



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

**Grado de  
Biotecnología**

---

PERFIL METABOLÓMICO ASOCIADO  
A LA PÉRDIDA DE CONTROL  
VIROLÓGICO EN PACIENTES VIH  
CONTROLADORES DE ÉLITE (CE)

---

Miriam Beloso Santiago

Trabajo de fin de grado

Tutora URV: María del Carmen Portillo

Tutores Prácticas: Francesc Vidal Marsal  
y Esther Rodríguez Gallego

Tarragona, 18-06-2018

# Agradecimientos

En primer lugar me gustaría agradecer a mis padres su apoyo incondicional, sin su esfuerzo no podría haber llegado hasta aquí .

También al resto de mi familia, a mi hermana y abuelos por todo su apoyo y cariño.

A Ale por estar siempre ahí en lo bueno y en lo malo a pesar de la distancia.

A mis amigos y compañeros de la universidad con los que he compartido innumerables experiencias en estos cuatro años.

A todas las personas que he conocido durante mi estancia con el grupo de investigación, por ser tan cordiales y hacerme sentir una más.

A Vero por su simpatía y por su buen humor que tanto me ha alegrado el día a día.

A Anna por sus sabios consejos, por interesarse por mí y por estar dispuesta siempre a ayudarme. Sigo sin poder creer la gran coincidencia de que tengamos prácticamente la misma dirección.

A Esther a la que no puedo expresar con palabras todo mi agradecimiento. Sin toda su ayuda este trabajo no hubiera sido posible. Le agradezco mucho su confianza en mí en todo momento y haber sacado tiempo para ayudarme, a pesar de que tenía mucho más trabajo por hacer. También por ser tan amable y atenta conmigo, siempre teniendo buenas palabras y preocupándose porque estuviese a gusto. Creo que voy a echar de menos sentarme en su mesa y robarle el espacio vital, los días de “pomidita” y las batallas épicas contra R. Le deseo lo mejor y siempre que quiera tiene garantizada empanada gratis.

# Índice

|   |    |
|---|----|
| Datos del centro .....                            | 1  |
| Resumen .....                                     | 2  |
| Introducción.....                                 | 3  |
| Virus de la inmunodeficiencia humana .....        | 3  |
| Control espontáneo de la infección.....           | 9  |
| Metabolómica y VIH .....                          | 13 |
| Hipótesis y objetivos .....                       | 15 |
| Materiales y métodos .....                        | 16 |
| Diseño de estudio .....                           | 16 |
| Recogida de muestras y de datos clínicos .....    | 17 |
| Análisis metabolómico por GC-(EI)qTOF/MS .....    | 17 |
| Análisis estadístico .....                        | 19 |
| Resultados.....                                   | 22 |
| Características de los pacientes estudiados ..... | 22 |
| Metabolómica.....                                 | 23 |
| Discusión .....                                   | 28 |
| Conclusiones .....                                | 31 |
| Autoevaluación .....                              | 32 |
| Bibliografía .....                                | 33 |
| Anexos .....                                      | 38 |

## Datos del centro

El Grupo de investigación Infección e Inmunidad (INIM), liderado por el Prof. Francesc Vidal Marsal, está formado por personal cualificado en investigación clínica y básica del Servicio de Medicina Interna (Enfermedades infecciosas y Unidad de VIH/SIDA) del Hospital Universitario de Tarragona Joan XXIII y de la Universidad Rovira i Virgili. Es un grupo consolidado y financiado por la Generalitat de Catalunya desde 2009 y uno de los grupos de investigación líderes de la Red de Investigación en Sida (RETICS-RIS) patrocinada por el Instituto de Salud Carlos III. El laboratorio de investigación está situado en el Edificio Modular de Docència i Recerca del Hospital Universitario Joan XXIII de Tarragona. Sus principales objetivos son la investigación básica, traslacional, clínica y epidemiológica en relación al VIH y las infecciones nosocomiales. Las principales líneas de investigación del grupo son:

- **Inmunogenética e inmunopatogenia de la infección por 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 del huésped que modulan la respuesta virológica e inmunológica al tratamiento antirretroviral. Mecanismos de toxicidad.
- **Innovación del tratamiento antirretroviral:** Estudio de resistencias, optimización, simplificación del tratamiento y nuevas estrategias terapéuticas.
- **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.
- **Enfermedades infecciosas.** Estudio de las bacteriemias, endocarditis infecciosa, espondilodiscitis e infección nosocomial.

## Resumen

Dentro de los pacientes infectados por VIH, existe un grupo de individuos, denominado controladores de élite (CE), que se caracterizan por controlar espontáneamente la carga viral en ausencia de tratamiento antirretroviral. Sin embargo, aproximadamente un 30% de ellos acaba perdiendo esta capacidad. Las vías mecanísticas implicadas en este fenómeno se desconocen. De hecho, aún no se ha realizado ningún estudio metabolómico en los CE, que permita identificar las rutas metabólicas involucradas en dicha pérdida del control virológico. Por lo que el objetivo de este trabajo fue estudiar la existencia de un perfil metabolómico que preceda a esta pérdida, para poder identificar las vías mecanísticas involucradas y descubrir potenciales marcadores biológicos predictivos. Para ello se llevó a cabo un estudio metabolómico dirigido y no dirigido en muestras de plasma de pacientes CE. Se seleccionaron un total de 16 pacientes, ocho habían perdido espontáneamente el control virológico, denominados controladores transitorios (CT). Se analizaron las muestras de los pacientes CT en el periodo previo y posterior a la pérdida. Como grupo control, se seleccionaron 8 pacientes CE que mantuvieron el control virológico durante el mismo período de seguimiento, los controladores persistentes (CP). En CP, se realizaron hasta dos determinaciones en intervalos de un año. Los resultados obtenidos demostraron que 13 metabolitos eran diferentes significativamente entre los grupos CT y CP en el periodo pre-pérdida de control. Entre ellos, la valina fue considerada como un potencial marcador biológico predictivo de la pérdida del control virológico. No obstante, no se observaron apenas cambios significativos en el metaboloma de los CT a lo largo del tiempo de seguimiento. En conclusión, en este trabajo se logró determinar un perfil metabolómico previo a la pérdida de control asociado con una activación del sistema inmunológico, daño oxidativo y una disfunción mitocondrial para la obtención de energía. Conocer las alteraciones del metaboloma de los CE asociadas a la pérdida de control puede ser muy relevante para predecir su progresión virológica y para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra el VIH.

### **PALABRAS CLAVE**

Controladores de élite, marcadores biológicos, metabolómica, pérdida de control virológico, VIH.

# Introducción

## 1. Virus de la inmunodeficiencia humana

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es un lentivirus perteneciente a la familia *Retroviridae*. Esta familia se caracteriza por tener un genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva y replicarse a través de transcripción inversa. En base a las características de su genoma y antígenos virales, el VIH se puede clasificar en dos tipos: VIH-1 y VIH-2. El VIH-1 es el más frecuente y es el causante de la infección por VIH a nivel mundial, mientras que el VIH-2 es menos virulento y transmisible y se localiza principalmente en la región de África Occidental [1,2].

