



**UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI**



IISPV
INSTITUT
D'INVESTIGACIÓ
SANITÀRIA
PERE VIRGILI

HJ23

Hospital Universitari Joan XXIII
ICS Camp de Tarragona

PERFIL METABOLÓMICO Y LIPIDÓMICO ASOCIADO A LOS CONTROLADORES DE ÉLITE DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

Nerea Castro Alonso

TRABAJO FINAL DE GRADO DE BIOTECNOLOGÍA

Tutora académica: Katihuska Viviana Paredes Aguilar, Departamento de Ciencias Médicas Básicas, kathiuska.paredes@urv.cat

En cooperación con: Instituto de Investigación Sanitaria Pere Virgili (IISPV)

Supervisora: Dra. Anna Rull Aixa, Departamento de Bioquímica y Biotecnología, anna.rull@iispv.cat

Enero 2021

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo, así como el desarrollo de mi carrera universitaria, no habría sido posible sin el incondicional apoyo de muchas de las personas que cito a continuación y que les estoy infinitamente agradecida.

A mi familia, principalmente a mi aita, ama y hermano, porque todos ellos se han sacrificado para poder ofrecerme la mejor educación posible y siempre me han apoyado para seguir adelante, confiando ciegamente en mí; a mis aítites y amamas, y por supuesto mis tías, por inculcarme sus valores sobre el esfuerzo en esta vida y reflejarme su orgullo día tras día por verme conseguir paso a paso los objetivos que durante este camino me he propuesto.

A mis amigas y amigos, gracias. Gracias por soportarme durante todos estos años y alegrarme en los peores momentos. A Narcis, por animarme, apoyarme y creer en mi constantemente, por sacar en todo momento la mejor parte de mí. Sin tu apoyo esto no hubiera sido posible y no puedo estar más agradecida.

Y, finalmente, me gustaría agradecer este trabajo a la Dra. Anna Rull Aixà y Verónica Alba Elvira. Lo primero daros las gracias por ofrecerme la gran oportunidad de formar parte de vuestro grupo de investigación, pero también por estar pendientes de mí y ofrecerme ayuda en todo momento que la he necesitado, incluso sin habérsela pedido. Gracias por dedicar parte de vuestro valioso tiempo para hacer posible el desarrollo de este trabajo y hacer que este camino haya sido mucho más fácil y divertido con vuestra dedicación.

A todos vosotros y vosotras, muchas gracias.

Jo, Nerea Castro Alonso, amb DNI 79000045-J, sóc coneixedor de la guia de prevenció del plagi a la URV *Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants* (aprovada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vida-campus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueixen cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 8 de gener de 2021

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Nerea', with a large, sweeping horizontal stroke underneath it.

ÍNDICE

DATOS DEL CENTRO	5
RESUMEN.....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
1. Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)	7
1.1 Estructura y genoma	8
1.2 Ciclo biológico	10
1.3 Progresión clínica de la infección.....	13
2. Controladores de élite del VIH.....	15
2.1 Mecanismos de control del VIH.....	17
2.2 Pérdida espontánea del control del VIH	18
3. Metabolómica.....	19
4. Lipidómica.....	20
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	21
METODOLOGÍA.....	22
1. Recogida de muestras, datos clínicos y demográficos	22
2. Análisis metabolómico por GC-(EI)qTOF/MS de las muestras.....	23
3. Análisis lipidómico por UHPLC-qTOF/MS de las muestras.....	23
4. Análisis estadístico.....	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
1. Características de los pacientes estudiados.....	25
2. Metabolómica.....	26
3. Lipidómica.....	31
CONCLUSIONES.....	34
AUTOEVALUACIÓN	35
BIBLIOGRAFÍA.....	36
ANEXOS	40
Anexo 1	40
Anexo 2	40
Anexo 3	41
Anexo 5	42

DATOS DEL CENTRO

El presente Trabajo Final de Grado se ha desarrollado gracias a los estudios realizados por el Grupo de Investigación en Infección e Inmunidad (INIM), liderado por el Profesor Francesc Vidal Marsal. El INIM pertenece al Instituto de Investigación Sanitaria Pere Virgili (IISPV), creado en colaboración científica interinstitucional entre el Instituto Catalán de la Salud (Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Hospital de Tostosa, Verge de la Cinta), el Hospital Universitari Sant Joan de Reus, el Instituto Pere Mata y la Universidad Rovira Virgili.

El Grupo de Investigación en Infección e Inmunidad fue creado en 1995 en el Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, y actualmente tiene su laboratorio de investigación en el Edificio Modular de Dòcencia i Recerca de dicho hospital. INIM se encarga de la investigación clínica y básica del Servicio de Medicina Interna, además de ser uno de los grupos líderes de la Red Española de Investigación en SIDA (RIS) al cual se unió en 2003.

INIM es un grupo de investigación mixto, constituido por personal cualificado para el desarrollo de investigación básica, traslacional, clínica y epidemiológica en relación con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y las infecciones nosocomiales. A su vez, colabora con el Centro de Ciencias Ómicas (COS) de la Universidad, operador científico en el mundo de las tecnologías ómicas, donde se desarrollan estudios metabolómicos, proteómicos, genómicos y transcriptómicos, entre otros (1,2).

Las principales líneas de investigación del INIM son las siguientes:

- Inmunogenética e inmunopatogenia de la infección por el VIH. Identificación de los mecanismos del hospedador que regulan la progresión de la infección y estudio de determinantes biológicos que modulan la respuesta virológica e inmunológica al tratamiento antirretroviral.
- Farmacogenética y toxicogenética del tratamiento antirretroviral. Evaluación de la eficacia y seguridad de fármacos antirretrovirales. Estudio de los determinantes genéticos que modulan la respuesta virológica e inmunológica al tratamiento antirretroviral. Mecanismos de toxicidad.
- Coinfección VHC-VIH. Estudios epidemiológicos de la prevalencia de coinfección VHC-VIH. Estudios clínicos, genéticos y moleculares de la eficacia y seguridad del tratamiento de la coinfección por VHC en pacientes infectados por el VIH. Estudio de cuasiespecies virales.

- Estudios epidemiológicos y clínicos de la infección por VIH. La infección por VIH en población de edad avanzada. La infección por VIH en diferentes poblaciones. Infecciones oportunistas y no oportunistas en VIH.
- Innovación del tratamiento antirretroviral. Estudio de resistencias, optimización y simplificación del tratamiento y nuevas estrategias terapéuticas.
- Enfermedades infecciosas. Estudio de las bacteriemias, endocarditis infecciosa, espondilodiscitis e infección nosocomial (VINCat).

RESUMEN

Un reducido porcentaje de los pacientes con VIH tiene la capacidad de controlar el virus espontáneamente en ausencia de la terapia antirretroviral, los denominados controladores de élite (ECs). Sin embargo, los pacientes controladores de élite pueden no mantener este control permanentemente, y el desencadenante de este fenómeno es aún desconocido. Es por ello que actualmente se estudian las vías mecánicas que puedan estar implicadas en este proceso, tanto en el de poder tener un control sobre el virus, como en el de repentinamente perderlo.

El presente trabajo tiene como objetivo caracterizar un perfil distintivo de estos característicos pacientes a través de análisis metabolómicos y lipidómicos, mediante los que se pretende identificar potenciales marcadores biológicos. Para llevar a cabo este proceso, se realizó un estudio metabolómico y lipidómico en muestras de plasma de 46 pacientes ECs, entre los cuales se clasifican 3 fenotipos diferentes.

En base a los resultados metabolómicos, se determinaron 8 metabolitos estadísticamente significativos entre los 3 fenotipos de estudio, los cuales permitieron generar un posible perfil metabolómico asociado a cada uno de los grupos de ECs a causa de su implicación en diversas rutas metabólicas. El análisis lipidómico reveló 4 lípidos estadísticamente significativos, todos ellos de la familia de los triglicéridos. La combinación de las hipótesis planteadas en torno a los dos análisis sustenta la posibilidad de determinar un perfil distintivo de los 3 fenotipos de pacientes ECs en función de las alteraciones que puedan mostrar en sus respectivas vías mecánicas. De hecho, se consiguió asociar una actividad reducida de glucólisis a los controladores de élite que en todo su seguimiento mantienen el control tanto virológico como inmunológico, mientras que los pacientes que han dejado de ser ECs muestran unos niveles significativamente elevados de piruvato. Además, un aumento significativo de triglicéridos aparenta estar relacionado a la repentina pérdida del control sobre el virus.

En conclusión, este trabajo ha logrado completar los objetivos establecidos y dar comienzo a la generación de los perfiles metabolómicos y lipidómicos asociados a los diferentes tipos de ECs. Esta caracterización es y será muy relevante en el planteamiento de nuevas estrategias terapéuticas contra el VIH, pero también en la capacidad de anticipación a la pérdida del control del virus en los pacientes controladores de élite.

Palabras clave: VIH, controladores de élite, control virológico, control inmunológico, metabolómica, lipidómica.

INTRODUCCIÓN

1. Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) pertenece a la familia *Retroviridae*, concretamente al género *Lentivirus*. El genoma de los *Retroviridae* está constituido por una cadena de RNA monocatenario, y llevan a cabo su replicación mediante el proceso de transcripción inversa. En función de las características genéticas y diferencias en antígenos virales, se clasifica en dos tipos, el VIH-1 y el VIH-2 (3).

El VIH-1 evolucionó a partir del virus de inmunodeficiencia de primates no humanos de los chimpancés Centroamericanos (*Pan troglodytes troglodytes*) (SIV cpz). Es el tipo más frecuente, patogénico y de mayor incidencia, y por ende el más estudiado; el VIH-2 es menos patogénico y se encuentra mayoritariamente en África Occidental, donde se originó a partir del virus de inmunodeficiencia de primates no humanos de mangabeys grises (*Cercocebus atys*) (SIV sm). En el VIH-2, la transmisión heterosexual y la transmisión vertical son menos frecuentes, así como el desarrollo de la enfermedad (3–5).

El VIH posee una de las tasas de letalidad más elevadas. En el año 2017, aproximadamente 36.9 millones de personas vivían contagiadas de VIH, concentrando la mayor parte de las infecciones en África Subsahariana (6). A pesar de que la tasa de mortalidad ha descendido considerablemente, su incidencia continúa siendo muy elevada, y en consecuencia es objetivo de investigación biomédica a nivel mundial (7).

La transmisión de VIH puede ocurrir por diversas vías. La más frecuente es mediante relaciones sexuales, tanto heterosexuales como homosexuales, a través de los fluidos corporales (semen, flujo vaginal, líquido preseminal); otra de las vías es el contacto con

sangre y hemoderivados de personas con VIH, seguido de la transmisión vertical, que puede darse por vía transplacentaria, durante el parto o a través de la lactancia materna (5,8).

Cuando la infección por VIH alcanza un estadio avanzado, se desarrolla el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). En este caso, los linfocitos T CD4⁺ alcanzan niveles críticos, provocando un fallo del sistema inmunitario que se traduce en una inmunodeficiencia severa, la cual conlleva al desarrollo de infecciones oportunistas y complicaciones oncológicas (4).

1.1 Estructura y genoma

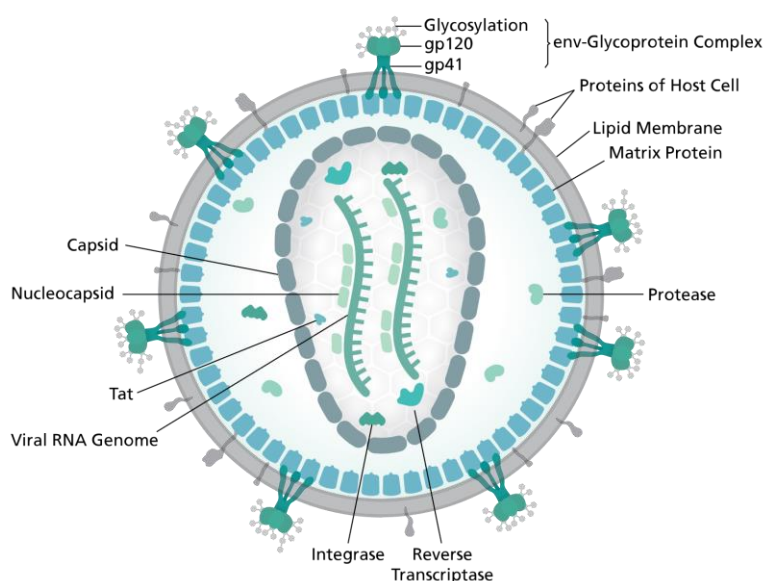


Figura 1. Estructura del virión del VIH (9).

El virión del VIH tiene forma esférica, con un tamaño de aproximadamente 100nm de diámetro. Consta de una membrana externa lipídica que actúa como envoltura, donde se encuentran las glicoproteínas gp120 y gp41, dispuestas como hetero-trímeros y sintetizadas por el precursor de poliproteína del gen *Env* (gp160). La glicoproteína gp120 se sitúa en la superficie de la envoltura lipídica, y tiene los elementos determinantes que interaccionan con los receptores y correceptores. Mientras que gp41 es una glicoproteína transmembranal que, además de encargarse del anclaje del complejo gp120/gp41 a la membrana, contiene dominios necesarios para catalizar la reacción de fusión de las membranas entre el virus y el huésped (3,10).

