao A, Irani D. Chronic fatigue syndrome: lactic acid bacteria may be of therapeutic value. *Med Hypotheses*. 2003 Jun;60(6):915–23.
67. Williams B, Landay A, Presti RM. Microbiome alterations in HIV infection a review. *Cell Microbiol*. 2016 May;18(5):645–51.
68. Patel RM, Lin PW. Developmental biology of gut-probiotic interaction. *Gut Microbes*. 2010;1(3):186–95.
69. Ohland CL, Macnaughton WK. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010 Jun;298(6):G807-819.
70. Sanders ME, Akkermans LM, Haller D, Hammerman C, Heimbach J, Hörmannspenger G, et al. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes*. 2010;1(3):164–85.
71. Cain AM, Karpa KD. Clinical utility of probiotics in inflammatory bowel disease. *Altern Ther Health Med*. 2011 Feb;17(1):72–9.
72. Meijer BJ, Dieleman LA. Probiotics in the treatment of human inflammatory bowel diseases: update 2011. *J Clin Gastroenterol*. 2011 Nov;45 Suppl:S139-144.
73. Sheil B, Shanahan F, O'Mahony L. Probiotic effects on inflammatory bowel disease.

J Nutr. 2007;137(3 Suppl 2):819S-24S.

74. Dughera L, Elia C, Navino M, Cisarò F, ARMONIA Study Group. Effects of symbiotic preparations on constipated irritable bowel syndrome symptoms. *Acta Bio-Medica Atenei Parm.* 2007 Aug;78(2):111–6.
75. Vanderhoof JA, Mitmesser SH. Probiotics in the management of children with allergy and other disorders of intestinal inflammation. *Benef Microbes.* 2010 Nov;1(4):351–6.
76. Ozdemir O. Various effects of different probiotic strains in allergic disorders: an update from laboratory and clinical data. *Clin Exp Immunol.* 2010 Jun;160(3):295–304.
77. Heaton RK, Clifford DB, Franklin DR, Woods SP, Ake C, Vaida F, et al. HIV-associated neurocognitive disorders persist in the era of potent antiretroviral therapy: CHARTER Study. *Neurology.* 2010 Dec 7;75(23):2087–96.
78. Tozzi V, Balestra P, Bellagamba R, Corpolongo A, Salvatori MF, Visco-Comandini U, et al. Persistence of neuropsychologic deficits despite long-term highly active antiretroviral therapy in patients with HIV-related neurocognitive impairment: prevalence and risk factors. *J Acquir Immune Defic Syndr 1999.* 2007 Jun 1;45(2):174–82.
79. Fois AF, Brew BJ. The Potential of the CNS as a Reservoir for HIV-1 Infection: Implications for HIV Eradication. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2015 Jun;12(2):299–303.
80. Brown A. Understanding the MIND phenotype: macrophage/microglia inflammation in neurocognitive disorders related to human immunodeficiency virus infection. *Clin Transl Med.* 2015;4:7.
81. Gelman IH, Zhang J, Hailman E, Hanafusa H, Morse SS. Identification and evaluation of new primer sets for the detection of lentivirus proviral DNA. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1992 Dec;8(12):1981–9.
82. Fischer-Smith T, Bell C, Croul S, Lewis M, Rappaport J. Monocyte/macrophage trafficking in acquired immunodeficiency syndrome encephalitis: lessons from human and nonhuman primate studies. *J Neurovirol.* 2008 Aug;14(4):318–26.
83. Ancuta P, Kamat A, Kunstman KJ, Kim E-Y, Autissier P, Wurcel A, et al. Microbial translocation is associated with increased monocyte activation and dementia in AIDS patients. *PloS One.* 2008 Jun 25;3(6):e2516.
84. Hagberg L, Cinque P, Gisslen M, Brew BJ, Spudich S, Bestetti A, et al. Cerebrospinal fluid neopterin: an informative biomarker of central nervous system immune activation in HIV-1 infection. *AIDS Res Ther.* 2010 Jun 3;7:15.
85. Fuchs D, Chiodi F, Albert J, Asjö B, Hagberg L, Hausen A, et al. Neopterin concentrations in cerebrospinal fluid and serum of individuals infected with HIV-1. *AIDS Lond Engl.* 1989 May;3(5):285–8.
86. Edén A, Price RW, Spudich S, Fuchs D, Hagberg L, Gisslén M. Immune activation of the central nervous system is still present after >4 years of effective highly active

antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* 2007 Dec 15;196(12):1779–83.