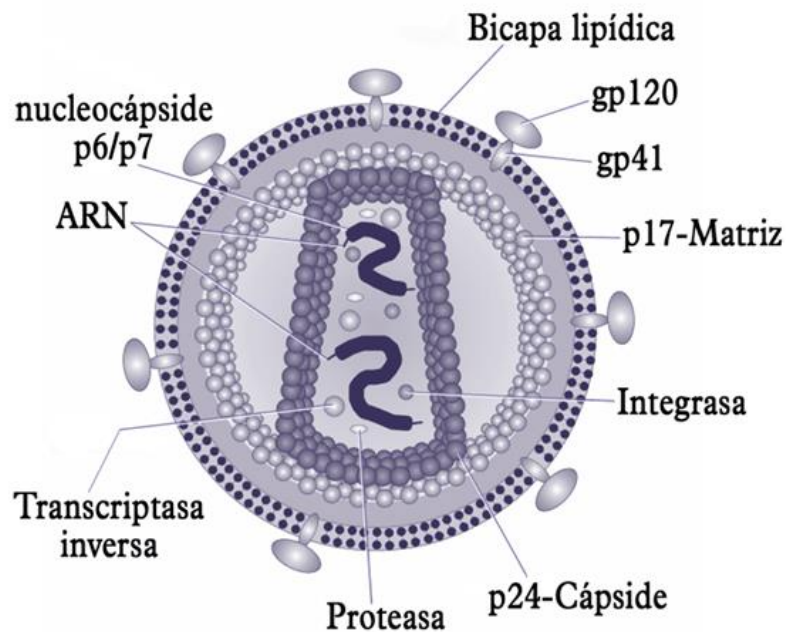
El VIH se aisló por primera vez en 1983, por los grupos de Luc Montagnier y Robert Gallo, como agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) [2,3]. El SIDA es el estadio más avanzado de la infección por VIH que se alcanza cuando la disminución de las células T CD4<sup>+</sup> llega a niveles críticos, por lo que el huésped pierde su capacidad inmunológica y es más susceptible a desarrollar infecciones oportunistas [4].

El VIH se puede transmitir por contacto de fluidos corporales infectados (sangre, flujo vaginal, semen y leche materna) con las mucosas o heridas. La infección tiene como diana las células del sistema inmune que expresen en su superficie el receptor CD4, especialmente los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, el virus los infecta y los destruye, provocando un grave deterioro del sistema inmunológico [4].

### Estructura y genoma

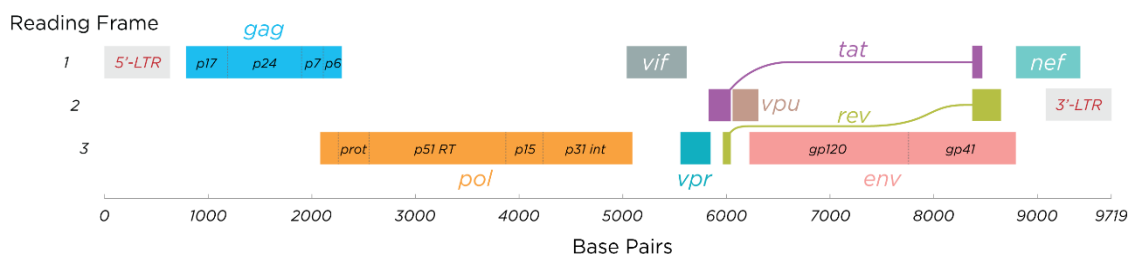
El virión del VIH (Figura 1) tiene una estructura esférica de 100-120 nm de diámetro y está constituido por una envoltura que consiste en una bicapa lipídica en la que se encuentran insertadas las glicoproteínas gp120 y gp41, encargadas de la unión y entrada del virus en la célula huésped. Bajo esta membrana lipídica se encuentra una matriz formada por la proteína p17. En el centro de la partícula vírica se localiza la cápside, una estructura cónica constituida por la polimerización de la proteína p24. La cápside envuelve la nucleocápside, un complejo núcleo-proteico formado por dos moléculas idénticas de ARN de cadena simple, las proteínas p6 y p7 y algunas enzimas

como la transcriptasa inversa, proteasa e integrasa necesarias para la replicación del virus [2,5].



**Figura 1:** Representación de la estructura vírica del VIH [7]

El genoma del VIH (Figura 2) almacenado en forma de ARN está compuesto por las secuencias LTR (long terminal repeat) situadas en los extremos y 9 genes [5]. Tres de los cuales son los genes estructurales gag, pol y env. El gen gag codifica una poliproteína precursora, p55, que por acción de la proteasa viral se separa en proteínas estructurales: como la p17 de la matriz, la p24 que forma parte de la cápside y las proteínas p7 y p6 de la nucleocápside [6].



**Figura 2:** Organización del genoma del VIH [8]

El gen pol codifica las enzimas proteasa, transcriptasa inversa, integrasa y ARNasa (p15) [1,2]. Adyacente al gen pol se encuentra env que codifica para las dos glicoproteínas de la envoltura lipídica: gp120 que se encuentra en la superficie y gp41 integrada en la membrana [1].

Además de estos tres genes, existen otros seis no estructurales vif, vpu, vpr, tat, rev y nef asociados a la regulación de la replicación y de la infectividad del virus [5].

### **Ciclo biológico del VIH**

El ciclo de vida del VIH-1 puede dividirse en dos fases: 1) la fase temprana que comienza con la unión del virión a la superficie celular de la célula huésped y finaliza con la integración del material genético viral en el genoma celular y 2) la fase tardía que comprende el proceso de transcripción del genoma viral, la síntesis de proteínas víricas, el ensamblaje y la liberación de los nuevos viriones infecciosos [9].

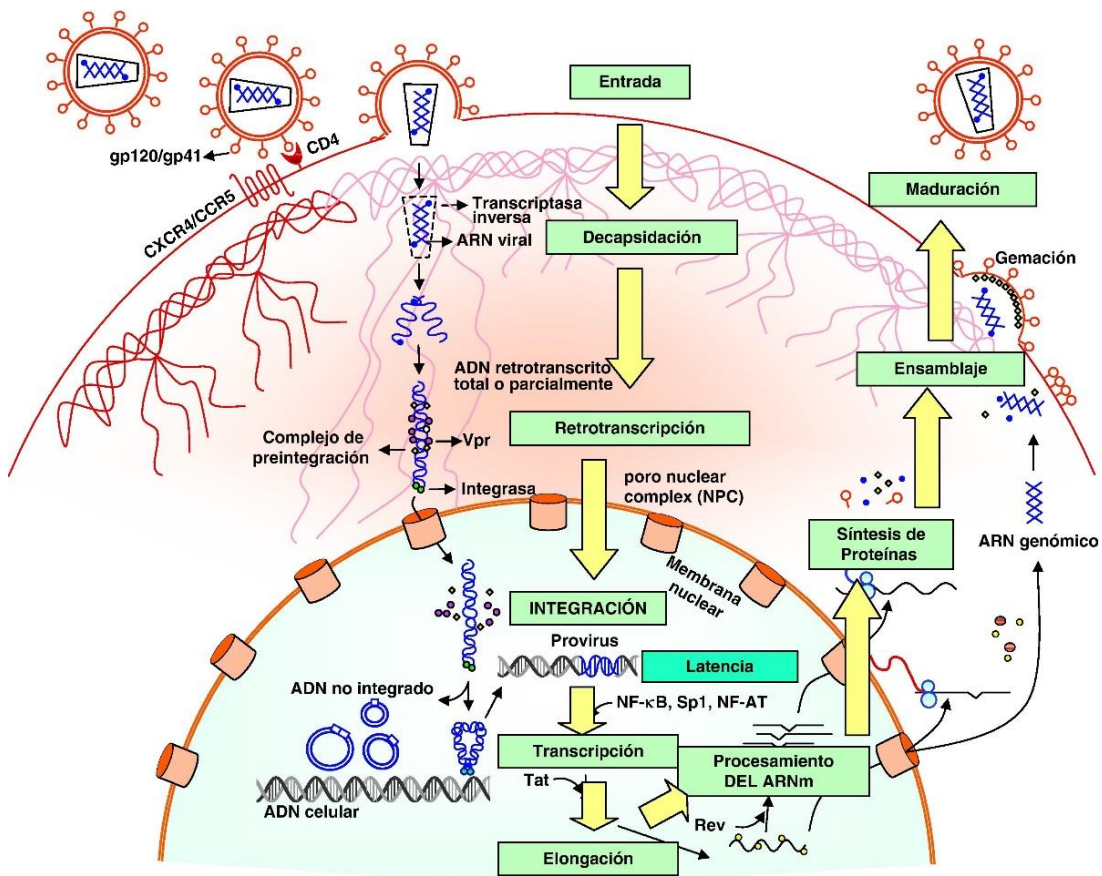
El ciclo vital del VIH además, puede subdividirse en 7 etapas: 1) unión y fusión, 2) transcripción inversa, 3) integración, 4) replicación, 5) ensamblaje, 6) gemación y 7) maduración (Figura 3).