Para la formación de las otras estructuras del virus, el gen *gag* (antígeno específico de grupo) codifica una poliproteína precursora, que es procesada por la proteasa viral generando las proteínas de matriz, cápside, nucleocápside y p6, además de dos péptidos espaciadores (11).

La matriz se sitúa bajo la membrana externa lipídica, y está formada por las proteínas p17. La cápside es una estructura de forma cónica localizada en el centro del virión, la cual se forma mediante la polimerización de la proteína p24. Esta cápside cubre la nucleocápside, donde se encuentran dos moléculas de ARN monocatenario asociadas no-covalentemente formando un dímero estable, las proteínas p6 y p7 y las enzimas proteasa, transcriptasa inversa e integrasa. Estas 3 enzimas están codificadas por el gen *pol* (polimerasa), y se sintetizan mediante un precursor de poliproteína (10–13).

El genoma del VIH posee una complejidad destacable, característica de los *Lentivirus*. La formación del genoma del provirus se produce mediante la transcripción inversa del RNA viral a DNA, la posterior degradación del RNA y finalmente la integración del DNA de doble cadena al genoma humano (3).

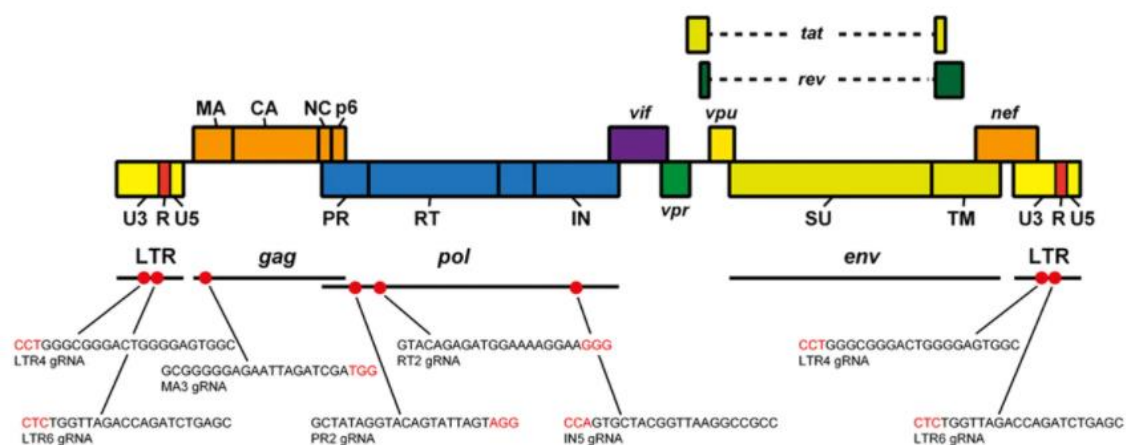


Figura 2. Organización del genoma del VIH (14).

El genoma consiste en dos copias idénticas de RNA codificante de cadena simple. Cada copia contiene secuencias LTR (Long Terminal Repeat) en los extremos 5' y 3' y un total de 9 genes, los cuales se clasifican en complejos estructurales y no estructurales. Entre los primeros, se encuentran los genes *gag*, *pol* y *env*, encargados de codificar proteínas esenciales para la estructura del virión; mientras que los genes *vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*, *tat* y *rev* corresponden a genes reguladores y accesorios. El gen *tat*, proteína transactivadora, es clave en la transcripción del LTR, y *rev*, regulador del *splicing* de RNA, es importante en el transporte de RNA viral desde el núcleo hacia el citoplasma. Los productos de estos genes no estructurales pueden actuar como reguladores positivos o negativos de la transcripción, incluso de ambas formas, y están asociados a la inefectividad (3,13,15).

1.2 Ciclo biológico

Los ciclos biológicos de los *Retroviridae* presentan una gran similitud excepto en los receptores y correceptores diana. Además, el VIH tiene la particularidad de infectar células que no se dividen (7). El ciclo vital puede dividirse en dos grandes fases: la fase temprana, desde la unión del virión a la célula huésped hasta la integración del material genético viral en el genoma huésped, y la fase tardía, donde ocurre la transcripción del genoma del virus, la síntesis de las proteínas víricas, el ensamblaje y finalmente la liberación de los nuevos viriones.

Estas dos fases principales se pueden subdividir en: entrada, decapsidación, retrotranscripción, integración, replicación, ensamblaje y maduración.

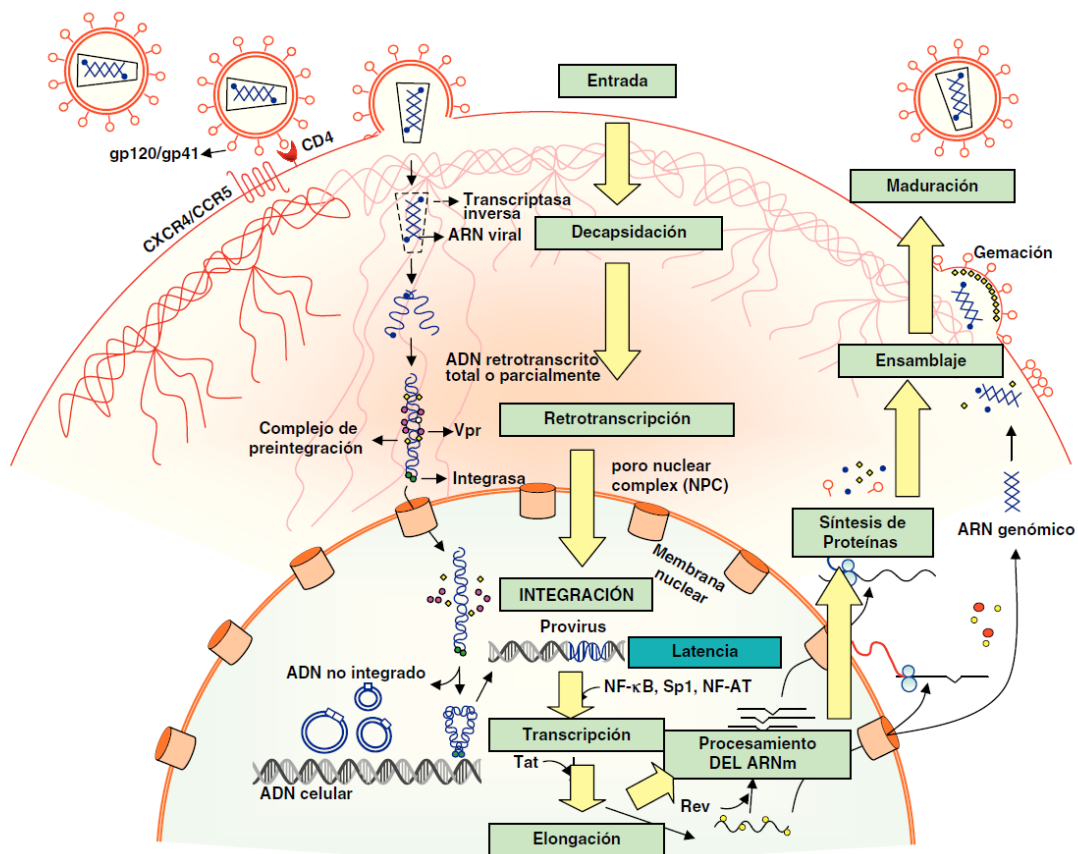


Figura 3. Ciclo biológico del VIH (16).

La **entrada** comienza con la interacción secuencial con el receptor CD4 y los correceptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4. El receptor CD4 se encuentra principalmente en los linfocitos T CD4+, pero también en macrófagos y células dendríticas (16).

En cuanto a los correceptores de quimiocinas, aunque existan cepas duales capaces de utilizar tanto el CCR5 como el CXCR4, generalmente las cepas de VIH presentan tropismo por uno de los dos receptores. Las cepas R5 trópicas suelen abundar al inicio del proceso de infección, mientras que las cepas con tropismo por el receptor CXCR4 prevalecen en las fases más avanzadas (10).

La primera interacción ocurre entre la glicoproteína de superficie gp120 y el receptor CD4, provocando cambios conformacionales en regiones que forman el dominio de unión de la gp120 a los receptores CCR5 y CXCR4. Este proceso, a su vez, induce un cambio estructural en el dominio hidrofóbico de la región N-terminal de la gp41, encargado del anclaje a la membrana plasmática. Dicho cambio genera un movimiento de unión en los dominios de gp41, logrando la proximidad necesaria entre la membrana plasmática y viral para producir la reacción de fusión (10,16).

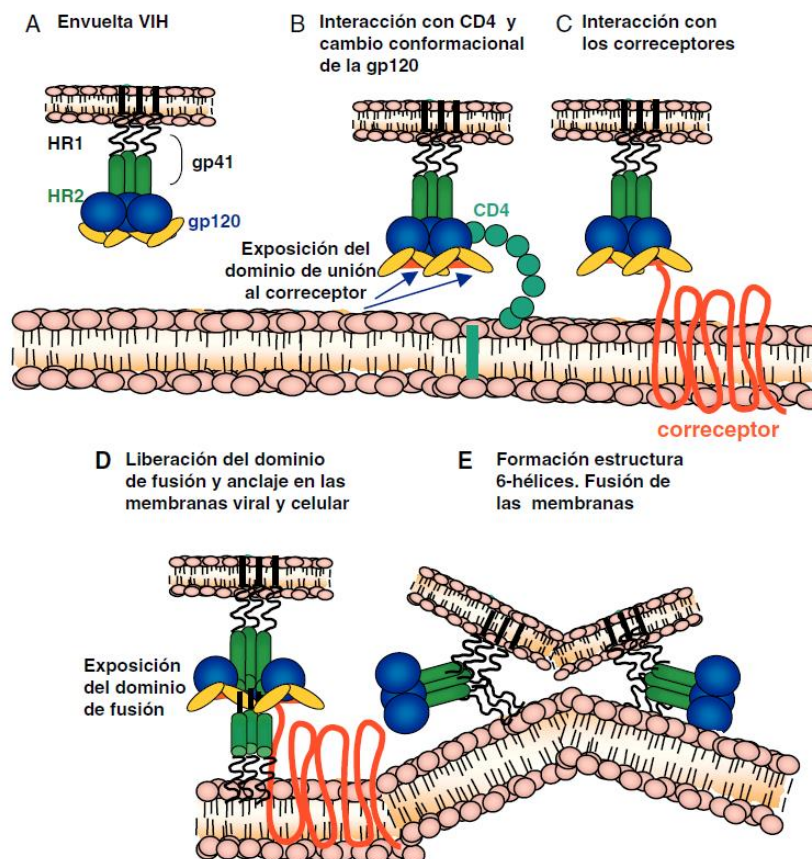


Figura 4. Entrada del VIH en la célula huésped (16).

A continuación, ocurre la **decapsidación**, durante la cual el genoma viral se libera tras el desensamblaje de las proteínas de la cápside. La decapsidación ocurre en la envoltura nuclear durante el importe nuclear, y es crucial para el proceso de infección. No solo influencia la translocación nuclear y la preferencia por determinados sitios de integración del VIH, sino que las respuestas del huésped también se ven afectadas por este proceso (18,19).

Posteriormente, durante la **retrotranscripción** o transcripción inversa, el RNA viral de cadena simple se transcribe a una doble cadena de DNA mediante la enzima retrotranscriptasa del virus. Finalizado este paso, el DNA retrotranscrito se une a diversas moléculas como el Vpr o la enzima integrasa, generando el complejo de preintegración, el cual se dirige al poro nuclear para insertarse en la célula huésped (16).

La transcripción inversa tiene una alta tasa de error, favoreciendo la recombinación de fragmentos genómicos en caso de que varias partículas infecten una misma célula. Esta es la razón por la que el VIH presenta una elevada heterogeneidad genética, siendo responsable de la existencia de diversas cuasiespecies a lo largo de la evolución (10).

Más tarde, el complejo de preintegración se introduce covalentemente en el genoma de la célula huésped a través de los poros nucleares de la membrana nuclear de la misma. Una vez que se ha producido la **integración** del DNA viral en el DNA celular se forma el provirus de VIH, el cual puede mantenerse en estado latente durante un largo periodo de tiempo, pudiendo pasar hasta 10 años antes de iniciar la replicación (20).

Para iniciar la **replicación**, el provirus debe salir del estado de latencia. Para ello, se requieren una serie de factores celulares. Sin embargo, tanto la expresión génica como la replicación del VIH están controladas por la interacción de proteínas reguladoras virales y huéspedes con las secuencias situadas en los LTR del virus (21).

El principal factor celular para la reactivación del provirus es el NF- κ B (factor nuclear de las cadenas kappa de las células B activadas), que pertenece a una familia de proteínas encargadas de la regulación de la expresión de genes celulares que intervienen en procesos de reconocimiento y activación inmunitarios. Este factor combinado con Sp1, un factor de transcripción que participa en la expresión génica, provoca la activación del LTR del VIH. Otro de los factores celulares es el NF-AT (factor nuclear de las células T activadas), que también se une al elemento potenciador κ B para favorecer este proceso (16,22).