87. Griffin DE, McArthur JC, Cornblath DR. Neopterin and interferon-gamma in serum and cerebrospinal fluid of patients with HIV-associated neurologic disease. *Neurology.* 1991 Jan;41(1):69–74.
88. Sönnnerborg AB, von Stedingk LV, Hansson LO, Strannegård OO. Elevated neopterin and beta 2-microglobulin levels in blood and cerebrospinal fluid occur early in HIV-1 infection. *AIDS Lond Engl.* 1989 May;3(5):277–83.
89. Yilmaz A, Yiannoutsos CT, Fuchs D, Price RW, Crozier K, Hagberg L, et al. Cerebrospinal fluid neopterin decay characteristics after initiation of antiretroviral therapy. *J Neuroinflammation.* 2013 May 10;10:62.
90. Montiel-Castro AJ, González-Cervantes RM, Bravo-Ruiseco G, Pacheco-López G. The microbiota-gut-brain axis: neurobehavioral correlates, health and sociality. *Front Integr Neurosci.* 2013 Oct 7;7:70.
91. Boasso A. Wounding the immune system with its own blade: HIV-induced tryptophan catabolism and pathogenesis. *Curr Med Chem.* 2011;18(15):2247–56.
92. Boasso A, Shearer GM, Chougnet C. Immune dysregulation in human immunodeficiency virus infection: know it, fix it, prevent it? *J Intern Med.* 2009 Jan;265(1):78–96.
93. Mudd JC, Brenchley JM. Gut Mucosal Barrier Dysfunction, Microbial Dysbiosis, and Their Role in HIV-1 Disease Progression. *J Infect Dis.* 2016 Oct 1;214(Suppl 2):S58–66.
94. Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol.* 2004 Oct;4(10):762–74.
95. Wood KJ, Sawitzki B. Interferon gamma: a crucial role in the function of induced regulatory T cells in vivo. *Trends Immunol.* 2006 Apr;27(4):183–7.
96. Bipath P, Levay PF, Viljoen M. Tryptophan depletion in context of the inflammatory and general nutritional status of a low-income South African HIV-infected population. *J Health Popul Nutr.* 2016 Feb 17;35:5.
97. Scheri GC, Fard SN, Schietroma I, Mastrangelo A, Pinacchio C, Giustini N, et al. Modulation of Tryptophan/Serotonin Pathway by Probiotic Supplementation in Human Immunodeficiency Virus–Positive Patients: Preliminary Results of a New Study Approach. *Int J Tryptophan Res IJTR* [Internet]. 2017 May 30 [cited 2018 Jul 3];10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5457170/>
98. Richard DM, Dawes MA, Mathias CW, Acheson A, Hill-Kapturczak N, Dougherty DM. L-Tryptophan: Basic Metabolic Functions, Behavioral Research and Therapeutic Indications. *Int J Tryptophan Res IJTR.* 2009 Mar 23;2:45–60.
99. Fuchs D, Jäger H, Popescu M, Reibnegger G, Werner ER, Dierich MP, et al. Immune activation markers to predict AIDS and survival in HIV-1 seropositives. *Immunol Lett.* 1990 Oct 1;26(1):75–9.

100. Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER, Werner-Felmayer G, Dierich MP, et al. Interferon-gamma concentrations are increased in sera from individuals infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1989;2(2):158–62.
101. Wirleitner B, Reider D, Ebner S, Böck G, Widner B, Jaeger M, et al. Monocyte-derived dendritic cells release neopterin. *J Leukoc Biol*. 2002 Dec;72(6):1148–53.
102. Gostner JM, Becker K, Kurz K, Fuchs D. Disturbed Amino Acid Metabolism in HIV: Association with Neuropsychiatric Symptoms. *Front Psychiatry* [Internet]. 2015 Jul 14 [cited 2018 Jul 3];6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4500866/>
103. Davies NWS, Guillemin G, Brew BJ. Tryptophan, Neurodegeneration and HIV-Associated Neurocognitive Disorder. *Int J Tryptophan Res IJTR*. 2010;3:121–40.
104. Stone TW. Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol Rev*. 1993 Sep;45(3):309–79.
105. Guillemin GJ, Smith DG, Smythe GA, Armati PJ, Brew BJ. Expression of the kynurenine pathway enzymes in human microglia and macrophages. *Adv Exp Med Biol*. 2003;527:105–12.
106. Guillemin GJ, Smythe G, Takikawa O, Brew BJ. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and production of quinolinic acid by human microglia, astrocytes, and neurons. *Glia*. 2005 Jan 1;49(1):15–23.
107. Capuron L, Schroecksnadel S, Féart C, Aubert A, Higuere D, Barberger-Gateau P, et al. Chronic low-grade inflammation in elderly persons is associated with altered tryptophan and tyrosine metabolism: role in neuropsychiatric symptoms. *Biol Psychiatry*. 2011 Jul 15;70(2):175–82.
108. Murray MF. Tryptophan depletion and HIV infection: a metabolic link to pathogenesis. *Lancet Infect Dis*. 2003 Oct;3(10):644–52.
109. Heyes MP, Brew BJ, Saito K, Quearry BJ, Price RW, Lee K, et al. Inter-relationships between quinolinic acid, neuroactive kynurenines, neopterin and β 2-microglobulin in cerebrospinal fluid and serum of HIV-1-infected patients. *J Neuroimmunol*. 1992 Sep 1;40(1):71–80.
110. Widner B, Laich A, Sperner-Unterweger B, Ledochowski M, Fuchs D. Neopterin production, tryptophan degradation, and mental depression--what is the link? *Brain Behav Immun*. 2002 Oct;16(5):590–5.
111. Boasso A, Shearer GM. How does indoleamine 2,3-dioxygenase contribute to HIV-mediated immune dysregulation. *Curr Drug Metab*. 2007 Apr;8(3):217–23.
112. Boasso A, Herbeuval J-P, Hardy AW, Anderson SA, Dolan MJ, Fuchs D, et al. HIV inhibits CD4+ T-cell proliferation by inducing indoleamine 2,3-dioxygenase in plasmacytoid dendritic cells. *Blood*. 2007 Apr 15;109(8):3351–9.
113. Vyboh K, Jenabian M-A, Mehraj V, Routy J-P. HIV and the gut microbiota, partners in crime: breaking the vicious cycle to unearth new therapeutic targets. *J Immunol*

Res. 2015;2015:614127.

114. Reeves RK, Rajakumar PA, Evans TI, Connole M, Gillis J, Wong FE, et al. Gut inflammation and indoleamine deoxygenase inhibit IL-17 production and promote cytotoxic potential in NKp44+ mucosal NK cells during SIV infection. *Blood*. 2011 Sep 22;118(12):3321–30.
115. Vujkovic-Cvijin I, Dunham RM, Iwai S, Maher MC, Albright RG, Broadhurst MJ, et al. Dysbiosis of the gut microbiota is associated with HIV disease progression and tryptophan catabolism. *Sci Transl Med*. 2013 Jul 10;5(193):193ra91.
116. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, et al. CD4+ T Cell Depletion during all Stages of HIV Disease Occurs Predominantly in the Gastrointestinal Tract. *J Exp Med*. 2004 Sep 20;200(6):749–59.
117. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med*. 2006 Dec;12(12):1365–71.
118. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*. 2012 Sep 13;489(7415):220–30.
119. Wanke CA. Enteropathogenic and enteroaggregative strains of *Escherichia coli*: clinical features of infection, epidemiology, and pathogenesis. *Curr Clin Top Infect Dis*. 1995;15:230–52.
120. Vijay-Kumar M, Aitken JD, Carvalho FA, Cullender TC, Mwangi S, Srinivasan S, et al. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science*. 2010 Apr 9;328(5975):228–31.
121. Madge S, Mocroft A, Wilson D, Youle M, Lipman MC, Phillips A, et al. Participation in clinical studies among patients infected with HIV-1 in a single treatment centre over 12 years. *HIV Med*. 2000 Oct;1(4):212–8.
122. Hsue PY, Hunt PW, Ho JE, Farah HH, Schnell A, Hoh R, et al. Impact of HIV infection on diastolic function and left ventricular mass. *Circ Heart Fail*. 2010 Jan;3(1):132–9.
123. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med*. 2013 May;19(5):576–85.
124. Hepworth MR, Monticelli LA, Fung TC, Ziegler CGK, Grunberg S, Sinha R, et al. Innate lymphoid cells regulate CD4+ T-cell responses to intestinal commensal bacteria. *Nature*. 2013 Jun 6;498(7452):113–7.
125. Kotler DP, Gaetz HP, Lange M, Klein EB, Holt PR. Enteropathy associated with the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med*. 1984 Oct;101(4):421–8.
126. Nazli A, Dizzell S, Zahoor MA, Ferreira VH, Kafka J, Woods MW, et al. Interferon- β induced in female genital epithelium by HIV-1 glycoprotein 120 via Toll-like-receptor 2 pathway acts to protect the mucosal barrier. *Cell Mol Immunol*. 2018 Mar 19;

127. Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Okamoto Y, et al. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature*. 2002 May 2;417(6884):95–8.
128. Stockinger B, Veldhoen M. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol*. 2007 Jun;19(3):281–6.
129. Kanwar B, Favre D, McCune JM. Th17 and regulatory T cells: implications for AIDS pathogenesis. *Curr Opin HIV AIDS*. 2010 Mar;5(2):151–7.
130. Heise C, Dandekar S, Kumar P, Duplantier R, Donovan RM, Halsted CH. Human immunodeficiency virus infection of enterocytes and mononuclear cells in human jejunal mucosa. *Gastroenterology*. 1991 Jun;100(6):1521–7.
131. Clayton F, Reka S, Cronin WJ, Torlakovic E, Sigal SH, Kotler DP. Rectal mucosal pathology varies with human immunodeficiency virus antigen content and disease stage. *Gastroenterology*. 1992 Sep;103(3):919–33.
132. Dillon SM, Lee EJ, Donovan AM, Guo K, Harper MS, Frank DN, et al. Enhancement of HIV-1 infection and intestinal CD4+ T cell depletion ex vivo by gut microbes altered during chronic HIV-1 infection. *Retrovirology* [Internet]. 2016 Jan 14 [cited 2018 Jul 3];13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4712466/>
133. Liu JZ, Pezeshki M, Raffatellu M. Th17 cytokines and host-pathogen interactions at the mucosa: dichotomies of help and harm. *Cytokine*. 2009 Nov;48(1–2):156–60.
134. Jiang W, Lederman MM, Hunt P, Sieg SF, Haley K, Rodriguez B, et al. Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral-treated HIV infection. *J Infect Dis*. 2009 Apr 15;199(8):1177–85.
135. Lilly DM, Stillwell RH. PROBIOTICS: GROWTH-PROMOTING FACTORS PRODUCED BY MICROORGANISMS. *Science*. 1965 Feb 12;147(3659):747–8.
136. Saxena D, Li Y, Yang L, Pei Z, Poles M, Abrams WR, et al. Human microbiome and HIV/AIDS. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2012 Mar;9(1):44–51.
137. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Manuelli V, Jean-Pierre P, Lopez P, et al. Mechanisms of gastrointestinal CD4+ T-cell depletion during acute and early human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*. 2007 Jan;81(2):599–612.
138. Wilson NL, Moneyham LD, Alexandrov AW. A systematic review of probiotics as a potential intervention to restore gut health in HIV infection. *J Assoc Nurses AIDS Care JANAC*. 2013 Apr;24(2):98–111.
139. Wildt S, Munck LK, Vinter-Jensen L, Hanse BF, Nordgaard-Lassen I, Christensen S, et al. Probiotic treatment of collagenous colitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial with *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*. *Inflamm Bowel Dis*. 2006 May;12(5):395–401.
140. 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 N Y N*. 2011

Dec;31(12):875–81.