La primera etapa se basa en el reconocimiento y unión entre las proteínas de la envoltura del virus, gp120 y gp41, y el receptor celular CD4 presente en las células del huésped, principalmente linfocitos T CD4<sup>+</sup>, pero también macrófagos y células dendríticas; así como la unión a correceptores celulares como el receptor de quimiocinas CCR5 o el receptor de quimiocinas CXCR4, también presentes en las células dianas, que son responsables de estabilizar la unión entre la partícula viral y la célula huésped [1]. De hecho, según el correceptor utilizado el VIH se puede clasificar como R5 con tropismo por el correceptor CCR5 o como X4 cuando el virus se une preferentemente a células que presentan el correceptor CXCR4. En la mayoría de los casos, son las cepas R5 las que inician la infección y en fases más avanzadas se detectan cepas con afinidad al CXCR4. También existen cepas virales con tropismo dual que pueden utilizar ambos correceptores [2].

En esta primera etapa, la primera interacción se produce entre la glicoproteína gp120 y el receptor CD4, lo que induce cambios conformacionales en la envoltura del virus que permiten la unión entre gp120 con uno de los correceptores mencionados

anteriormente. Esta doble unión de gp120 induce la exposición del péptido de fusión de la región N-terminal de gp41, responsable de la aproximación de la membrana viral con la celular, permitiendo la fusión de las dos membranas y, consecuentemente, la internalización del virión en la célula huésped [9,10].

Una vez internalizada la cápside vírica en el citoplasma se produce la decapsidación del genoma vírico, es decir, el desensamblaje de las proteínas de la cápside para liberar el genoma y las enzimas víricas en el interior celular [10].



**Figura 3:** Ciclo biológico del VIH [10]

A partir del ARN viral se sintetiza ADN de doble cadena mediante el proceso de transcripción inversa, llevado a cabo por la enzima transcriptasa inversa propia del virus. El ADN sintetizado se une a una serie de factores celulares y virales, como vpr, formando el complejo de preintegración. Este complejo es transportado al núcleo para integrarse en el genoma celular, debido a la acción de la enzima viral integrasa, constituyendo la forma proviral del VIH [10,11]. Este provirus puede permanecer inactivo durante varios años. [9,10].

La transcripción del provirus se inicia cuando la célula huésped se activa gracias a factores celulares, como NF- $\kappa$ B, que promueven la transcripción. Para que la transcripción del genoma viral sea eficiente se necesita la intervención de la proteína viral Tat, que permite la síntesis completa del ARN viral. Mediante la proteína viral Rev los transcritos sintetizados son transportados al citoplasma, donde son traducidos a proteínas virales [11], las cuales se unen a las copias de ARN vírico, formándose de este modo los nuevos viriones. Éstos son liberados de la célula durante el proceso de gemación, llevándose consigo parte de la membrana celular que pasa a constituir su envoltura lipídica. Después de ser liberado el virión necesita madurar para ser infeccioso, para ello la proteasa viral convierte los precursores de las poliproteínas Gag y Gag-Pol en proteínas enzimáticas y estructurales que se reorganizan formando un virus funcional [9].

### Progreso clínico de la infección

La infección por el VIH progresa en diversas etapas que se pueden identificar por una serie de síntomas e indicadores clínicos: la fase aguda seguida de una fase crónica o de latencia clínica y finalmente la etapa crítica o SIDA (Figura 4).

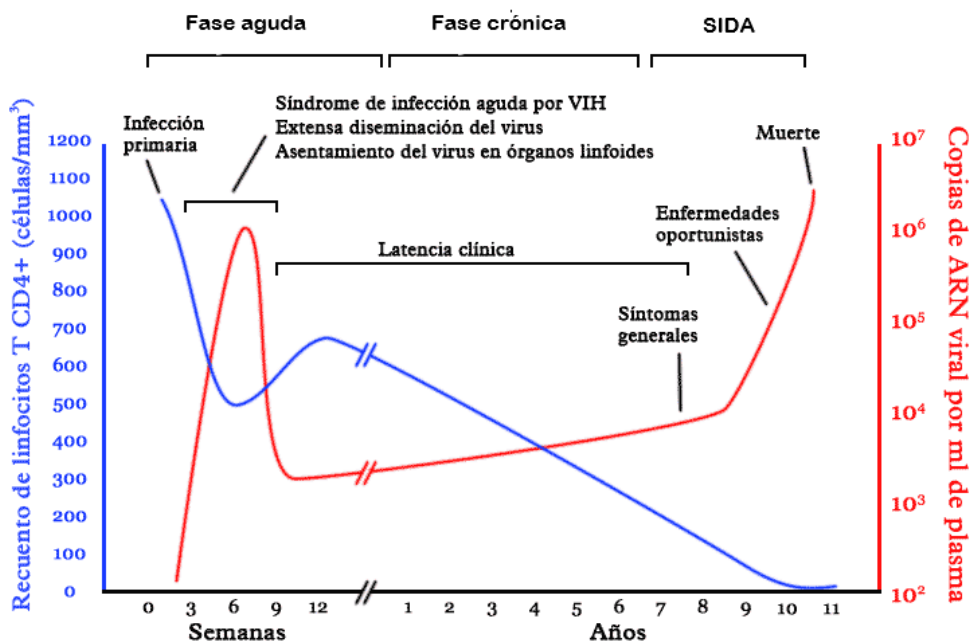


Figura 4: Historia natural de la infección por VIH [12]

La fase aguda de la infección por VIH se inicia en el momento de la entrada del virus en las células huésped. A los 4 o 5 días después de la infección, el virus se reproduce y disemina por todo el cuerpo hacia los órganos linfoides, al reclutar posiblemente linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados [13].

A partir de los 6-10 días hay un gran aumento de los linfocitos CD4<sup>+</sup> infectados y de la carga viral pero ésta irá disminuyendo a lo largo de las semanas, hasta alcanzar un punto de equilibrio con una carga viral estable (set-point), debido a la generación de una respuesta inmune contra el virus. Esta respuesta inmune es tanto de tipo celular como humoral aunque se debe especialmente a la actividad celular citotóxica de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Todo ello a su vez conlleva un aumento de las células T CD4<sup>+</sup>, aunque hasta niveles inferiores a los presentes antes de la infección [13,14]. En esta fase de infección aguda con una duración aproximada de 4 a 12 semanas, el paciente puede no presentar síntomas o tener un cuadro clínico similar al de la mononucleosis infecciosa o la gripe, con manifestaciones como fiebre, sudoración, erupción cutánea, cefalea y diarrea [13,15].

La siguiente fase es la de infección crónica en la que la carga viral es baja pero, a pesar de ello, el virus sigue replicándose durante esta etapa induciendo una hiperactivación crónica del sistema inmunológico [13]. Aunque esta etapa suele ser asintomática, algunos pacientes pueden presentar adenopatías o una disminución significativa del número de plaquetas [15].

Ante la replicación viral constante y la destrucción de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, el sistema inmune acaba desgastándose, perdiendo progresivamente su capacidad de recuperación y respuesta contra el virus. Una vez el recuento de linfocitos ha disminuido por debajo de un umbral de 200 células/ $\mu$ l, comienzan a desarrollarse infecciones o neoplasias oportunistas que llevan a la última fase de la infección y la más grave, el SIDA. [13,15].