Tras la reactivación e inicio de síntesis del RNA viral es necesaria su completa elongación. Para ello se requiere la proteína Tat, cuya expresión aumenta la tasa de

transcripción del genoma viral. Una vez sintetizado el RNA mensajero, éste es transportado mediante la proteína Rev desde el núcleo al citoplasma. Asimismo, Rev participa en el acoplamiento de los RNA mensajeros a los ribosomas para su posterior traducción a proteínas virales. En consecuencia, a medida que los niveles de Tat y Rev aumentan, los RNAs parcialmente empalmados, o del inglés “*spliced*”, son exportados, y otras proteínas accesorias son generadas (16,22,23).

En el momento que los RNA mensajeros, tanto *spliced* como *unspliced*, se encuentran en el citoplasma, las proteínas virales traducidas se unen a los transcritos de RNA viral. Esta **ensamblaje** produce la formación de los nuevos viriones, liberados de la célula huésped en un proceso de gemación, donde los viriones se llevan parte de la membrana al salir de la célula y así formar su propia envoltura lipídica (23).

Sin embargo, los viriones liberados no son infectivos desde el primer momento, sino que necesitan un proceso de **maduración**. Para ello, los precursores de las poliproteínas Gag y Gag-Pol son traducidos a proteínas enzimáticas y estructurales mediante la proteasa del virión. Las proteínas formadas se reorganizan, dando lugar al virus infeccioso (16,22).

1.3 Progresión clínica de la infección

El progreso de la infección por VIH se clasifica en 3 etapas, en función de los síntomas e indicadores clínicos que desarrolla la persona infectada: fase aguda, fase asintomática y fase avanzada.

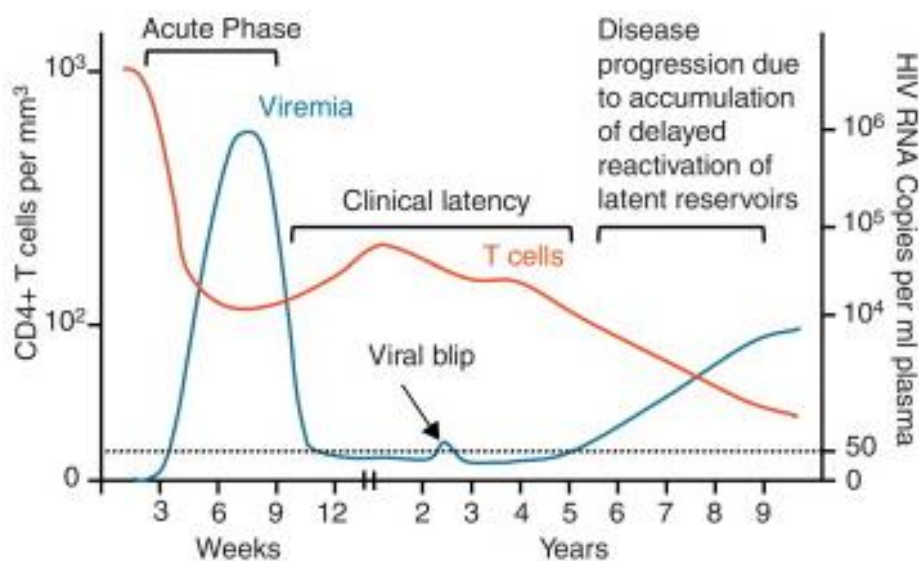


Figura 5. Historia natural de la infección por VIH (24).

La **fase aguda** o estadio de primoinfección es el momento inicial de la infección, cuando el virus se integra en las células huésped y se expande a través de los órganos linfoides y el sistema nervioso. Al inicio, tanto la carga viral como el número de células T CD4 infectadas son elevadas, y el antígeno p24 circulante está presente. Este antígeno es una proteína del núcleo viral que se manifiesta tras la infección por VIH, coincidiendo con el aumento del nivel del RNA viral (25).

Progresivamente aparece la respuesta inmunitaria, tanto celular como humoral, produciendo un descenso en los niveles de virus circulante y de T CD4 infectadas, así como la desaparición del antígeno p24. En términos clínicos, esta etapa inicial, de duración no superior a 12 semanas, provoca síntomas similares a los originados por una gripe. La sintomatología más común es fiebre, linfadenopatía, faringitis, exantema cutáneo y artromialgias, manifestaciones que podrían asociarse a otras causas (23,26).

En la **fase asintomática**, crónica o de latencia clínica el virus permanece activo, pero se reproduce en una tasa significativamente menor. Esta replicación ocurre principalmente en el tejido linfoide, donde se encuentra el mayor reservorio de los viriones. En este sitio anatómico ocurre la generación y propagación de respuestas inmunológicas antígeno-específicas, puesto que los linfocitos migran desde la circulación hasta estos órganos para desencadenar respuestas humorales contra el VIH (27). En términos numéricos, la carga viral en los órganos linfoides puede llegar a ser hasta 10.000 veces superior a la circulante. Los pacientes no experimentan síntomas destacables, pero se han reportado adenopatías, plaquetopenia y trastornos neurológicos leves (23).

Cuando la infección se encuentra en **fase avanzada**, la inmunodeficiencia es severa, aumentando el número de infecciones oportunistas y la capacidad de desarrollar neoplasias relacionadas con la infección. La causa es el aumento de la carga viral consecuente a una replicación constante, igualándose la carga de los tejidos linfoides con la circulante. Los niveles de linfocitos T CD4+ descienden, y su concentración es menor de 200 células/ μ l, provocando la destrucción inmunológica y una inmunosupresión intensa. Este estadio es también conocido como Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida o SIDA. El tiempo medio desde la infección por VIH hasta el desarrollo de SIDA es de 10 años, pero existen factores inmunológicos, virológicos y genéticos que influyen en la progresión a esta fase final. Cabe remarcar que no existe cura para esta infección. Por lo tanto, el diagnóstico temprano del VIH, así como su tratamiento para retardar esta fase avanzada son de vital importancia y prioridad (23,28).

El desarrollo de la terapia antirretroviral combinada (cART) ha supuesto un gran avance en el tratamiento del VIH/SIDA, transformándose en una enfermedad crónica para la mayoría de los pacientes. Estos fármacos actúan interfiriendo en las etapas del ciclo esenciales para la replicación del virus, inhibiéndola y reduciendo la carga viral hasta niveles indetectables. Aunque no erradica el VIH, este fenómeno provoca un aumento en el número de linfocitos T CD4+, implicando un funcionamiento correcto del sistema inmunitario (29,30).

Sin embargo, el tratamiento con cART no produce los mismos efectos en todos los pacientes, y la progresión del VIH es muy variable en cada individuo. De hecho, existe un grupo de pacientes con la capacidad de controlar espontáneamente la replicación del virus en ausencia del tratamiento antirretroviral, denominados “controladores de VIH o no progresores”. Asimismo, a medida que la investigación progresa, también lo hacen las clasificaciones que se realizan para obtener una mejor comprensión sobre el VIH, por lo que nuevos subgrupos han surgido dentro de los controladores “generales”.

2. Controladores de élite del VIH

Los controladores de élite o *elite controllers* (ECs), son individuos con la capacidad de controlar la replicación del virus mediante su propio sistema inmunitario en ausencia de cART. Conforman entre un 0.5-1.5% de todas las personas infectadas por VIH, que a su vez muestran una gran heterogeneidad genética e inmunológica, así como manifestaciones clínicas y variaciones en características virológicas. Por ende, se han generado diversos subtipos para generar una clasificación más exhaustiva (31,32).

La heterogeneidad de esta cohorte comienza con la diversidad de definiciones que se les atribuyen a estos individuos. Esta ambigüedad es una problemática a la hora de interpretar resultados y, por consiguiente, también lo es la caracterización de los mecanismos biológicos subyacentes a cada fenotipo (33).

Actualmente, las definiciones aceptadas sobre los ECs coinciden en que los límites del nivel de VIH-RNA están entre 40 y 500 copias/mL. Sin embargo, debido a que el control inmunológico es tan importante como el control virológico, es necesario incluir la capacidad de los pacientes para mantener los niveles de linfocitos T CD4+ para establecer una definición más precisa. Considerando ambas cualidades, se ha descrito un fenotipo extremo, conocido como controladores de élite a largo plazo, LTECs (*long-term elite controllers*). Este grupo es, por el momento, el mejor modelo para una cura funcional del VIH, puesto que estos individuos son capaces de controlar el virus y la

deficiencia inmunológica. Los LTECs constituyen aproximadamente un 0.15% de los infectados por VIH y, se definen como los pacientes libres de cART con una carga viral indetectable, esto es, por debajo de 50 copias/mL, durante un periodo de al menos 10 años, niveles normales de CD4 y una pendiente positiva o nula de CD4 (31,32).

Como consecuencia, los últimos estudios realizados se centran en la caracterización de los mecanismos y marcadores biológicos de estos pacientes ya que representan una potencial cura funcional que permita el control de la replicación viral sin la necesidad de terapias antirretrovirales (34,35).

Sin embargo, la heterogeneidad de este grupo de pacientes es muy amplia, e involucra diversos factores que, en mayor o menor medida, afectan la adquisición de los diferentes fenotipos. Entre ellos, cabe destacar la diversidad en el nivel de viremia residual en plasma de VIH, el tiempo en alcanzar el estado EC, la duración del control virológico, la pérdida del control inmunológico y las manifestaciones clínicas. Estas condiciones están determinadas en función de diferentes factores, pertenecientes al huésped o al virus. Estos factores son los que se consideran o se cree que tienen una función determinante como marcadores biológicos de la pérdida o adquisición del control de la infección por VIH (31).

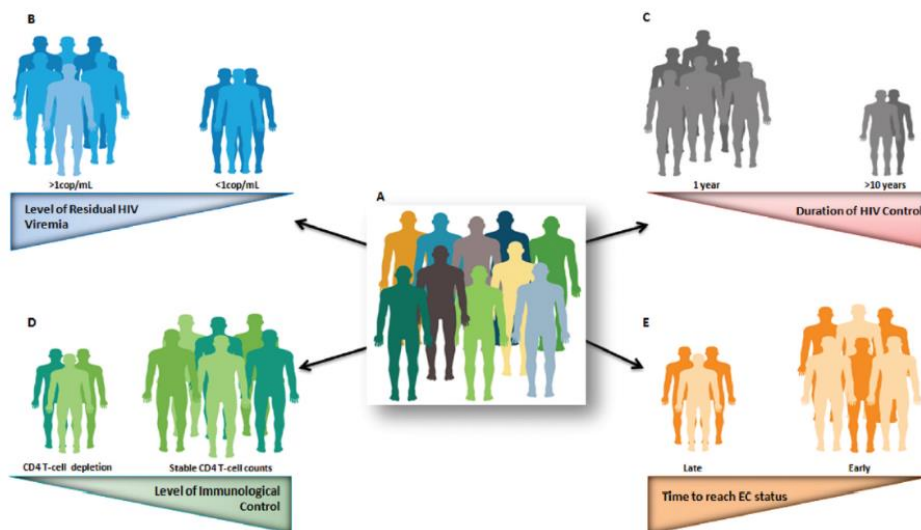


Figura 6. Factores de heterogeneidad de los controladores de élite. (a) la heterogeneidad de los ECs; (b) nivel de viremia residual de VIH; (c) duración del control de VIH; (d) nivel de control inmunológico; (e) tiempo para alcanzar estado EC. El número de individuos representa la frecuencia del evento en la población EC. Los triángulos representan la magnitud de cada factor con la punta estrecha indicando la amplitud menor y la punta ancha la mayor amplitud (31).

2.1 Mecanismos de control del VIH

Actualmente no se han podido determinar con exactitud los mecanismos que participan en el control del VIH por parte de los ECs. Sin embargo, la mayoría de los estudios sugieren una serie de factores que actúan de forma conjunta, pero, que individualmente, no permitirían el control duradero de la infección por VIH. Los factores caracterizados hasta el momento se clasifican como propios del virus o del huésped. (31,34,35).

Respecto a los **factores víricos**, éstos se dividen en: virus defectuosos y virus deletéreos o atenuados. En referencia al primer grupo, se ha descubierto que, en general, los virus de los ECs tienen una baja capacidad de replicación o que son defectuosos en alguna de las proteínas víricas, como por ejemplo delecciones importantes en el gen *nef* (36). De hecho, se ha descrito una estrecha asociación entre la supresión de la replicación viral en los LTECs y grandes delecciones genómicas en diferentes regiones del genoma (34).

Los virus deletéreos o atenuados son virus que tienen una baja capacidad de replicación, consecuencia de mutaciones de escape de los linfocitos T citotóxicos en las proteínas Gag. Por otra parte, se ha descubierto que la envoltura vírica tiene muy baja afinidad por las moléculas CD4, además de una baja actividad de transporte. Estas características provocan una señalización celular significativamente baja en la célula huésped (34).

Los **factores del huésped** que han sido asociados con la probabilidad de la progresión inmunológica se encuentran un bajo nivel de células CD4, una proporción reducida de CD4/CD8, un aumento en el grado de activación de los linfocitos T e inflamación y una polifuncionalidad disminuida de células T CD8+ Gag-específicas, entre otros (31).