141. Saint-Marc T, Rossello-Prats L, Touraine JL. [Efficacy of *Saccharomyces boulardii* in the treatment of diarrhea in AIDS]. *Ann Med Interne (Paris)*. 1991;142(1):64–5.
142. Salminen MK, Tynkkynen S, Rautelin H, Poussa T, Saxelin M, Ristola M, et al. The efficacy and safety of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG on prolonged, noninfectious diarrhea in HIV Patients on antiretroviral therapy: a randomized, placebo-controlled, crossover study. *HIV Clin Trials*. 2004 Aug;5(4):183–91.
143. Trois L, Cardoso EM, Miura E. Use of probiotics in HIV-infected children: a randomized double-blind controlled study. *J Trop Pediatr*. 2008 Feb;54(1):19–24.
144. Hemsworth JC, Hekmat S, Reid G. Micronutrient supplemented probiotic yogurt for HIV-infected adults taking HAART in London, Canada. *Gut Microbes*. 2012 Oct;3(5):414–9.
145. Falasca K, Vecchiet J, Ucciferri C, Di Nicola M, D'Angelo C, Reale M. Effect of Probiotic Supplement on Cytokine Levels in HIV-Infected Individuals: A Preliminary Study. *Nutrients*. 2015 Sep 28;7(10):8335–47.
146. Heiser CR, Ernst JA, Barrett JT, French N, Schutz M, Dube MP. Probiotics, soluble fiber, and L-Glutamine (GLN) reduce nelfinavir (NFV)- or lopinavir/ritonavir (LPV/r)-related diarrhea. *J Int Assoc Physicians AIDS Care Chic Ill* 2002. 2004 Dec;3(4):121–9.
147. d'Ettorre G, Ceccarelli G, Giustini N, Serafino S, Calantone N, De Girolamo G, et al. Probiotics Reduce Inflammation in Antiretroviral Treated, HIV-Infected Individuals: Results of the “Probio-HIV” Clinical Trial. *PloS One*. 2015;10(9):e0137200.
148. González-Hernández LA, Jave-Suarez LF, Fafutis-Morris M, Montes-Salcedo KE, Valle-Gutierrez LG, Campos-Loza AE, et al. Synbiotic therapy decreases microbial translocation and inflammation and improves immunological status in HIV-infected patients: a double-blind randomized controlled pilot trial. *Nutr J*. 2012 Oct 29;11:90.
149. Villar-García J, Hernández JJ, Güerri-Fernández R, González A, Lerma E, Guelar A, 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* 1999. 2015 Mar 1;68(3):256–63.
150. Barbara G, Scaioli E, Barbaro MR, Biagi E, Laghi L, Cremon C, et al. Gut microbiota, metabolome and immune signatures in patients with uncomplicated diverticular disease. *Gut*. 2017;66(7):1252–61.
151. Jenabian M-A, Patel M, Kema I, Kanagaratham C, Radzioch D, Thébault P, et al. Distinct tryptophan catabolism and Th17/Treg balance in HIV progressors and elite controllers. *PloS One*. 2013;8(10):e78146.
152. Bandera A, De Benedetto I, Bozzi G, Gori A. Altered gut microbiome composition in HIV infection: causes, effects and potential intervention. *Curr Opin HIV AIDS*. 2018 Jan;13(1):73–80.
153. Vujkovic-Cvijin I, Swainson LA, Chu SN, Ortiz AM, Santee CA, Petriello A, et al. Gut-

Resident *Lactobacillus* Abundance Associates with IDO1 Inhibition and Th17 Dynamics in SIV-Infected Macaques. *Cell Rep.* 2015 Nov 24;13(8):1589–97.

154. Gong C-Y, Li Z, Wang H-M, Liu J, Chen L, Zhang H-W, et al. Targeting the kynurenine pathway as a potential strategy to prevent and treat Alzheimer's disease. *Med Hypotheses.* 2011 Sep;77(3):383–5.
155. Kandaneeratchi A, Brew BJ. The kynurenine pathway and quinolinic acid: pivotal roles in HIV associated neurocognitive disorders. *FEBS J.* 2012 Apr;279(8):1366–74.
156. Kerr SJ, Armati PJ, Pemberton LA, Smythe G, Tattam B, Brew BJ. Kynurenine pathway inhibition reduces neurotoxicity of HIV-1-infected macrophages. *Neurology.* 1997 Dec;49(6):1671–81.
157. Edén A, Marcotte TD, Heaton RK, Nilsson S, Zetterberg H, Fuchs D, et al. Increased Intrathecal Immune Activation in Virally Suppressed HIV-1 Infected Patients with Neurocognitive Impairment. *PloS One.* 2016;11(6):e0157160.
158. Borre YE, Moloney RD, Clarke G, Dinan TG, Cryan JF. The impact of microbiota on brain and behavior: mechanisms & therapeutic potential. *Adv Exp Med Biol.* 2014;817:373–403.
159. Frazier TH, DiBaise JK, McClain CJ. Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2011 Sep;35(5 Suppl):14S-20S.
160. Simrén M, Barbara G, Flint HJ, Spiegel BMR, Spiller RC, Vanner S, et al. Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report. *Gut.* 2013 Jan;62(1):159–76.
161. Hughes PA, Zola H, Penttila IA, Blackshaw LA, Andrews JM, Krumbiegel D. Immune activation in irritable bowel syndrome: can neuroimmune interactions explain symptoms? *Am J Gastroenterol.* 2013 Jul;108(7):1066–74.
162. Ringel Y, Maharshak N. Intestinal microbiota and immune function in the pathogenesis of irritable bowel syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2013 Oct 15;305(8):G529-541.