En ausencia de tratamiento antirretroviral la mayoría de los pacientes tienen una supervivencia menor de 3 años [16]. Sin embargo, con la introducción de la terapia antirretroviral combinada de gran actividad la historia natural de la infección se ha modificado de forma espectacular ya que el tratamiento consigue suprimir la

replicación viral, aumentando el recuento de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y, en consecuencia, mejorando la función del sistema inmunitario [17].

De todas formas, cabe señalar que la progresión de la infección es muy variable según el paciente, por ello, los individuos infectados por el VIH se pueden clasificar en diferentes grupos según sea su progresión clínica. En este sentido, existe un subgrupo de individuos infectados que son capaces de mantener espontáneamente el control de la replicación viral en ausencia de tratamiento. Estos pacientes son los conocidos como controladores o no progresores [13,18].

## **2. Control espontáneo de la infección por el VIH**

Como se ha comentado anteriormente, en ausencia de tratamiento antirretroviral la gran mayoría de pacientes infectados por el VIH tienen una progresión clínica caracterizada por una viremia incontrolada y un desgaste progresivo del sistema inmunológico, que acaba conduciendo al SIDA [19]. Sin embargo, existe un subgrupo minoritario de pacientes infectados por el virus que son capaces de controlar la infección sin necesitar recibir tratamiento antirretroviral, los denominados controladores o no progresores [19,20]. Dentro de este subgrupo de pacientes existen, a su vez, diferentes fenotipos según la progresión clínica y/o niveles de carga viral. Estos fenotipos de controladores han sido objeto de numerosas investigaciones pero su definición puede variar según el estudio consultado [18]. Esta gran heterogeneidad en las definiciones utilizadas puede dificultar la interpretación de los resultados y, en consecuencia, complicar la identificación de los mecanismos biológicos responsables del control virológico específicos de cada grupo [18,21]. Por ello, aún existe la necesidad de estandarizar estas definiciones para, de ese modo, facilitar la comprensión de los resultados de la literatura existente y mejorar el diseño de estudio de futuras investigaciones sobre las bases moleculares del control de la infección [18].

Una revisión sistemática de las definiciones de los fenotipos del control del VIH estableció que entre los definidos por sus características clínicas e inmunológicas, los más frecuentes eran los denominados no progresores a largo plazo, en inglés, *long term non-progressors* (LTNP) [18]. Este grupo de individuos permanecen asintomáticos

durante un prolongado periodo de tiempo en ausencia de tratamiento y con un alto recuento de células CD4<sup>+</sup> [22, 23].

En cuanto a los fenotipos establecidos según criterios virológicos, los mejores definidos son los controladores virémicos (CV) y los controladores de élite (CE) [18]. Los controladores virémicos son un grupo caracterizado por mantener cargas virales entre 50-2000 copias RNA de HIV/ ml [18,21]. En cambio, los controladores de élite (CE) se suelen definir como un grupo de pacientes que mantienen cargas virales a niveles indetectables (<50 copias ARN del VIH / ml), durante un tiempo prolongado (de 6 meses a 16 años) y en ausencia de tratamiento antirretroviral [18]. Este grupo es el que menor viremia presenta entre los controladores o no progresores, por lo tanto la mayoría de estudios recientes se han centrado en este conjunto de individuos [23].

Los controladores de élite representan menos del 1% de los pacientes infectados por VIH [24, 25] y, como se ha comentado, se definen por su control virológico espontáneo pero también por el mantenimiento de un nivel elevado de linfocitos CD4<sup>+</sup> y una probabilidad más baja de progresión clínica hacia el SIDA [24,26].

Debido a su capacidad de control espontáneo de la infección, a límites tan bajos, los CE se han propuesto como un modelo para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para el VIH como el desarrollo de vacunas o una cura funcional que consistiría en inducir que el sistema inmunitario de un paciente infectado por el VIH controle persistentemente la replicación viral sin necesidad de fármacos [27,28].

### **Mecanismos de control del VIH-1 en controladores élite**

Actualmente, los mecanismos responsables del control viral en los controladores de élite no se conocen con exactitud pero diversos estudios apuntan a que podría tener una causa multifactorial [28]. Estos factores pueden ser propios del virus como la delección de genes reguladores o también propios del huésped como su genética o su capacidad de respuesta inmunológica [23,29].

Algunos estudios sugieren que cepas atenuadas de virus VIH podrían contribuir al control viral, pues en pacientes controladores de élite se han aislado virus defectuosos con delecciones del gen nef, mutaciones en el gen vif o en las regiones LTR y ciertos

polimorfismos en las regiones hipervariables de gag y nef [8,22]. Sin embargo, otros estudios demuestran que los factores del huésped desempeñan un papel más importante en el control de la replicación del VIH ya que, por ejemplo, se han aislado cepas de virus replicativos competentes en un número considerable de controladores de élite [22,30]. Además, varios estudios de secuenciación no encontraron alteraciones genéticas en virus procedentes de controladores de élite, por lo que probablemente, los factores virales representan la minoría de los casos de control del VIH [29].

Entre estos factores del huésped, muchos estudios asocian la presencia de ciertos determinantes genéticos con el control de la infección. Por ejemplo, se ha demostrado que los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) ubicados en los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA), constituyen el principal factor genético asociado con el control inmunológico del VIH-1. Concretamente, en este grupo de pacientes controladores existe una alta presencia de los alelos protectores HLA clase I como HLA-B\*57, HLA-B\*27, HLA-B\*13 y HLA-B\*58:01 [30,31]. Estos alelos se asocian con la protección contra la pérdida de células T CD4<sup>+</sup> en pacientes VIH+ debido a que son responsables del aumento de la respuesta antiviral específica de los linfocitos CD8<sup>+</sup>, mejorando funciones tales como mayor avidéz funcional, mayor capacidad de proliferación y una mayor producción de citocinas [32]. En otras palabras, aumentan la inmunidad adaptativa, generalmente descrita como una respuesta fuerte y efectiva de las células T contra el VIH. En concreto, se ha descrito que en los controladores de élite, hay una gran presencia de células T CD8<sup>+</sup> dirigidas a la proteína viral Gag y que sintetizan una mayor cantidad de gránulos citotóxicos, pudiendo inducir la apoptosis en las células infectadas [29]. Además de esta mayor actividad citotóxica, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de los controladores de élite se caracterizan por tener una gran proliferación y ser polifuncionales, es decir tienen la capacidad de ejecutar simultáneamente múltiples funciones efectoras [33].

Otros genes de importancia son los genes de los receptores de quimiocinas, los que, como se ha comentado previamente, actúan como correceptores del receptor CD4. Por ejemplo, el correceptor CCR5 que presenta un alelo llamado CCR5 delta 32 ( $\Delta$ 32) con una delección de 32 pares de bases que provoca que el receptor no sea funcional (no

puede alcanzar la superficie) y, por lo tanto, impide la entrada del virus al interior de la célula huésped [8]. También se han observado mecanismos epigenéticos específicos asociados al control del VIH, como la metilación del promotor del virus y la fosforilación de factores de transcripción [29].

Aunque que el sistema inmunitario innato tiene menor relevancia que el adaptativo en el control virológico, los controladores de élite presentan ciertas peculiaridades en sus mecanismos de defensa innatos. Por ejemplo, se ha observado que sus células dendríticas tienen una capacidad de presentación de antígeno mejorada en comparación con los progresores [25].

### **Pérdida espontánea del control de la replicación viral en los controladores élite**

A diferencia de lo que se creía inicialmente, estudios recientes demuestran que entre los controladores de élite existe heterogeneidad en cuanto a la progresión clínica de la infección. Varios estudios han descrito que aproximadamente el 30% de pacientes controladores de élite, pierden espontáneamente la capacidad de controlar la replicación viral. Este subgrupo de pacientes, inicialmente catalogados como controladores de élite, son los denominados controladores transitorios (CT) [21,33]. Los pacientes con una corta duración de seguimiento, una carga viral más elevada, niveles más bajos de CD4<sup>+</sup> y/o coinfectados por el virus de la hepatitis C, presentan globalmente una mayor riesgo de progresión virológica [21].