Asimismo, otro de los factores asociados a la resistencia de la infección por VIH o un retardo en la progresión al SIDA es el de los alelos de los genes del complejo mayor de histocompatibilidad, HLA. Las moléculas del HLA de clase 1 son predictivas del curso de infección del VIH. Estas moléculas son presentadoras de antígenos de las células T CD8+, activándolas y, en el caso del VIH, destruyendo las células infectadas (37).

Se han caracterizado una serie de haplotipos protectores que constituyen el principal factor genético del huésped asociado con el control del VIH: HLA-B*57:01, HLA-B*58:01, HLA-B*27:05 y HLA-B*14:02. El alelo HLA-B*57:01 es hasta el momento el que aparentemente opone una mayor resistencia a la progresión de la enfermedad, aunque todos ellos están relacionados con la protección ante la pérdida de linfocitos T CD4+ provocando una mayor capacidad de proliferación y producción de citocinas

proinflamatorias. Esto implica una mejora en la inmunidad adaptativa, sobre la que se ha descrito una asociación entre las respuestas de linfocitos T CD4+ y CD8+ citotóxicos Gag-específicos con una alta polifuncionalidad y un potente control viral. (31,34,35).

Otros factores relevantes relacionados con el control viral son los genotipos de CCR5, CCR2 y SDF1, así como los genes KIR3DS1, debido a su alta representación en los ECs. El genotipo $\Delta 32$ -CCR5 es la variante del correceptor de quimicocinas CCR5 con una delección de 32 pares de bases. Esta alteración provoca la disfuncionalidad del receptor, por lo que el virus no es capaz de penetrar en la célula huésped (34).

En refuerzo a la idea de una causa multifactorial como solución al control virológico, se ha apuntado que la combinación de varios factores como los genotipos CCR5, CCR2 y SDF1, los genes HLA y polimorfismos IFNL4 pueden funcionar como marcadores biológicos en la predicción del estado LTEC. Aun así, la heterogeneidad en esta área es objeto de incertidumbre en la afirmación de los factores que realmente juegan un papel crucial en estos controladores, puesto que no todos los ensayos realizados en ECs han reportado los mismos resultados (31,34).

2.2 Pérdida espontánea del control del VIH

Existe una proporción de ECs que, a pesar de haber controlado durante largos periodos de tiempo la replicación viral, pierden esta capacidad. De hecho, aproximadamente el 30% de los ECs experimentan una pérdida del control virológico, aunque no se conoce con exactitud el desencadenante de este proceso (38).

Los principales factores que preceden a la pérdida del control viral son un bajo índice de respuesta de las células T Gag-específicas, la disminución de la polifuncionalidad de los linfocitos T CD8+ Gag-específicos, la diversidad vírica asociada a dicha polifuncionalidad y los altos niveles de biomarcadores solubles y citoquinas proinflamatorias (38). Otro fenómeno que posiblemente contribuye a esta pérdida es el cambio de tropismo viral de CCR5 a CXCR4, así como los niveles plasmáticos persistentes de viremia residual (31,39).

No siempre se cumple este patrón de factores en todos los ECs que pierden el control. Tanto los factores del huésped como los del virus participan en este proceso, y proceder a su caracterización es un punto clave para anticiparse y poder identificar a los controladores de élite que pasarán a formar parte de los controladores transitorios (TC) (38).

3. Metabolómica

El rol de la metabolómica en la investigación del VIH se basa en el estudio del inmunometabolismo, tratando de explorar el papel crucial que desempeñan las vías metabólicas en las células inmunitarias y comprender como esta relación está asociada a los efectos provocados mediante la respuesta inmunitaria (40).

La medida de productos metabolómicos específicos en fluidos biológicos ha revelado diferencias en los fenotipos de los individuos infectados por VIH y ha permitido la identificación de biomarcadores asociados a la evolución natural de la infección que participan en la contención viral junto con diversas características inmunológicas. Sin embargo, no existe ningún estudio longitudinal que determine un perfil metabólico relacionado a la pérdida espontánea del control por parte de los ECs. Por el contrario, hay evidencia de ciertos metabolitos que marcan una diferencia significativa entre los perfiles de los controladores persistentes (PC) y controladores transitorios (TC). Estas diferencias metabólicas podrían revelar un patrón distintivo que permitiría tener nuevas perspectivas para futuros diseños de vacunas y estrategias de tratamiento (40).

El primer estudio (40) que ha revelado una reprogramación metabólica asociada al control espontáneo persistente del VIH muestra una glicólisis aumentada en pacientes VIH+ que derivaron en TCs. Mediante este estudio se ha observado que antes de la pérdida de control, los TCs presentan un aumento en la glucólisis aeróbica, actividad mitocondrial desregulada, estrés oxidativo y activación inmunológica. Además, los niveles plasmáticos de valina, uno de los tres aminoácidos de cadena ramificada (BCAA), son una característica diferencial entre los TCs y PCs. Tanto los niveles de valina como los de los intermediarios catabólicos, como el ácido α -cetoisocaproico, que pueden entrar al ciclo de Krebs están elevados a causa de un cambio de fosforilación oxidativa a glicólisis (40,41).

A su vez, una de las determinaciones realizadas en muestras pre- y post-pérdida del control en TCs reveló un incremento en el colesterol LDL (lipoproteínas de baja densidad), el número de partículas de tamaño mediano LDL y no HDL (lipoproteínas de alta densidad) y el ratio de partículas LDL/HDL tras la pérdida del control (40).

Considerando la importancia de los resultados que este tipo de análisis puede ofrecer, es necesaria la realización de múltiples estudios para identificar el fenotipo de los controladores persistentes y determinar dianas susceptibles para el diseño de estrategias inmunoterapéuticas con el objetivo de conseguir una remisión a largo plazo del VIH en ausencia de la terapia antirretroviral (40).

4. Lipidómica

El análisis lipidómico sirve para cuantificar diversas especies individuales que utilizando métodos bioquímicos convencionales no se detectarían (42). En el caso del VIH, esta ómica permite la caracterización de cambios dinámicos en la composición lipídica durante la infección por VIH y el tratamiento con terapia antirretroviral (43).

Existe evidencia de que tanto la infección por VIH como el tratamiento con ART están asociadas a anomalías lipídicas que potencian el riesgo a padecer enfermedades cardiovasculares (*Cardiovascular Disease*, CVD) como consecuencia del efecto directo que provocan en el tejido adiposo y en el funcionamiento del hígado. Concretamente, la enfermedad del hígado graso no alcohólico (*Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*, NAFLD) es muy frecuente en las personas con VIH, y está ligada a complicaciones cardiovasculares (42,43).

Los lípidos son biomoléculas que desempeñan funciones metabólicas, inflamatorias e inmunológicas. Por ende, un desequilibrio en su metabolismo, así como en su señalización, está estrechamente ligado a patologías como CVD y NAFLD (42). Otras enfermedades han sido recientemente asociadas a trastornos lipídicos, entre las que se encuentran la diabetes, la obesidad, la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y el Alzheimer (43).

Asimismo, la morbilidad y mortalidad continúan siendo significativamente elevadas en los pacientes VIH+, principalmente por la aterogénesis desarrollada a causa de una hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia y niveles reducidos de colesterol HDL. Estas patologías provocan reacciones de inflamación, generalmente crónica en estos individuos. La relación entre inflamación y lípidos es compleja, ya que la activación del sistema inmune puede ser tanto causa como consecuencia de las anomalías lipídicas en la infección por VIH (43,44).

Observando los avances realizados en torno a la caracterización de un perfil lipidómico preciso de pacientes VIH+, se reafirma la necesidad de estudios exhaustivos que permitan conocer con exactitud las vías implicadas y así poder desarrollar terapias personalizadas que igualen tanto la eficacia como la tolerancia de las terapias antirretrovirales, pero reduciendo la incidencia de CVD como la de otras complicaciones metabólicas asociadas (42).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Poseer el control de la replicación viral en ausencia del tratamiento antirretroviral es la más característica aptitud de los controladores de élite, razón por la cual se han convertido en el punto de mira como cura potencial contra el VIH. No obstante, se ha determinado que un porcentaje significativo de estos ECs acaban perdiendo esta singular capacidad.

El desconocimiento de los factores responsables del control espontáneo de la replicación viral, así como de su posterior pérdida, han incentivado la necesidad de investigación en este tipo de pacientes. Para ello, las ciencias ómicas han resultado ser una herramienta fundamental en este estudio, permitiendo describir unos perfiles más completos asociados a los controladores de élite. Asimismo, se han realizado diversos estudios metabolómicos y lipidómicos, tratando de caracterizar los marcadores biológicos asociados a la pérdida del control espontánea. Sin embargo, a día de hoy no existe un perfil concreto que permita identificar aquellos pacientes ECs que acaben perdiendo el control virológico o inmunológico. Consecuentemente, la hipótesis de este trabajo se fundamenta en la distinción de un perfil metabolómico y lipidómico desencadenante de la pérdida de control de la replicación viral, el cual proporcionaría el conocimiento de las vías mecanísticas involucradas, así como la determinación de los potenciales marcadores biológicos predictivos de esta condición. Adicionalmente, esta caracterización supondría un gran avance en el planteamiento de nuevas dianas terapéuticas.

Para llevar a cabo la hipótesis planteada se han realizado análisis metabolómicos y lipidómicos en el plasma de pacientes ECs, con la finalidad de encontrar factores del huésped que puedan estar asociados con los distintos fenotipos de ECs.

Cabe remarcar que este estudio pertenece a un proyecto más ambicioso en el que participan distintos grupos pertenecientes a la Red de SIDA de España, y en los que los objetivos que se proponen lograr son expuestos a continuación:

- Caracterizar el fenotipo especial LTEC (Long-Term Elite Controller).
- Evaluar los factores virológicos, inmunológicos y otros factores del huésped asociados con estos fenotipos de pacientes ECs.
- Determinar las características clínicas asociadas a los diferentes fenotipos de pacientes ECs.
- Analizar otros correlatos del huésped asociados con los fenotipos de pacientes ECs.

Así, la evaluación de los factores virológicos asociados a la pérdida del control de los ECs se lleva a cabo en Madrid, mientras que la de los factores inmunológicos se realiza en Sevilla. El objetivo que se ha planteado para el grupo INIM y, por tanto, en el que se basa mi presente trabajo, es el de la evaluación de otros factores del huésped asociados con los fenotipos especiales de pacientes ECs mediante los análisis metabolómicos y lipidómicos.

METODOLOGÍA

1. Recogida de muestras, datos clínicos y demográficos

Los 46 pacientes de estudio fueron sometidos a una extracción de sangre, la cual se recogió en tubos con EDTA para el posterior análisis de las muestras. Con el fin de obtener el plasma de las muestras sanguíneas, estas se centrifugaron tras su recolección y se guardaron en congeladores a -80°C para su correcto almacenamiento hasta realizar los análisis necesarios. Todas las muestras fueron recibidas, procesadas y almacenadas en el BioBanco español de VIH HGM, perteneciente a la Red de Investigación en SIDA (RIS). Los datos obtenidos se registraron en la base de datos expresamente diseñada para la cohorte de controladores de élite (ECRIS) de RIS. Previamente a la investigación, todos los pacientes que la conforman dieron su consentimiento y los protocolos a seguir se aprobaron por los comités éticos institucionales oportunos.

La labor de procesamiento de las muestras para el análisis metabolómico y lipidómico se llevó a cabo por parte del personal de laboratorio del Grupo de Investigación en Infección e Inmunidad (INIM) del Instituto de Investigación Sanitaria Pere Virgili (IISPV), en los laboratorios del Hospital Joan XXIII de Tarragona. Estas muestras plasmáticas se trasladaron después al Centro de Ciencias Ómicas (COS) de Reus, donde realizaron los análisis metabolómicos y lipidómicos pertinentes. Finalmente, con los datos obtenidos en el COS, se efectuó el análisis estadístico en el que se fundamenta el presente trabajo, también realizado por el grupo INIM.

2. Análisis metabolómico por GC-(EI)qTOF/MS de las muestras

Para el análisis metabolómico se realizó una extracción de precipitación proteica mediante la adición de 8 volúmenes de metanol:agua (8:2) a las muestras de plasma, que contiene una mezcla de patrones internos (ácido-d₄ succínico, ácido-d₂₇ mirístico, glicerol-¹³C₃ y D-glucosa-¹³C₆). Las muestras se mezclaron e incubaron a 4°C durante 10 minutos, se centrifugaron a 15000 rpm y el sobrenadante se evaporó hasta secarlo antes de llevar a cabo la derivatización de compuestos (metoximación y sililación). Los compuestos derivatizados se analizaron en GC-qTOF (modelo 7200 de Agilent, USA). La separación cromatográfica se basó en el Método Fiehn, utilizando un J&W Scientific HP5-MS (30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 µm) con columna capilar y helio como gas carrier usando un programa de horno desde los 60°C hasta los 325°C. La ionización se realizó por impacto electrónico (IE), con una energía electrónica de 70eV y operado en modo Scan completo. Además de los compuestos diana del metabolismo de carbono central, los cuales se cuantificaron utilizando las cubras de calibración de patrón interno, se realizó un screening de identificación de otros metabolitos mediante el emparejamiento de su espectro de masas y tiempo de retención con la biblioteca Fiehn (de Agilent), la cual contiene más de 1400 metabolitos. Tras una identificación putativa de los metabolitos, estos se semicuantificaron en términos de la relación de respuesta de patrón interno.

3. Análisis lipidómico por UHPLC-qTOF/MS de las muestras

Para la extracción de lípidos más hidrofóbicos, se realizó una extracción líquido-líquido con cloroformo:metanol (2:1) basada en el procedimiento Folch, añadiendo 4 volúmenes de cloroformo:metanol (2:1) a las muestras de plasma, que contiene una mezcla de patrón interno (Lipidomic SPLASH). Las muestras se mezclaron e incubaron a -20°C durante 30 minutos. Después, se añadió agua y NaCl (0.8%) y se centrifugó a 15000rpm. Se recogió la fase inferior, se evaporó hasta secado y se reconstituyó con metanol:metil-ter-butil-eter (9:1), y se analizó con UHPLC-qTOF (modelo 6550 de Agilent, USA) en modo de ionización de electrospray positivo. La cromatografía consiste en una elución con una fase móvil terciaria que contiene agua, metanol y 2-propanol con 10mM de formato de amonio y 0.1% de ácido fórmico. La fase estacionaria fue una columna C¹⁸ (Columna C¹⁸ Kinetex EVO, 2.6 µm, 2.1 mm x 100 mm) que permite la elución secuencial de los lípidos más hidrofóbicos como los lisofosfolípidos, esfingomielinas, fosfolípidos, diglicéridos, triglicéridos y éster de colesterilos, entre otros. La identificación de las especies lipídicas se realizó por emparejamiento de sus

espectros de masa precisa y masa en tándem, cuando disponible, con Metlin-PCDL de Agilent, que contiene más de 40000 metabolitos y lípidos. Además, el comportamiento cromatográfico de los patrones puros de cada familia y la información bibliográfica se utilizó para asegurar su identificación putativa. Tras la identificación putativa de los lípidos, estos fueron semicuantificados en términos de la relación de respuesta de patrón interno, utilizando un patrón interno para cada familia de lípidos.

4. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante diversos programas estadísticos y de representación gráfica, principalmente, el software IBM SPSS Statistics 23 y el analizador de datos on-line MetaboAnalyst. Los resultados obtenidos con estos programas se consideraron de valor significativo cuando el p-valor es inferior a 0.05.

Inicialmente, se realizó la prueba no paramétrica Kolmogórov-Smirnov, mediante la cual se verificó que las muestras no seguían una distribución normal. Como consecuencia, todas las pruebas estadísticas ejecutadas son de carácter no paramétrico.

Con el objetivo de identificar los metabolitos significativos entre los distintos grupos de ECs, se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para la comparación de más de 3 grupos de estudio. Con los parámetros que resultaron significativos se realizó la Prueba U de Mann-Whitney, la versión no paramétrica de muestras independientes equivalente a la prueba t de Student. Este análisis permite determinar los compuestos distintivos de los diferentes fenotipos, estudiando 2 grupos por cada prueba realizada.

Se efectuó esta misma prueba estadística para obtener los lípidos significativos, aplicando las mismas agrupaciones para comparar los fenotipos de estudio.

Paralelamente se usó el programa on-line para el análisis de datos metabolómicos MetaboAnalyst. Este programa ofrece un amplio espectro de formatos de visualización de datos, de los cuales se han utilizado el ANOVA (Analysis of Variance), PLS-DA (Partial Least Squares Discriminant Analysis) y *Pathway Analysis*, entre otros.

ANOVA es un test estadístico que gráficamente permite la visualización de si una comparación es significativa o no a primera vista. Esta prueba suele proseguir con otros análisis para identificar cuáles son las diferencias entre las comparaciones realizadas.

El PLS-DA se trata de un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales. A través de este análisis se puede comprobar si los componentes significativos permiten realizar una separación sustancial entre los diversos grupos.

Finalmente, tras identificar los metabolitos y los lípidos distintivos, utilizando de nuevo MetaboAnalyst, se realizó el análisis preciso para identificar las rutas metabólicas en las que están implicados los componentes. Esta identificación puede servir como herramienta para entender el porqué de los componentes significativos de los grupos, estudiando las consecuencias de un aumento o disminución de la actividad de dichas rutas metabólicas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Características de los pacientes estudiados

En función de las muestras de plasma disponibles para la investigación, se seleccionaron un total de 46 pacientes clasificados como controladores de élite, los cuales tenían una carga viral por debajo del límite de detección establecido, esto es, inferior a 50 copias de ARN VIH-1 por mililitro, y todos ellos en ausencia de tratamiento antirretroviral durante mínimo un año.

Este número total de pacientes se clasificó en 3 grupos según el fenotipo que expresaron: No-LTEC, LTEC-Loosing Control (LTEC-LC) y True-LTEC. Esta clasificación de fenotipos se realizó en función del tiempo que estos pacientes tuvieron la capacidad de mantener el control virológico y/o inmunológico. Concretamente, los pacientes No-LTEC son aquellos que pierden este control en un periodo inferior a 5 años, de los cuales son 9 de los 46 pacientes; los LTEC-Loosing Control, donde se clasifican 22 de los controladores de élite estudiados, mantienen el control durante al menos 5 años, aunque a lo largo de su seguimiento se detecta la pérdida del control, bien virológico (5 de los LTEC-LC) como inmunológico (13 de LTEC-LC), incluso ambos (4 de LTEC-LC); los True-LTEC también mantienen el control durante 5 años, pero a diferencia del grupo anterior, continúan con esta capacidad durante todo su seguimiento, y este grupo está constituido por los 15 pacientes ECs restantes.

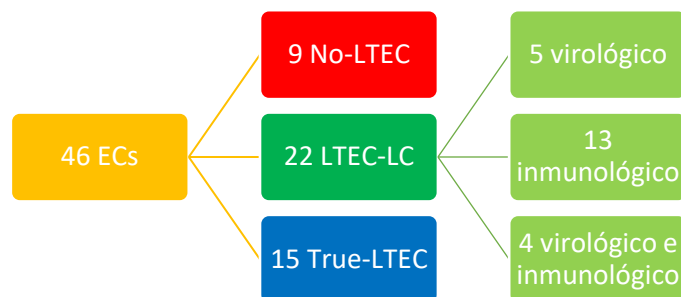


Figura 7. Clasificación de los 46 pacientes ECs. En la primera división se encuentra el número de pacientes que pertenece a cada fenotipo de estudio. En la tercera columna se representa el número de pacientes asociado a cada tipo de pérdida de control.

2. Metabolómica

A través del análisis metabolómico no dirigido, se han detectado un total de 78 metabolitos en las muestras de plasma de los pacientes ECs del estudio en cuestión. Sin embargo, no todos estos metabolitos han resultado tener un valor estadístico significativo a la hora de distinguir los perfiles metabólicos de los diferentes grupos de ECs.

Para llevar a cabo esta discriminación, se efectuó la prueba estadística Kruskal-Wallis, con el software estadístico SPSS, la cual revela, en este caso, los metabolitos significativos para los 3 grupos seleccionados. Tras excluir los metabolitos con un p-value superior a 0.05, este cribado concluye con un total de 8 metabolitos significativos para el estudio. Estos metabolitos significativos, así como sus respectivos p-value, se pueden encontrar en el *Anexo 1*.

Complementariamente, mediante la prueba U de Mann-Whitney se observó la repercusión de estos 8 metabolitos en el análisis de comparación entre 2 grupos.

Por otro lado, también se analizó el total de los 78 metabolitos con el programa MetaboAnalyst, comenzando por la normalización de los datos. Tras este proceso de normalización, en el que los datos se transforman en valores logarítmicos, se obtuvo el siguiente gráfico, donde se representan las concentraciones de ciertos componentes. El programa no permite la visualización de más de 50 componentes, pero considera todas las concentraciones para generar la representación.

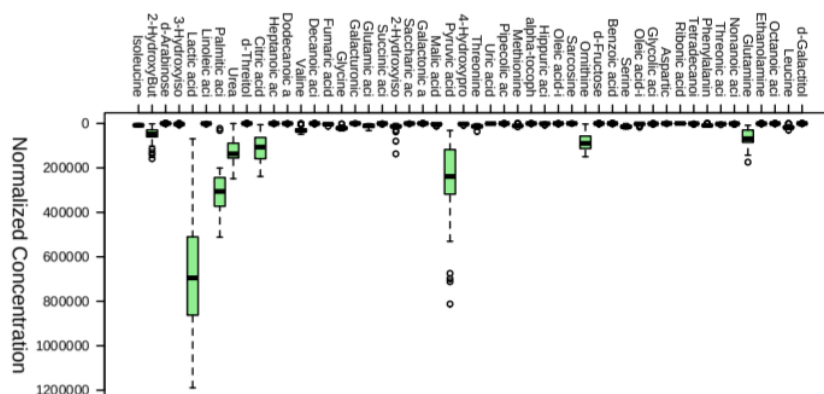


Figura 8. Diagrama de cajas y de densidad tras normalización de los datos. Los diagramas de cajas de densidades están representados en función de las concentraciones de todos los compuestos de todas las muestras.

Una vez normalizados los datos, MetaboAnalyst permite una amplia variedad de métodos para el análisis metabólico. En primer lugar, se realizó uno de los métodos de análisis de univariantes, ANOVA (no paramétrico). Esta prueba analítica solo permite observar si la comparación general es significativa o no, por lo que suele ser necesaria la realización de más pruebas. El gráfico obtenido no mostró ningún componente que a primera vista resultase significativo, por lo que se prosiguió con diversos análisis más.

El análisis PLS-DA, uno de los métodos de análisis de multivariante, es una herramienta que permite ver si existe una separación significativa entre los grupos de estudio. Para evaluar la importancia de la discriminación, se realizó simultáneamente un test de permutación. Además, el PLS-DA permite la visualización de los datos obtenidos de diversas formas de representación gráfica. Entre ellos, el Scores Plot y VIP scores, que podemos encontrar en la Figura 9. En la primera de las representaciones gráficas podemos observar que con el conjunto de metabolitos identificados no existe una distinción de alta precisión entre los 3 grupos de estudio. Sin embargo, este suceso no descarta que algún metabolito concreto no pueda ser potencial marcador biológico para generar un perfil metabólico distintivo. De hecho, el análisis VIP Score ha identificado los 15 metabolitos con mayor poder discriminatorio entre los distintos grupos de estudio.

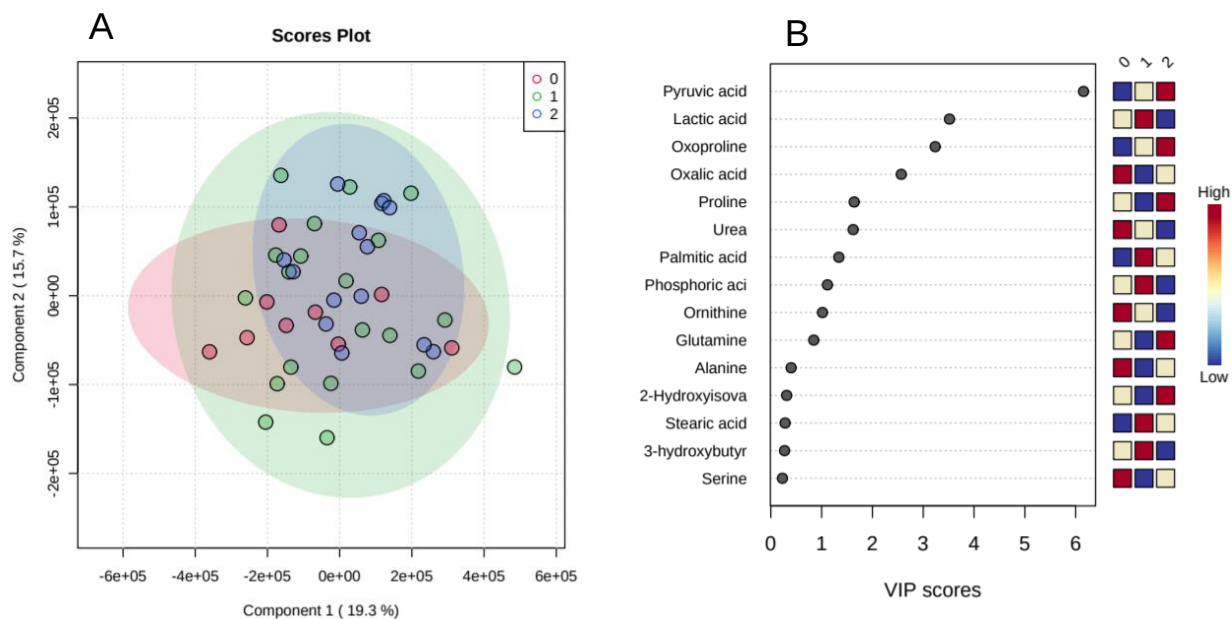


Figura 9. Representaciones gráficas del análisis metabolómico con PLS-DA entre los grupos No-LTEC (0), LTEC-Loosing Control (1) y True-LTEC (2). A) Scores Plot de los componentes principales seleccionados. El rectángulo de la parte superior derecha es la descripción de los grupos de estudio analizados en este gráfico. B) VIP Scores. Componentes importantes identificados por el PLS-DA. Los colores de las cajas de la parte derecha representan las concentraciones relativas de los metabolitos correspondientes en cada grupo de estudio.