Actualmente ya existen evidencias sobre algunos factores asociados a esta pérdida espontánea del control de la replicación viral: un bajo índice de respuesta Gag-específica, menor polifuncionalidad en las células T y una alta diversidad viral [33]. Además, un estudio reciente del grupo de investigación en vías de publicación, propone un perfil proteómico asociado a la pérdida de control caracterizado por una desregulación de ciertas proteínas relacionadas con la inflamación, migración transendotelial y coagulación.

Sin embargo, aún son necesarios más estudios para conocer en profundidad los mecanismos implicados en la pérdida del control de la replicación viral, que permitan la identificación de potenciales marcadores biológicos para distinguir los controladores

persistentes de los controladores transitorios y que, a su vez, puedan convertirse en posibles dianas terapéuticas contra el VIH.

### **3. Metabolómica y VIH**

El análisis metabolómico permite la evaluación de una amplia gama de metabolitos en muestras biológicas (plasma, suero, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, semen, entre otros) mediante diferentes técnicas analíticas como la resonancia magnética nuclear (RMN), la espectrometría de masas (EM) acoplada a cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) o a cromatografía de gases (CG) e etc... [34].

Los datos obtenidos a partir de estas técnicas son útiles para evaluar las alteraciones de las vías metabólicas. Por ello, estas aproximaciones están consideradas como un método poderoso para la identificación de patrones relacionados con las enfermedades, así como para el descubrimiento de marcadores biológicos que pueden utilizarse para el diagnóstico, pronóstico y el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas [35,36].

En el caso del VIH, se han llevado a cabo numerosos estudios en los que se ha caracterizado el perfil metabolómico de ciertos biofluidos en pacientes infectados, utilizando técnicas metabolómicas que han demostrado la capacidad de detectar metabolitos alterados por la infección viral y/o a causa del tratamiento antirretroviral [37,38].

Por ejemplo, estudios propios del grupo demuestran que pacientes infectados por el VIH con un perfil metabólico caracterizado por altos niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) de gran tamaño, lipoproteínas de baja densidad de gran tamaño y mayor concentración de colesterol HDL tenían una mejor recuperación inmunológica después del tratamiento [39].

También han demostrado que los niveles de lactato y triglicéridos de lipoproteínas de baja densidad (LDL-TG), podrían considerarse marcadores predictivos para la dislipidemia ocasionada por la infección del VIH y el tratamiento antirretroviral [40]. Por último, en pacientes VIH+ también existen evidencias de alteraciones significativas

en rutas metabólicas tales como la glucólisis, el ciclo de Krebs, el metabolismo de los lípidos y el catabolismo de los ácidos grasos [41].

En cuanto a los controladores de élite, un estudio demostró que existen alteraciones en el metabolismo de la hidroxilación y carboxilación de la acilcarnitina, así como al catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada, lisina, ácidos orgánicos y triptófano, lo que sugería que los controladores de élite tenían una deficiencia múltiple de acil CoA-deshidrogenasa (MADD) [42].

Sin embargo, aún no se ha realizado ninguna aproximación metabolómica para saber si existe un perfil metabolómico asociado a la pérdida de control de la replicación viral, en pacientes inicialmente catalogados como controladores de élite, que permita identificar las rutas metabólicas involucradas y posibles marcadores biológicos que predigan la pérdida de dicha capacidad. Cabe destacar que conocer los mecanismos implicados en el fenómeno del controlador o, por el contrario, los asociados a la pérdida de esa capacidad puede ser muy relevante para la identificación de los determinantes virológicos y del huésped involucrado en estos fenómenos y, que pueda ayudar en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra la infección por el VIH.

## Hipótesis y objetivos

Dada la capacidad característica de los pacientes controladores de élite, controlar la replicación viral sin recibir tratamiento antirretroviral, este grupo se ha propuesto como modelo para el desarrollo de una cura funcional, de estrategias de erradicación y de una posible vacuna contra el VIH. Sin embargo, recientemente, se ha descubierto que un porcentaje de estos individuos pierden la capacidad de mantener esta extraordinaria capacidad.

Tanto los mecanismos asociados al control espontáneo de la replicación viral como los asociados a la pérdida de dicha capacidad siguen sin conocerse con exactitud. En ese sentido, los recientes avances en tecnologías de alto rendimiento han permitido que las aproximaciones “ómicas”, como por ejemplo la metabolómica, se conviertan en una herramienta fundamental para alcanzar una comprensión más profunda de las enfermedades. Hasta la fecha existen diferentes estudios metabolómicos realizados en pacientes VIH+, centrados principalmente en la respuesta al tratamiento antirretroviral pero todavía no se ha llevado a cabo ningún estudio que caracterice los trastornos metabólicos asociados con la pérdida del control virológico en pacientes controladores de élite. Por ello, la hipótesis del presente trabajo está basada en la existencia de un perfil metabolómico plasmático característico de los pacientes que pierden el control de la replicación viral, que conllevaría el descubrimiento de las vías mecánicas involucradas en dicha pérdida, la identificación de potenciales marcadores biológicos predictivos, así como poder establecer nuevas dianas terapéuticas.

Para ello se llevó a cabo un análisis metabolómico en el plasma de pacientes controladores de élite con el fin de alcanzar los siguientes objetivos:

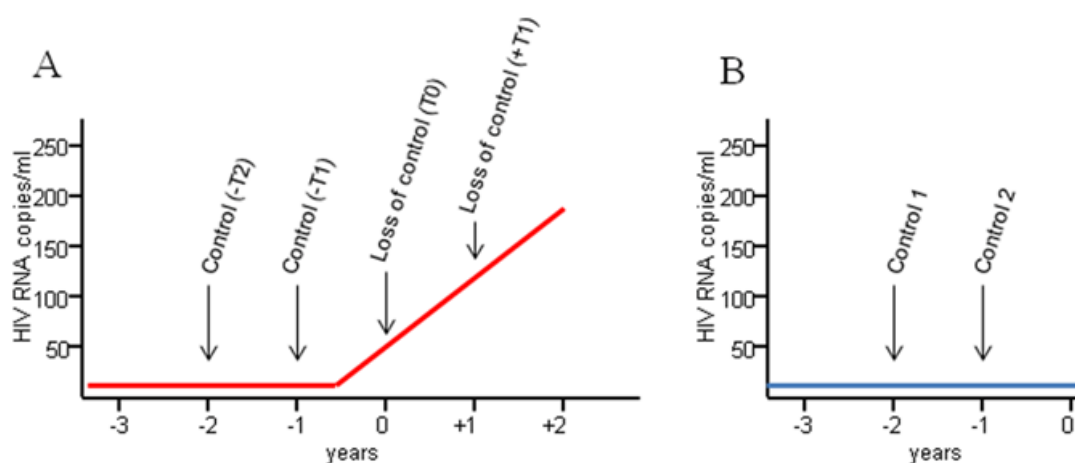
- Averiguar si existe un perfil metabolómico que preceda la pérdida de control virológico.
- Identificar potenciales marcadores biológicos predictivos de la pérdida de control de la replicación viral.
- Comprobar el efecto de la progresión de la infección en el metaboloma de los pacientes controladores transitorios.

# Materiales y métodos

## 1. Diseño de estudio

Se seleccionaron, según la disponibilidad de las muestras de plasma, un total de 16 pacientes controladores de élite (CE), definidos por tener una carga vírica inferior al límite de detección (<50 copias de ARN de VIH-1/ml) sin recibir tratamiento antirretroviral durante al menos un año.

De los 16 pacientes CE seleccionados, ocho de ellos experimentaron una pérdida espontánea del control virológico, y por ello fueron categorizados como controladores transitorios (CT). El resto de pacientes mantuvo permanentemente el control virológico durante todo el período de seguimiento, se los denominó controladores persistentes (CP) y fueron considerados como grupo control. En el grupo CT se llegaron a evaluar hasta cuatro determinaciones: uno y dos años antes de la pérdida del control virológico (-T1 y -T2), conocido como "período previo a la pérdida de control", y dos determinaciones más durante el "período posterior a la pérdida de control", entre las que se incluye el intervalo más cercano a la pérdida de control (T0) y el año posterior a la pérdida de control virológico (+T1). En el estudio sólo se incluyeron los pacientes del grupo CT que tuviesen como mínimo determinaciones en -T2,-T1 y T0. En CP, se realizaron hasta dos determinaciones en intervalos de un año (Figura 5).



**Figura 5:** Diseño de estudio. A) Controladores transitorios (CT) B) Controladores persistentes (CP)

## **2. Recogida de muestras y de datos clínicos y demográficos**

Las muestras de sangre de todos los pacientes fueron extraídas en ayuno y recogidas en tubos con EDTA. Para la obtención del plasma sanguíneo, los tubos se centrifugaron durante 15 minutos a 4 °C y 1500 g inmediatamente después de su recolección. Las muestras de plasma obtenidas fueron almacenadas a -80°C hasta su análisis. Todas las muestras fueron recibidas, tratadas y almacenadas en el BioBank VIH HGM, perteneciente a la Red Española de Investigación en SIDA (RIS) y los datos fueron registrados en una base de datos especialmente diseñada para la cohorte de controladores de élite (ECRIS) de la RIS. Todos los participantes en el estudio dieron su consentimiento informado y los protocolos fueron aprobados por los comités éticos institucionales pertinentes.

La obtención de datos clínicos y demográficos de los pacientes fue realizada por el servicio de enfermedades infecciosas del Hospital Universitario Virgen del Rocío, Instituto de Biomedicina de Sevilla. El procesamiento de muestras para el análisis metabolómico fue efectuado por el personal de laboratorio del grupo de investigación de Infección e Inmunidad (INIM) del Hospital Universitario Joan XXIII de Tarragona y el análisis de metabolómica se realizó en el Centro de Ciencias Ómicas (COS), localizado en el Centro de Tecnológico de Nutrición y Salud de Reus. Por último, el análisis estadístico en el que se centra el presente trabajo, también fue efectuado por el grupo de investigación INIM.

## **3. Análisis metabolómico por GC-(EI)qTOF/MS de las muestras**

La lista de todos los metabolitos analizados, tanto de manera dirigida como no dirigida, se encuentra en el Anexo 1.

### **Estándares**

Los estándares analíticos utilizados fueron: ácido pirúvico, ácido láctico, alanina, ácido 3-hidroxi-butírico, valina, leucina, isoleucina, ácido succínico-d4, ácido succínico, ácido fumárico, serina, ácido oxaloacético, ácido málico, ácido aspártico, ácido 2-hidroxi-glutámico, ácido alfa-cetoglutarico, fosfoenolpiruvato, ácido glutámico, gliceraldehído-3-fosfato, ácido aconítico, glicerol-1-fosfato, glutamina, ácido 3-

fosfoglicérico, ácido mirístico-d27, ácido cítrico / isocítrico, glucosa, ribosa-5-fosfato, Fructosa-6-fosfato, Glucosa-6-fosfato, Fructosa-1,6-bifosfato, Ácido 6-Fosfogluónico de Sigma-Aldrich (Madrid, Spain).

Los estándares internos utilizados fueron L-metionina- (carboxi- $^{13}\text{C}$ , metil-d3), ácido succínico-d4 98% átomo D y ácido mirístico-d27 98% átomo D, L- de Sigma-Aldrich, y glicerol  $^{13}\text{C}_3$  99% átomo  $^{13}\text{C}$  y D-glucosa  $^{13}\text{C}_6$  99% de átomo  $^{13}\text{C}$  de Cortecnet (Voisins-le-Bretonneux, Francia).

### **Preparación de la muestra**

Se mezclaron 500  $\mu\text{l}$  de metanol/agua 8:1 (v/v) con 100  $\mu\text{l}$  de plasma, previamente deshelados y vorteados. Después las muestras se incubaron a 4  $^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos para la precipitación de proteína y posteriormente se centrifugaron a 15000 rpm durante 15 min. 400  $\mu\text{l}$  del sobrenadante se mezclaron con 25  $\mu\text{l}$  de la mezcla de patrones internos con una concentración de 50 mg/l. Posteriormente se llevó a cabo el secado de la muestra por evaporación bajo una corriente de  $\text{N}_2$  y se liofilizó en un liofilizador Benchtop K (VirTis).

La derivatización de compuestos se realizó mediante la adición de 25  $\mu\text{l}$  de hidrocloreuro de metoxiamina 40 mg/ml en piridina incubándolo durante 1,5 horas a 37  $^{\circ}\text{C}$ , y la adición de 25  $\mu\text{l}$  de MSTFA + TMCS al 1% e incubándolo durante 1 hora a temperatura ambiente.

Las muestras se analizaron en un Cromatógrafo de gases acoplado a un espectrofotómetro de masas de cuadrupolo-tiempo de vuelo 7200 GC-QTOF de Agilent Technologies (Sta. Clara, CA, EE. UU.).

### **Análisis GC-qTOF**

Se inyectó automáticamente un volumen de 1  $\mu\text{l}$  de muestra en un inyector con/sin fraccionamiento a una velocidad de división de 50:1 y a una temperatura de 250  $^{\circ}\text{C}$ . La columna cromatográfica utilizada fue una J & W Scientific HP5-MS (30 m x 0,25 mm id, película de 0,25  $\mu\text{m}$ ) (Agilent Technologies, Barcelona, España) y se usó helio (99,999% de pureza) como gas portador, con un caudal de 1,1 ml min en flujo constante. El programa del horno se ajustó a una temperatura inicial de 60  $^{\circ}\text{C}$  durante 1 minuto,

se aumentó a 325 °C, con una velocidad de 10 °C/min y una vez alcanzada, esta temperatura se mantuvo durante 10 minutos. El tiempo total de ejecución fue de 37.5 minutos.

La ionización se realizó por impacto electrónico (EI), con una energía de electrones de 70 eV y una temperatura de fuente de 250 °C. Después de un tiempo de *solvent delay* de 5 minutos, el analizador de masas funcionó en modo *Full Scan*, registrando datos en un rango de masa/carga entre 35 y 700 m/z y a una velocidad de exploración de 5 especies por segundo.

### **Validación de métodos y cuantificación de metabolitos**

La cuantificación absoluta de los metabolitos del ciclo de Krebs se realizó mediante calibración del patrón interno, usando el estándar analítico correspondiente para cada metabolito determinado y un patrón interno deuterado dependiendo de la familia del metabolito. Las curvas de calibración se obtuvieron representando la relación entre la abundancia (área pico) del analito/patrón interno y el ratio de concentración de analito/ patrón interno correspondiente.

### **Análisis metabolómico no dirigido**

Además, se realizó un enfoque no dirigido. Los cromatogramas obtenidos se deconvolucionaron mediante el software de Análisis Desconocido de Agilent, utilizando la biblioteca Fiehn RT para identificar los compuestos presentes en la muestra, mediante los espectros EI MS y la biblioteca de los tiempos de retención. Para estos compuestos, se utilizó su abundancia máxima (área pico) para la cuantificación relativa entre las muestras.

## **4. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó utilizando distintos programas estadísticos y de representación gráfica; SPSS (IBM Statistics, v.22), GraphPad Prism (GraphPad software Inc., v. 5.03) y el programa RStudio (Rstudio, Ink, v. 1.0.153). Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando p-valor < 0.05.