Por otro lado, se llevó a cabo un análisis de las rutas metabólicas en las que se encuentran implicados los metabolitos que resultaron estadísticamente significativos a través del análisis SPSS para el presente estudio. Este procedimiento se realizó también a través del analizador de datos MetaboAnalyst, y reveló que las principales rutas en la que se encuentran involucrados los 8 metabolitos son el metabolismo del piruvato, la biosíntesis de arginina y el ciclo del citrato o ciclo de Krebs. La representación íntegra de estas 3 rutas principales se encuentra en el Anexo 3, 4 y 5.

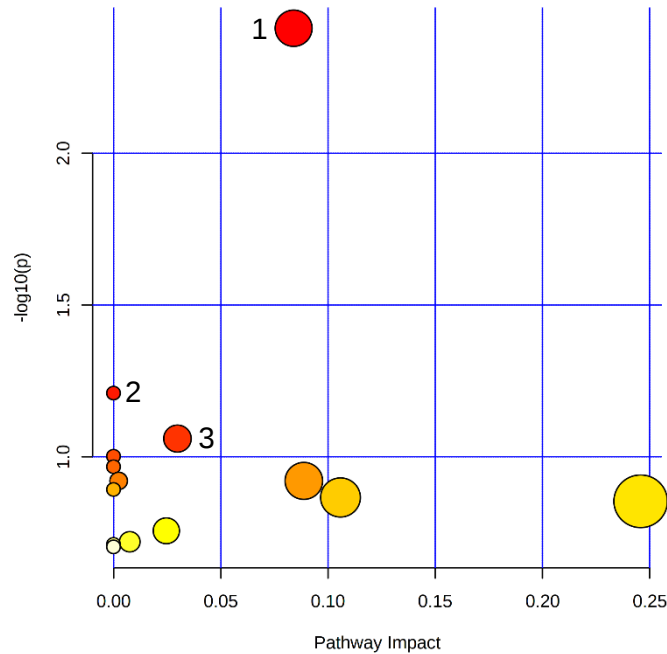


Figura 10. Visión general de las rutas metabólicas. Las esferas que varían en un rango de color de amarillo a rojo significan que los metabolitos seleccionados están implicados en las rutas representadas con diferentes niveles de implicación, de menor a mayor respectivamente. La esfera con el número 1 representa el metabolismo del piruvato; la esfera 2 indica la biosíntesis de arginina; la esfera de número 3 hace referencia al ciclo de Krebs.

Como se ha visto en la Figura 10, el metabolismo del piruvato es la ruta metabólica más importante en base a la implicación de los metabolitos significativos de estos grupos de estudio. El ácido pirúvico o piruvato, es el producto final de la glucólisis, y puede ser metabolizado por diferentes vías para generar etanol, lactato o acetil-coenzima A. El lactato o ácido láctico es uno de los metabolitos significativos obtenidos mediante los análisis estadísticos, el cual se encuentra significativamente reducido en el grupo de estudio True-LTEC en comparación con los otros dos grupos, donde el promedio de este metabolito es prácticamente igual en ambos. Como consecuencia, es probable que los controladores de élite que mantienen el control virológico e inmunológico durante todo su seguimiento tengan una glucólisis disminuida, puesto que implicaría una menor producción de piruvato y por consiguiente su metabolización sería también menor, provocando la reducción significativa del ácido láctico representativa de los True-LTEC.

En segundo lugar, se encuentra la biosíntesis de arginina, un aminoácido esencial con la capacidad de estimular la función inmunológica mediante el aumento del número de leucocitos. Su biosíntesis se lleva a cabo a partir de la citrulina, la cual puede generarse a través de diferentes vías. Cabe destacar la de la ornitina vía catabolismo de la glutamina o glutamato, puesto que ambos metabolitos se encuentran significativamente reducidos en los ECs que acaban perdiendo el control. Este hecho lleva a la posibilidad

de que estos LTEC-Loosing Control pierdan el control inmunológico a causa de un descenso en sus niveles de glutamina y glutamato, provocando una menor producción de citrulina y consecuentemente de arginina, disminuyendo así su producción de leucocitos y perjudicando su sistema inmunitario.

Por último, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, más comúnmente conocido como el ciclo de Krebs, es la tercera ruta destacable como anteriormente se ha podido observar en la *Figura 10*. En este caso, algunos de los intermediarios del ciclo se han visto tanto incrementados como disminuidos según el grupo de ECs. Por ejemplo, el ácido fumárico se encuentra en menor concentración en los True-LTEC, pero el intermediario más significativo en este caso es el ácido succínico, puesto que presenta un aumento muy significativo entre los pacientes clasificados como No-LTEC. En términos generales, el nivel de los intermediarios en los No-LTEC se encuentra aumentado en comparación con los otros dos grupos de estudio. Esta producción incrementada de los metabolitos, acentuando el ácido succínico, podría implicar un ciclo de Krebs de mayor actividad en este grupo, provocada por una mayor generación de piruvato, consecuencia directa de una glucólisis de actividad aumentada, fundamentando la conclusión expuesta en relación con la primera ruta metabólica.

Los datos obtenidos simulan ser un inicio en la construcción de un perfil metabolómico representativo de los diferentes grupos de ECs, permitiendo así un conocimiento exhaustivo de las características de cada uno de los fenotipos. Sin embargo, una de las claves para considerar los pacientes True-LTEC como posibles curas potenciales del VIH se basa en encontrar el perfil distintivo que precede a la pérdida del control.

Por el momento, el perfil diferencial revela la existencia de alteraciones en rutas metabólicas, principalmente en el metabolismo del piruvato, la biosíntesis de arginina y el ciclo de Krebs. Como previamente se ha expuesto, estas vías presentan variaciones en función de los fenotipos de estudio, pero estos cambios no están directamente asociados a la pérdida del control virológico y/o inmunológico en esta clase de pacientes.

Existe un estudio (40) que demuestra la existencia de un perfil metabolómico representativo de los controladores transitorios y persistentes, siendo el primero en identificar las alteraciones metabólicas asociadas a la pérdida del control de la replicación viral. Sin embargo, el reciente descubrimiento de este perfil distintivo entre los No-LTEC, LTEC-Loosing Control y True-LTEC demuestra que no se han realizado suficientes estudios en base a esta capacidad de los ECs. Consecuentemente, a medida que nuevos estudios son realizados, se identifican nuevos metabolitos significativos de

esta característica, lo que conlleva a modificar aspectos del perfil previamente generado. Asimismo, hay que recalcar que el número de pacientes sobre el que se ha realizado el estudio es reducido y que los datos deben ser tratados con cautela.

Otro estudio previamente realizado reveló alteraciones en las rutas metabólicas citadas previamente en pacientes VIH+, principalmente en la glucólisis, el ciclo de Krebs y el metabolismo de los lípidos. A diferencia del estudio anterior, estas variaciones en las vías no fueron asociadas a una pérdida en el control del virus (45).

Un estudio en relación con la actividad metabólica de la glucosa demostró que el buen funcionamiento de este proceso es necesario para una activación celular correcta, una respuesta antiviral y otras funciones desencadenadas por el sistema inmunitario (46).

Complementariamente a esta determinación, una de las caracterizaciones realizadas en otro estudio indicó que los pacientes infectados con VIH presentaban una expresión aumentada del transportador de glucosa en los linfocitos T CD4, conjuntamente a una actividad mayor de la glucólisis, en comparación con los individuos sanos (47). Esta determinación refuerza una de las deducciones planteadas anteriormente, en la que se ha sugerido que los pacientes No-LTEC, es decir, los que en un periodo inferior a 5 años dejan de ser controladores de élite para volver a clasificarse como pacientes VIH+, presentan un aumento en la actividad de esta ruta metabólica.

3. Lipidómica

El análisis lipidómico efectuado en las muestras de plasma de los 46 pacientes ha revelado un total de 114 lípidos presentes en las mismas. De igual forma que con los metabolitos, no todos estos lípidos resultaron ser estadísticamente significativos entre los pacientes controladores de élite. Concretamente, solo 4 de los 114 lípidos han resultado tener un p-value inferior o igual a 0.05.

Inicialmente, de la misma forma que con el análisis metabolómico, se realizaron las pruebas estadísticas de Kruskal-Willis y U de Mann-Whitney a través del programa estadístico IBM SPSS Statistics. Este análisis reveló los 4 lípidos estadísticamente significativos en estos grupos de estudio, todos ellos pertenecientes a la familia de los triacilglicerolés. Los lípidos estadísticamente significativos y sus respectivos p-value pueden encontrarse en el *Anexo 2*.

Mediante la representación gráfica en la *Figura 11*, se puede ver que los 3 primeros lípidos representados se encuentran significativamente aumentados en los pacientes

LTEC-Loosing Control en comparación con los otros dos grupos de estudio. Este incremento en la concentración de los triacilglicéridos sugiere un perfil lipídico distintivo de los controladores de élite que manifestarán la pérdida del control.

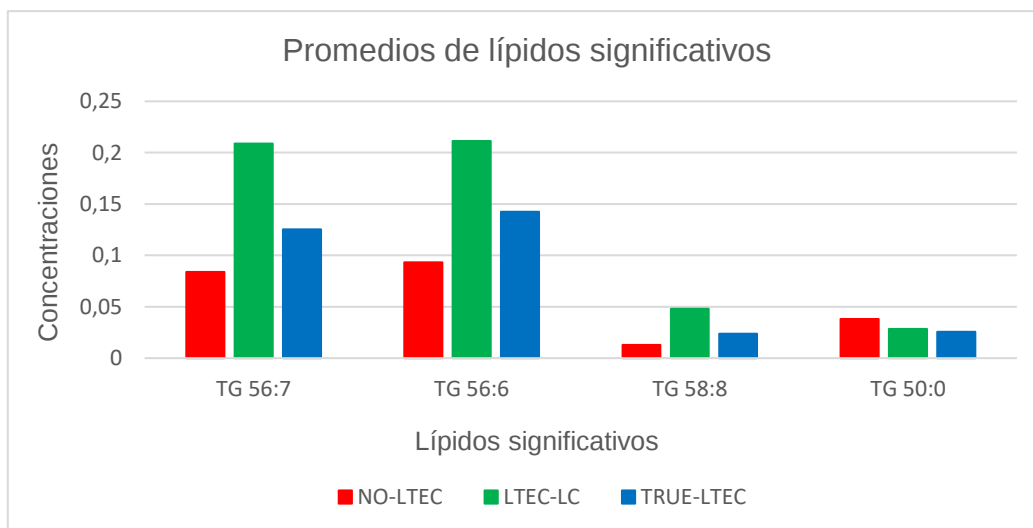


Figura 11. Representación gráfica del promedio de concentraciones de los lípidos significativos en los 3 grupos de estudio.

Para continuar con el análisis de los datos del estudio lipídico, se ha utilizado el programa on-line MetaboAnalyst, que también permite el análisis de datos lipídicos. Por consiguiente, se han podido realizar las mismas pruebas que para el análisis metabolómico. En primer lugar se efectuó el análisis ANOVA (no paramétrico), que no determinó ningún componente característico. Sin embargo, como se ha podido observar en la *Figura 11*, 3 de los lípidos estadísticamente significativos se encuentran muy elevados en uno de los grupos, el LTEC-Loosing Control, por lo que se continuó con otros análisis para completar la información obtenida.

También se desarrolló la prueba de PLS-DA, completándola con la visualización en Scores Plot y VIP Scores que se muestra en la *Figura 12*. En este segundo formato de visualización de datos se puede observar que se reafirma la hipótesis formulada en base a la *Figura 11*. En este caso, podemos ver como 3 de los lípidos analizados obtienen su mayor nivel de concentración relativa en el grupo 2, es decir, el LTEC-Loosing Control.

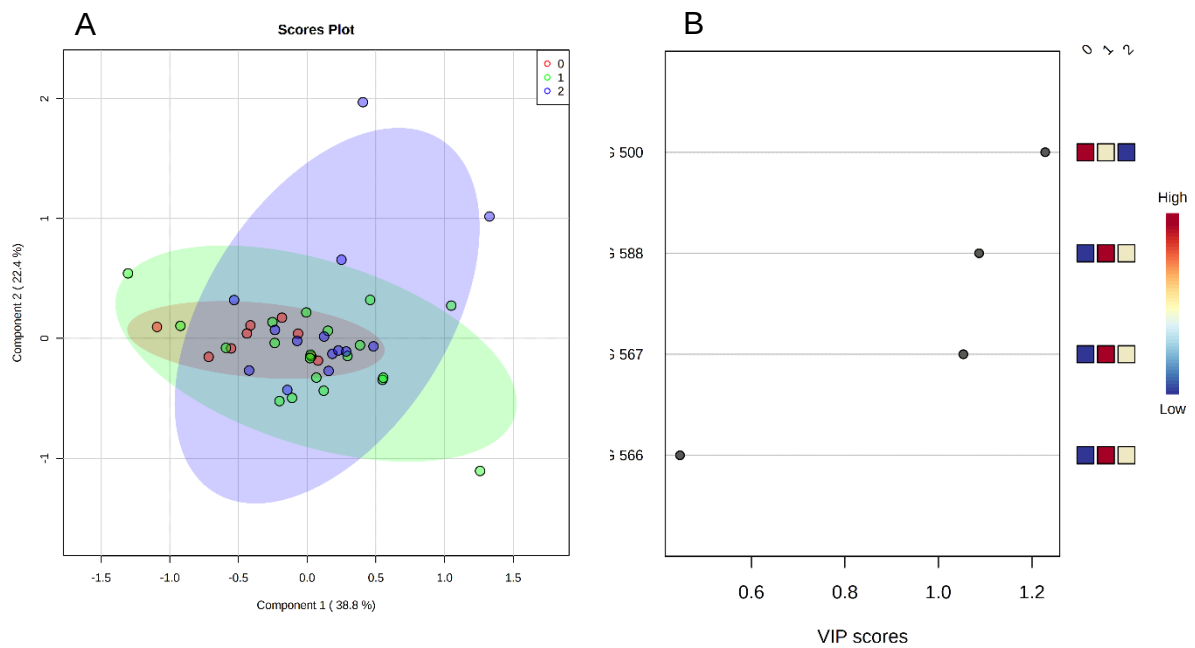


Figura 12. Representaciones gráficas del análisis lipidómico con PLS-DA entre los grupos No-LTEC (0), LTEC-Loosing Control (1) y True-LTEC (2). A) Scores Plot de los componentes principales seleccionados. El rectángulo de la parte superior derecha es la descripción de los grupos de estudio analizados en este gráfico. B) VIP Scores. Componentes importantes identificados por el PLS-DA. Los colores de las cajas de la parte derecha representan las concentraciones relativas de los lípidos correspondientes en cada grupo de estudio.