### **Análisis estadístico para determinar diferencias significativas entre los grupos CP y CT**

En primer lugar y antes de realizar la búsqueda de diferencias significativas, se efectuó un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) para comprobar si los metabolitos detectados permitían una buena separación entre los dos grupos de estudio.

Dado que el número de muestras era inferior a 30, se consideró que los datos no seguían una distribución normal por lo que se aplicaron pruebas estadísticas no paramétricas. En primer lugar, se analizaron las diferencias significativas entre CP y CT en el periodo previo a la pérdida de control.

Las variables cuantitativas se representaron como medianas y rango intercuartílico y fueron analizadas mediante la Prueba U de Mann-Whitney, el equivalente no paramétrico para muestras independientes a la prueba t de Student. Por otro lado, las variables cualitativas se representaron como porcentajes y las diferencias entre grupos fueron analizadas mediante la prueba de Prueba  $\chi^2$ .

Después se procedió a calcular el *Fold Change* de cada metabolito que es el valor (B/A) resultante de la división de la mediana de los controladores transitorios (B) entre la mediana de los controladores persistentes (A). Este valor expresa cuantas veces aumenta o disminuye un metabolito en los CT respecto a los PC. En los casos en que el *Fold Change* era menor que 1, se le daba la vuelta a la fracción quedando la fórmula como A/B y el cociente resultante se representaba en negativo. De esta manera se expresaba el ratio de disminución que había en los CT respecto al grupo control.

A partir de los *Fold Change* calculados se efectuó mapa de calor o *Heatmap*. Este tipo de representación gráfica nos permite visualizar las diferencias entre los dos grupos, ordenando los metabolitos conforme un rango de colores que varía en función del valor del *Fold Change*.

Se realizó también un análisis de agrupamiento jerárquico para estudiar el agrupamiento o clusterización entre los metabolitos detectados y cuantificados y también el agrupamiento entre pacientes. Además, a partir de los metabolitos significativos se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para saber si estos permitían separar ambos grupos con una alta precisión.

Por otro lado, con el objetivo de identificar potenciales marcadores biológicos, en primer lugar se realizó un análisis Random Forest, un algoritmo basado en la creación de árboles de decisión que clasifica las variables según su capacidad de clasificación [43]. Además, se crearon Curvas ROC (Característica Operativa del Receptor), una representación gráfica de la sensibilidad frente a la especificidad para un modelo clasificatorio binario, que permite estudiar la capacidad discriminatoria de los metabolitos seleccionados [44].

### **Análisis longitudinal en los pacientes CT**

Por último, se realizó un análisis longitudinal para averiguar si había un efecto del tiempo, en otras palabras, de la progresión de la enfermedad en el metabolismo de los controladores transitorios. Para ello se efectuó una prueba de los rangos con signo de Wilcoxon, una prueba no paramétrica para muestras dependientes o apareadas, entre los puntos previos y posteriores a la pérdida de control en el grupo CT.

Al igual que en el análisis de comparación entre los grupos CP y CT se procedió a calcular el *Fold Change* de cada metabolito (B/A). Sin embargo, en este caso el *Fold Change* era el valor resultante de la división de la mediana de la condición post-pérdida de control (B) entre la condición pre-pérdida de control (A). Para observar gráficamente las diferencias en los metabolitos en este estudio longitudinal los resultados también se representaron en gráficos de barras.

# Resultados

## 1. Características de los pacientes estudiados

Las características clínicas y demográficas de los pacientes estudiados se muestran en la Tabla 1. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de controladores transitorios y persistentes en cuanto a edad, sexo, ruta de transmisión del VIH, coinfección con el virus de la hepatitis C (HCV), número de células T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> ni en el ratio de CD4:CD8. Tampoco se apreciaron diferencias en la frecuencia de diferentes alelos HLA. La única diferencia destacable fue el tiempo de diagnóstico, los sujetos del grupo CT llevaban menos tiempo diagnosticados en comparación con los CP.

**Tabla 1:** Características clínicas y demográficas de los grupos de estudio

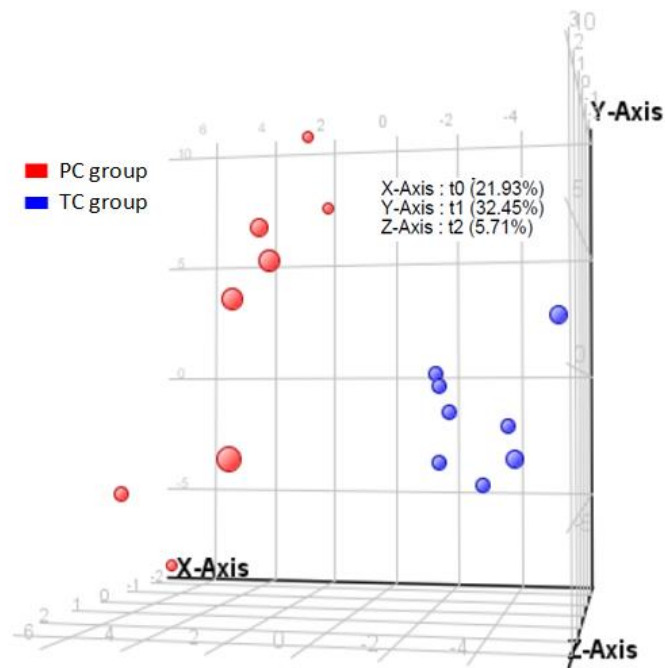
|  | Transient<br>Controllers | Persistent Controllers | <i>p-value</i> |
|--|--------------------------|------------------------|----------------|
| Age (years)                              | 41 [34-60]               | 44 [40-46]             | 0.635          |
| Male sex, n (%)                          | 5 (62.5)                 | 4 (50)                 | 0.614          |
| Sexual transmission, n (%)               | 5 (62.5)                 | 4 (50)                 | 0.198          |
| Time since diagnosis (years)             | 3 [2-8]                  | 13 [10-17]             | <b>0.005</b>   |
| HCV RNA detected, n (%)                  | 3 (37.5)                 | 3 (37.5)               | 0.999          |
| CD4 <sup>+</sup> T-cells (cell/ $\mu$ L) | 676 [623-963]            | 724 [609-985]          | 0.817          |
| CD8 <sup>+</sup> T-cells (cell/ $\mu$ L) | 787 [553-1162]           | 636 [432-1026]         | 0.482          |
| CD4:CD8 Ratio                            | 0.86 [0.53-1.55]         | 1.08 [0.93-1.47]       | 0.406          |
| HLA B57, n (%)                           | 3 (37.5)                 | 1 (12.5)               | 0.248          |
| HLA B27, n (%)                           | 1 (12.5)                 | 1 (12.5)               | 0.999          |
| HLA B35, n (%)                           | 0 (0)                    | 0 (0)                  | 0.999          |

## 2. Metabolómica

### Perfil metabólico que precede a la pérdida de control espontáneo del VIH

Mediante el análisis metabólico, con una aproximación dirigida y no dirigida, se pudieron detectar un total de 70 metabolitos en las muestras de plasma de los pacientes controladores de élite seleccionados para este estudio.

Previamente al análisis estadístico se realizó un análisis PLS-DA para ver la separación entre el grupo de los controladores transitorios, en los puntos previos a la pérdida de control, y el grupo de los controladores persistentes. Como se puede observar en la Figura 6 los dos grupos se distribuían de forma diferenciada, indicando la posibilidad de encontrar un perfil metabólico asociado a la pérdida de control virológico.