La ruta metabólica en la que estos lípidos están implicados es en la biosíntesis de los triacilglicéridos o TGs. Esta ruta comienza cuando la glucólisis produce ácido pirúvico y se metaboliza generando acetil-coenzima A, el cual entra en un proceso conocido como lipogénesis para generar los triglicéridos. Este proceso de biosíntesis de TGs está estrechamente relacionado con la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) en el hígado. Este órgano no es un sitio fisiológico de almacenamiento de triglicéridos y, como consecuencia, su acumulación produce un perfil patológico de esteatosis hepática. Además, una concentración anormalmente elevada de TGs en sangre provoca patologías como la aterosclerosis y riesgo de enfermedad cardiovascular. Es posible que los ECs que acaben perdiendo el control virológico y/o inmunológico puedan desarrollar estas enfermedades con una incidencia mayor que los otros dos grupos, por lo que analizar la sintomatología asociada a estas patologías en estos pacientes podría ser un factor determinante para pronosticar una posterior pérdida del control.

Existe evidencia de un perfil lipídico asociado a una predisposición de dislipidemia en pacientes VIH, pero, a diferencia del presente estudio, en presencia del tratamiento antirretroviral. Este perfil está caracterizado por el metabolismo de VLDL, el total de triglicéridos y los niveles de lactato, caracterizados como biomarcadores potenciales de esta predisposición (48). Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican un aumento de TGs en los pacientes LTEC-Loosing Control, los cuales podrían desencadenar una secreción aumentada de VLDL, coincidiendo con las observaciones del estudio anterior. Así, estos parámetros podrían ser indicativos de la predisposición de dislipidemia en estos pacientes, mas sin tratamiento antirretroviral, como consecuencia de la pérdida del control sobre el VIH.

Por otro lado, se ha asociado el aumento en los niveles de glucosa y, por consiguiente, de la glucólisis, a pacientes con VIH que no son capaces de controlar el virus (47). Teniendo en cuenta que los LTEC-Loosing Control son el grupo de ECs con los niveles de TGs más altos, es posible que estas alteraciones se deban al previo aumento en los niveles de glucosa, puesto que este metabolito es uno de los sustratos para la formación de acetil-coenzima A, que desencadena la biosíntesis de estos lípidos. Por tanto, un aumento significativo en los niveles de glucosa acompañado de elevadas concentraciones plasmáticas de triglicéridos podría ser un potencial biomarcador predictivo de la pérdida del control en los pacientes ECs.

CONCLUSIONES

El presente trabajo ha permitido desarrollar un primer esbozo de un perfil metabolómico y lipídico distintivo de los diversos grupos de controladores de élite que se han podido caracterizar hasta el momento. Además, se han podido identificar alteraciones en ciertas rutas metabólicas que podrían desencadenar en la pérdida del control virológico y/o inmunológico en pacientes controladores de élite. Determinados metabolitos implicados en las principales vías significativas descritas, tales como el metabolismo del piruvato, la biosíntesis de arginina, el ciclo de Krebs y la biosíntesis de triacilglicéridos, podrían funcionar como potenciales biomarcadores predictivos de la pérdida del control del virus en este grupo de pacientes VIH tan característico.

Los resultados obtenidos mediante este trabajo pueden ser contradictorios con estudios previamente publicados, ya que el número de pacientes VIH con esta capacidad es muy limitado. Por consiguiente, cada investigación puede plantear nuevas hipótesis y conclusiones que complementen o descarten las deducciones realizadas hasta el

momento. Sin embargo, considerando la importancia de encontrar nuevas estrategias terapéuticas contra el VIH que, como se está observando podría encontrarse en los ECs, se necesitan estudios complementarios para determinar un perfil distintivo. Se ha conseguido que el VIH sea una infección crónica controlable, pero el hallazgo de los controladores de élite y su característica dominancia sobre el virus abre las puertas al descubrimiento de la cura definitiva que termine por erradicar el Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

AUTOEVALUACIÓN

El día en el que la Dra. Anna Rull me confirmó que podía realizar las prácticas en su grupo de investigación fue un momento muy satisfactorio, puesto que desde un primer momento había encontrado realmente interesantes las líneas de investigación desarrolladas en dicho grupo y tenía gran atracción por poder colaborar en los estudios en cuestión. Por ello, me gustaría agradecer una vez más la oportunidad que se me ofreció.

En cuanto a mi estancia en prácticas respecta, debo destacar que no era consciente de todo el trabajo que hay tras un estudio científico, puesto que la labor del laboratorio es solo una parte de todo ello y generalmente no se conoce todo el trabajo tanto previo como posterior a éste. Asimismo, una de las tareas que más tiempo y dedicación me ha llevado ha sido la parte estadística, la transformación de valores numéricos a resultados que tomaban sentido en relación con los objetivos planteados. No obstante, el esfuerzo empleado ha resultado gratificante, y el desarrollo de este estudio ha sido un camino intenso pero reconfortante, y confío en que todo ello sea reflejado en la lectura del presente trabajo.

Por último, me gustaría recalcar que, pese a que ha sido un periodo más corto de lo que me habría gustado, en todo momento me he sentido una integrante más del grupo de investigación, tanto por el trato recibido como por la confianza que se ha depositado en mí a la hora de realizar las tareas. Además, he podido rodearme de increíbles personas, tanto en el ámbito profesional como personal, y cerrar esta etapa de mi vida de esta forma ha sido todo un orgullo y un bonito inicio a mi vida profesional como biotecnóloga.

BIBLIOGRAFÍA

1. Domingo P, Pachecho Y. Grupo de Investigación en Infección e Inmunidad (INIM) - RIS [Internet]. [cited 2020 Nov 3]. Available from: <https://www.redris.es/-/grupos/infeccion-e-inmunidad-hospital-joan-xxiii?redirect=%2Fgrupos#team-network-section>
2. COS | Centre for Omic Sciences [Internet]. [cited 2020 Nov 10]. Available from: <http://omicscentre.com/>
3. Seitz R. Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfus Med Hemotherapy*. 2016;43(3):203–22.
4. Deeks SG, Overbaugh J, Phillips A, Buchbinder S. HIV infection. *Nat Rev Dis Prim*. 2015;1(October).
5. Popper SJ, Sarr AD, Travers KU, Guèye-Ndiaye A, Mboup S, Essex ME, et al. Lower human immunodeficiency virus (HIV) type 2 viral load reflects the difference in pathogenicity of HIV-1 and HIV-2. *J Infect Dis*. 1999;180(4):1116–21.
6. Bbosa N, Kaleebu P, Ssemwanga D. HIV subtype diversity worldwide. *Curr Opin HIV AIDS*. 2019;14(3):153–60.
7. HIV/AIDS [Internet]. [cited 2021 Jan 7]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>
8. Posgrado UDE. UNIVERSIDAD NACIONAL “PEDRO RUIZ GALLO” Facultad de Medicina Humana UNIDAD DE POSGRADO PROGRAMA DE SEGUNDA ESPECIALIZACIÓN EN MEDICINA HUMANA. 2019;
9. Archivo:HI-virion-structure en.svg - Wikipedia, la enciclopedia libre. [cited 2020 Nov 5]. Available from: https://es.m.wikipedia.org/wiki/Archivo:HI-virion-structure_en.svg
10. Delgado R. Virological characteristics of HIV. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(1):58–65.
11. Watts JM, Dang KK, Gorelick RJ, Leonard CW, Bess JW, Swanstrom R, et al. Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. *Nature*. 2009;460(7256):711–6.
12. Becker JT, Sherer NM. *crossm Assembly*. 2017;91(6):1–22.
13. Freed EO. HIV-1 Replication. *Somat Cell Mol Genet* [Internet]. 2001;26(1):13–33. Available from: <https://doi.org/10.1023/A:1021070512287>
14. Lebbink RJ, De Jong DCM, Wolters F, Kruse EM, Van Ham PM, Wiertz EJHJ, et

- al. A combinational CRISPR/Cas9 gene-editing approach can halt HIV replication and prevent viral escape. *Sci Rep*. 2017;7(December 2016):1–10.
15. Soto-Ramírez LE. Mecanismos patogénicos de la infección por VIH. *Rev Investig Clin*. 2004;56(2).
 16. Alcamí J, Coiras M. Inmunopatogenia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(3):216–26.
 17. Viral Tropism | ClinicalInfo [Internet]. [cited 2020 Nov 9]. Available from: <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/glossary/viral-tropism>
 18. Mamede JI, Cianci GC, Anderson MR, Hope TJ. Early cytoplasmic uncoating is associated with infectivity of HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(34):E7169–78.
 19. Burdick RC, Li C, Munshi MH, Rawson JMO, Nagashima K, Hu WS, et al. HIV-1 uncoats in the nucleus near sites of integration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(10):5486–93.
 20. VIH - Epidemiología y situación mundial - Joomla [Internet]. 2016 [cited 2020 Nov 4]. Available from: <https://www.amse.es/informacion-epidemiologica/166-vih-epidemiologia-y-situacion-mundial>
 21. Gómez-Gonzalo M, Carretero M, Rullas J, Lara-Pezzi E, Aramburu J, Berkhout B, et al. The hepatitis B virus X protein induces HIV-1 replication and transcription in synergy with T-cell activation signals: Functional roles of NF- κ B/NF-AT and Sp1-binding sites in the HIV-1 long terminal repeat promoter. *J Biol Chem*. 2001;276(38):35435–43.
 22. Baxter AE, O'Doherty U, Kaufmann DE. Beyond the replication-competent HIV reservoir: Transcription and translation-competent reservoirs. *Retrovirology* [Internet]. 2018;15(1):1–15. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12977-018-0392-7>
 23. Codina C, Martín M, Ibarra O. La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Farm Hosp* [Internet]. 2002;1493–516. Available from: <https://www.sefh.es/bibliotecavirtual/fhtomo2/CAP21.pdf>
 24. Selinger C, Katze MG. Mathematical models of viral latency. *Curr Opin Virol* 2013;3(4):402–7.
 25. Aguilera A, Álvarez Estévez M, Reina González G, Rodríguez C. Diagnóstico microbiológico de la infección por el VIH. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2014. p36.
 26. Bueno Cañigral F, Artero Mora A. Historia natural y clasificación de la infección por VIH-I. *Revista española de drogodependencias*. 2002. p. 289–97.

27. Pantaleo G, Graziosi C, Butini L, Pizzo PA, Schnittman SM, Kotler DP, et al. Lymphoid organs function as major reservoirs for human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(21):9838–42.
28. Saha M, Bhattacharya S. A Brief Overview on HIV Infection, Diagnosis and Treatment. *Curr Top Med Chem*. 2020;19(30):2739–41.
29. Lamers SL, Rose R, Maidji E, Agsaldá-García M, Nolan DJ, Fogel GB, et al. HIV DNA Is Frequently Present within Pathologic Tissues Evaluated at Autopsy from Combined Antiretroviral Therapy-Treated Patients with Undetectable Viral Loads. *J Virol*. 2016;90(20):8968–83.
30. Carretero M. Terapia combinada antirretroviral. *Offarm* [Internet]. 2003;22(3):146–8. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-terapia-combinada-antirretroviral-13044463> ER
31. Navarrete-Muñoz MA, Restrepo C, Benito JM, Rallón N. Elite controllers: A heterogeneous group of HIV-infected patients. *Virulence*. 2020;11(1):889–97.
32. Ruiz-Mateos E, Poveda E, Lederman MM. Antiretroviral treatment for hiv elite controllers? *Pathog Immun*. 2020;5(1):121–33.
33. Gurdasani D, Iles L, Dillon DG, Young EH, Olson AD, Naranbhai V, et al. A systematic review of definitions of extreme phenotypes of HIV control and progression. *Aids*. 2014;28(2):149–62.
34. Lopez-Galindez C, Pernas M, Casado C, Olivares I, Lorenzo-Redondo R. Elite controllers and lessons learned for HIV-1 cure. *Curr Opin Virol*. 2019;38:31–6.
35. Casado C, Galvez C, Pernas M, Tarancon-Diez L, Rodriguez C, Sanchez-Merino V, et al. Permanent control of HIV-1 pathogenesis in exceptional elite controllers: a model of spontaneous cure. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–11.
36. 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* (80-). 1995 Nov 10; 270(5238):988–91.
37. Gebara NY, El Kamari V, Rizk N. HIV-1 elite controllers: An immunovirological review and clinical perspectives. *J Virus Erad*. 2019;2019(5.3):e10–3.
38. Pernas M, Tarancón-Diez L, Rodríguez-Gallego E, Gómez J, Prado JG, Casado C, et al. Factors Leading to the Loss of Natural Elite Control of HIV-1 Infection. *J Virol*. 2017;92(5):1–18.
39. Llano A, Olvera A, Ruiz-riol M, Rocafort M, Cobarsi P, Crespo M, et al. crossm Mechanisms of Abrupt Loss of Virus Control in a Cohort of. 2019;93(4).
40. Tarancon-Diez L, Rodríguez-Gallego E, Rull A, Peraire J, Viladés C, Portilla I, et al. Immunometabolism is a key factor for the persistent spontaneous elite control

- of HIV-1 infection. *EBioMedicine*. 2019;42:86–96.
41. Routy JP, Isnard S, Ramendra R. Following the elite: Targeting immunometabolism to limit HIV pathogenesis. *EBioMedicine*. 2019;42:8–9.
 42. Curran A, Rull A, Navarro J, Vidal-González J, Martin-Castillo M, Burgos J, et al. Lipidomics Reveals Reduced Inflammatory Lipid Species and Storage Lipids after Switching from EFV/FTC/TDF to RPV/FTC/TDF: A Randomized Open-Label Trial. *J Clin Med*. 2020;9(5):1246.
 43. Bowman E, Funderburg NT. Lipidome Abnormalities and Cardiovascular Disease Risk in HIV Infection. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2019;16(3):214–23.
 44. Rodríguez-Gallego E, Gómez J, Domingo P, Ferrando-Martínez S, Peraire J, Viladés C, et al. Circulating metabolomic profile can predict dyslipidemia in HIV patients undergoing antiretroviral therapy. *Atherosclerosis*. 2018;273:28–36.
 45. Hollenbaugh JA, Munger J, Kim B. Metabolite profiles of human immunodeficiency virus infected CD4⁺ T cells and macrophages using LC-MS/MS analysis. *Virology*. 2011 Jul 5; 415(2):153–9.
 46. Palmer CS, Ostrowski M, Balderson B, Christian N, Crowe SM. Glucose metabolism regulates T cell activation, differentiation, and functions. Vol. 6, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2015.
 47. Palmer CS, Ostrowski M, Gouillou M, Tsai L, Yu D, Zhou J, et al. Increased glucose metabolic activity is associated with CD4⁺ T-cell activation and depletion during chronic HIV infection. *AIDS*. 2014 Jan 28; 28(3):297–309.
 48. Rodríguez-Gallego E, Gómez J, Domingo P, Ferrando-Martínez S, Peraire J, Viladés C, et al. Circulating metabolomic profile can predict dyslipidemia in HIV patients undergoing antiretroviral therapy. *Atherosclerosis* . 2018 Jun 1; 273:28–36.

ANEXOS

Anexo 1

Tabla 1. Metabolitos estadísticamente significativos obtenidos mediante Kruskal Wallis

KRUSKAL WALLIS		
Metabolitos	Chi-cuadrado	p-value
Ácido láctico	7.098	0.029
Ácido-2-hidroxiisobutírico	7.219	0.027
Ácido octanoico	6.384	0.041
Glicina	10.019	0.007
Ácido fumárico	7.87	0.02
Ácido pipecólico	5.904	0.052
Ácido decanoico	7.78	0.02
Ácido indolelático	6.727	0.035

Anexo 2

Tabla 2. Lípidos estadísticamente significativos obtenidos mediante Kruskal Wallis

KRUSKAL WALLIS		
Lípidos	Chi-cuadrado	p-value
TG 56:7	6.453	0.04
TG 56:6	5.887	0.053
TG 58:8	7.213	0.027
TG 50:0	6.087	0.048

Anexo 3

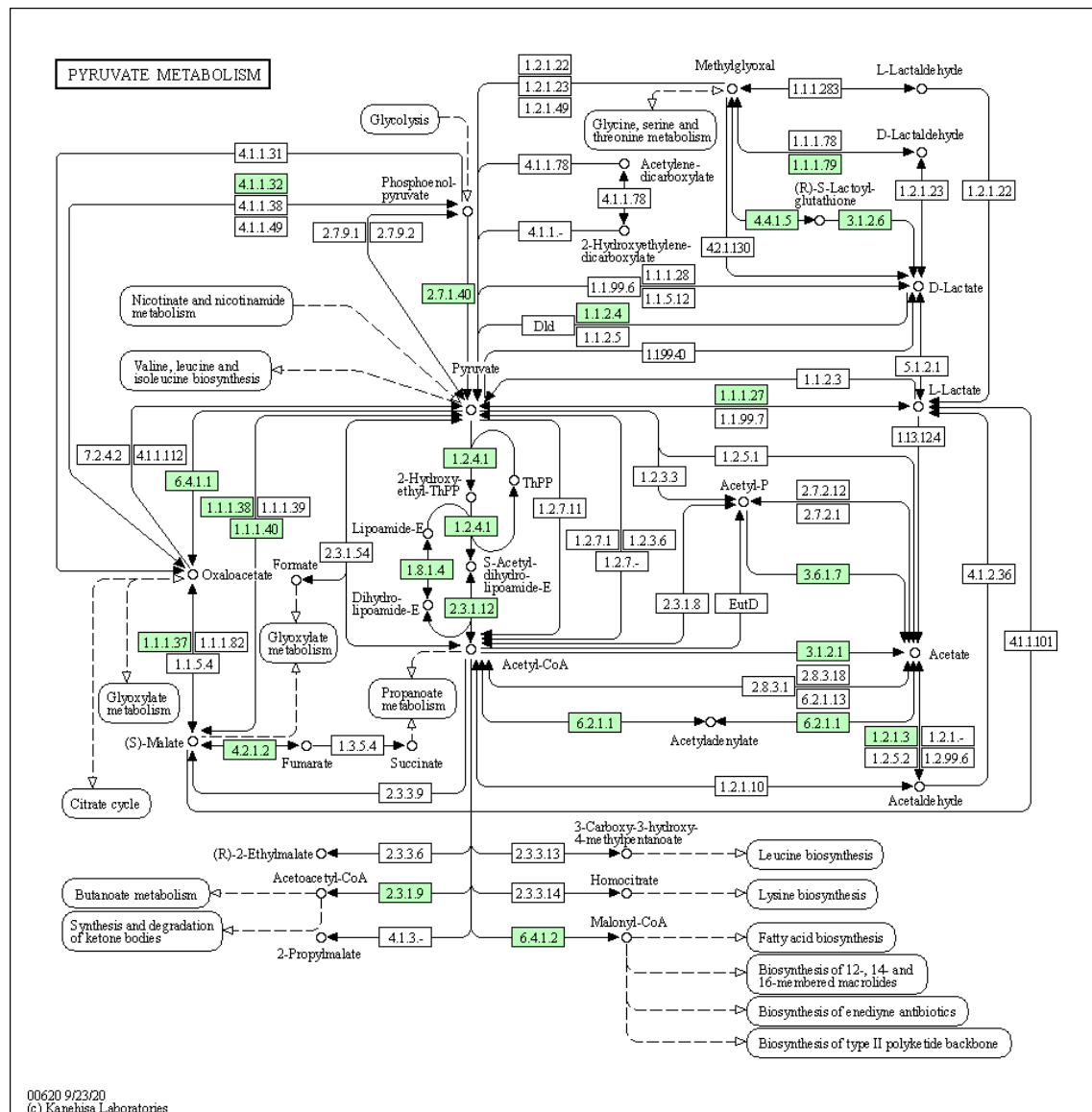


Ilustración 1. Metabolismo del piruvato.

Anexo 4

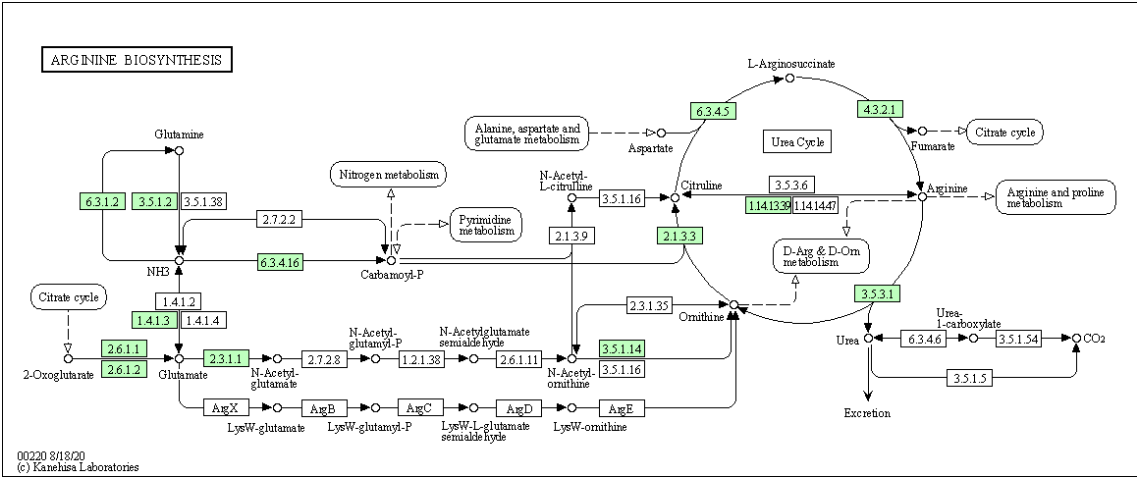


Ilustración 2. Biosíntesis de arginina.

Anexo 5

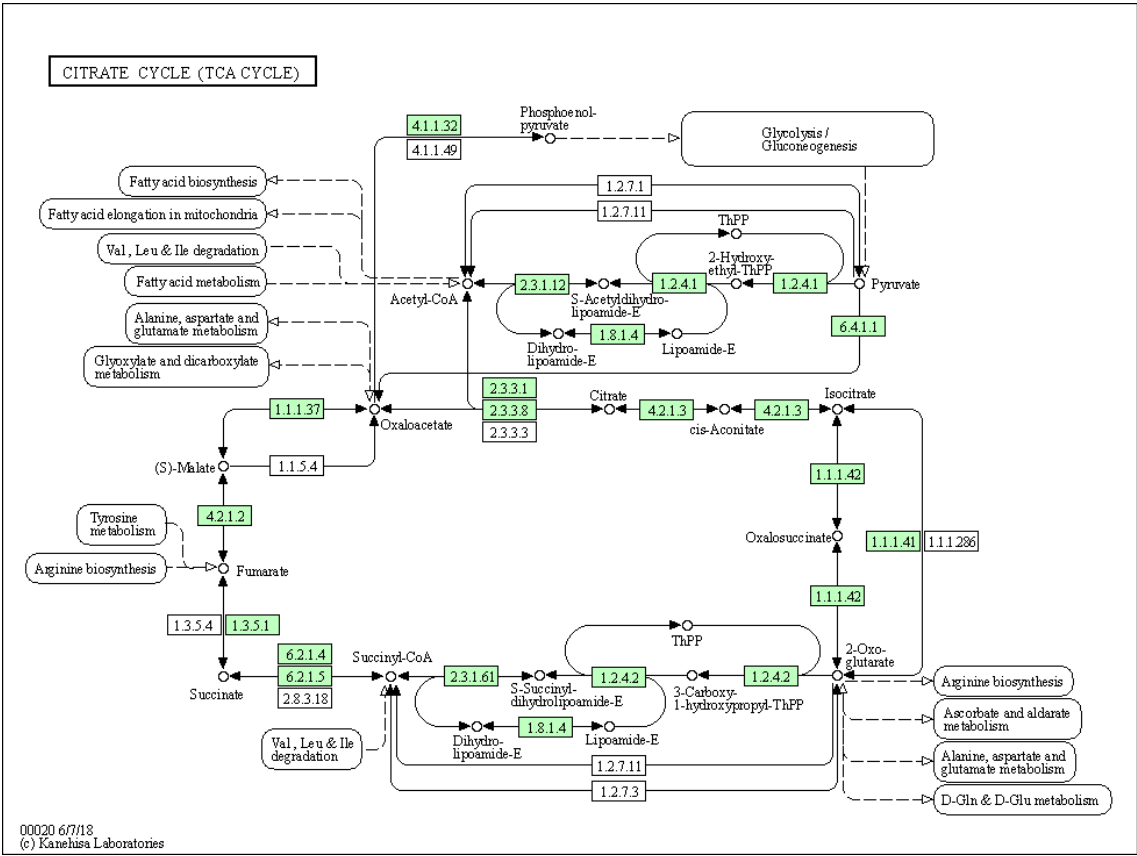


Ilustración 3. Ciclo de Krebs.