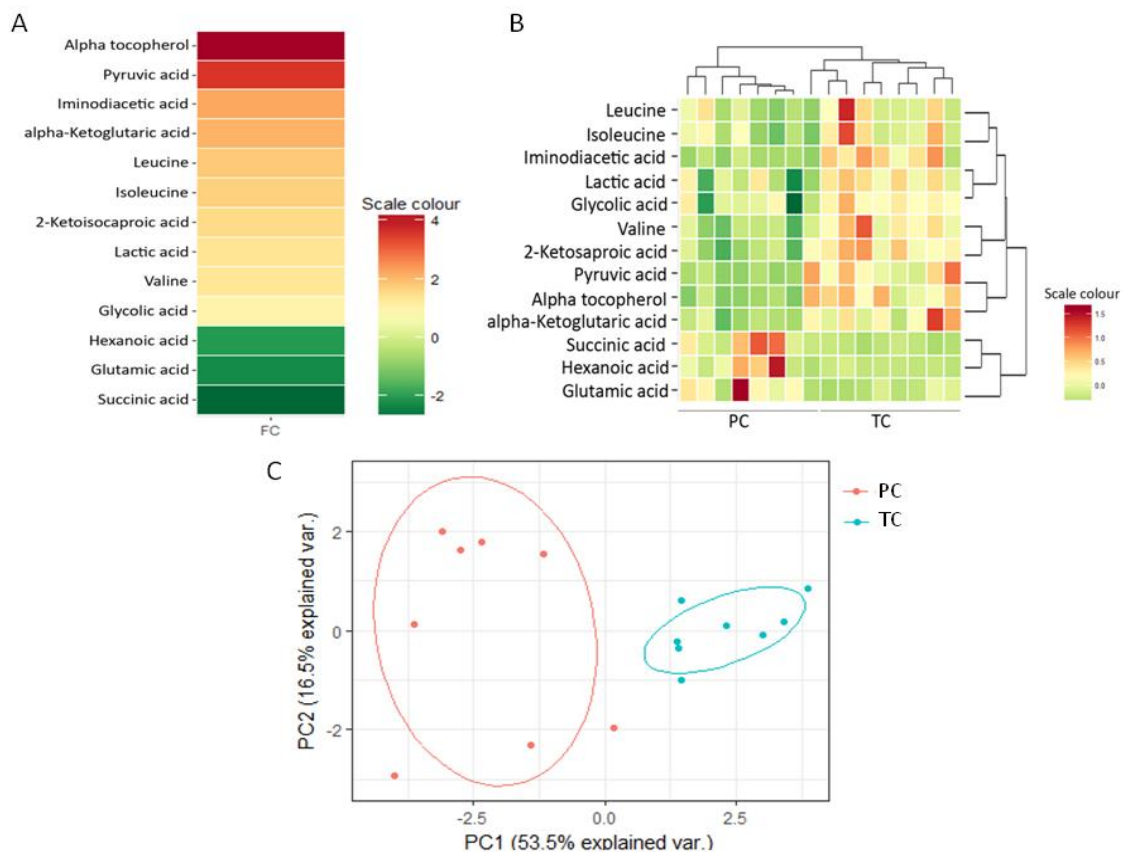
**Figura 6.** Análisis PLS-DA antes del análisis estadístico, utilizando todos los metabolitos cuantificados entre los pacientes CT (azul, n=8) y los CP (rojo, n=8). PC, persistent controllers; TC, transient controllers

De los 70 metabolitos plasmáticos analizados, únicamente 13 de ellos mostraban diferencias significativas entre ambos grupos (Anexo 2). Como se puede observar en el mapa de color o *Heatmap* (Figura 7A), los niveles plasmáticos de 10 metabolitos estaban significativamente incrementados en los controladores transitorios. Mientras que el resto se encontraban significativamente disminuidos en este mismo grupo en

comparación con los controladores persistentes. El análisis de agrupamiento jerárquico demostró que había un buen agrupamiento tanto de los pacientes en sus respectivos grupos como de los metabolitos según su tendencia (Figura 7B).

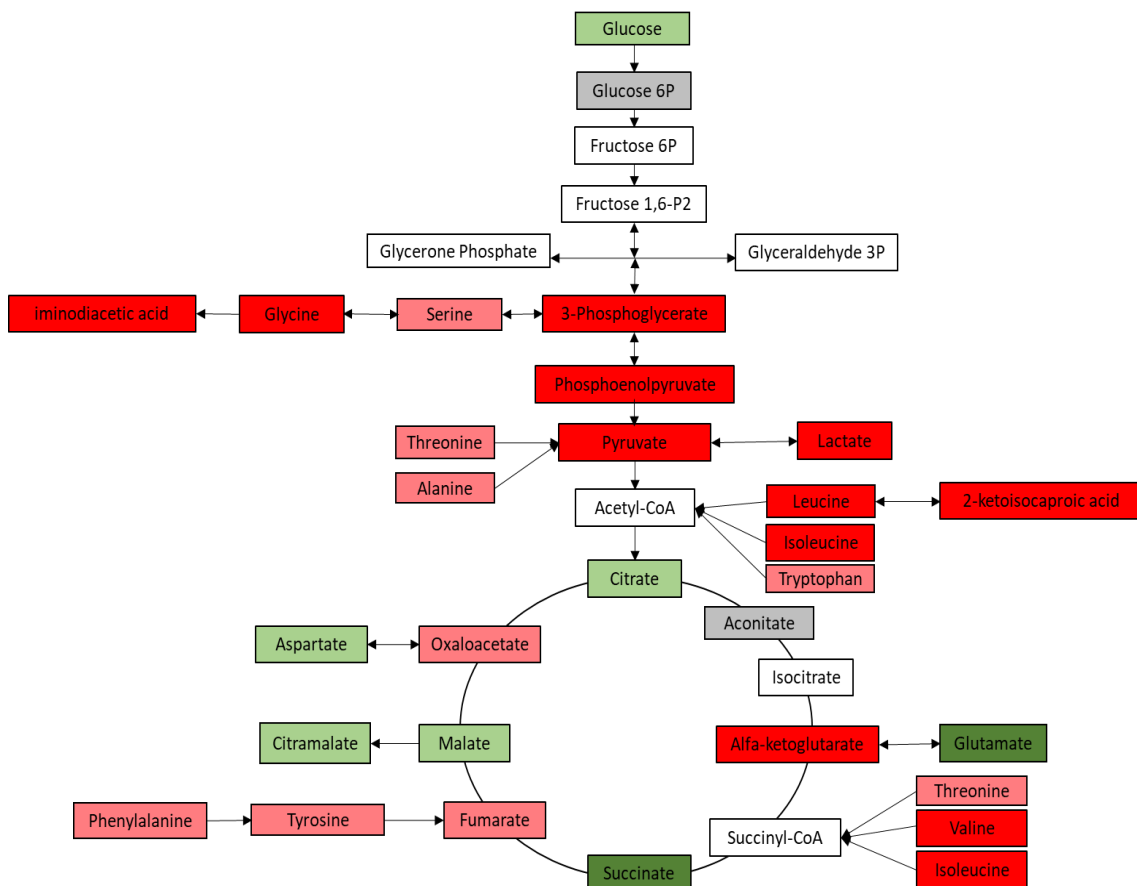
Además, con estas 13 variables estadísticamente significativas entre grupos se realizó un análisis de componentes principales (PCA). Como se puede observar en la Figura 7C, estos 13 metabolitos permitieron distinguir ambos grupos con una alta precisión. Este hecho indicó que estos metabolitos podrían ser candidatos a convertirse en un potencial marcador biológico predictivo de la pérdida de control virológico.

Los gráficos de barras de los metabolitos significativamente distintos entre ambos grupos se muestran en el Anexo 3, divididos según la vía metabólica en la que están involucrados.



**Figura 7:** Análisis metabólico comparando el grupo CT en el periodo previo a la pérdida de control con el grupo CP. A) Representación heatmap del fold change de los 13 metabolitos significativos. B) Análisis de agrupamiento jerárquico de las variables significativas (Heatmap con dendogramas). C) Análisis de componentes principales (PCA) comparando los grupos CT (azul) y CP (rojo).

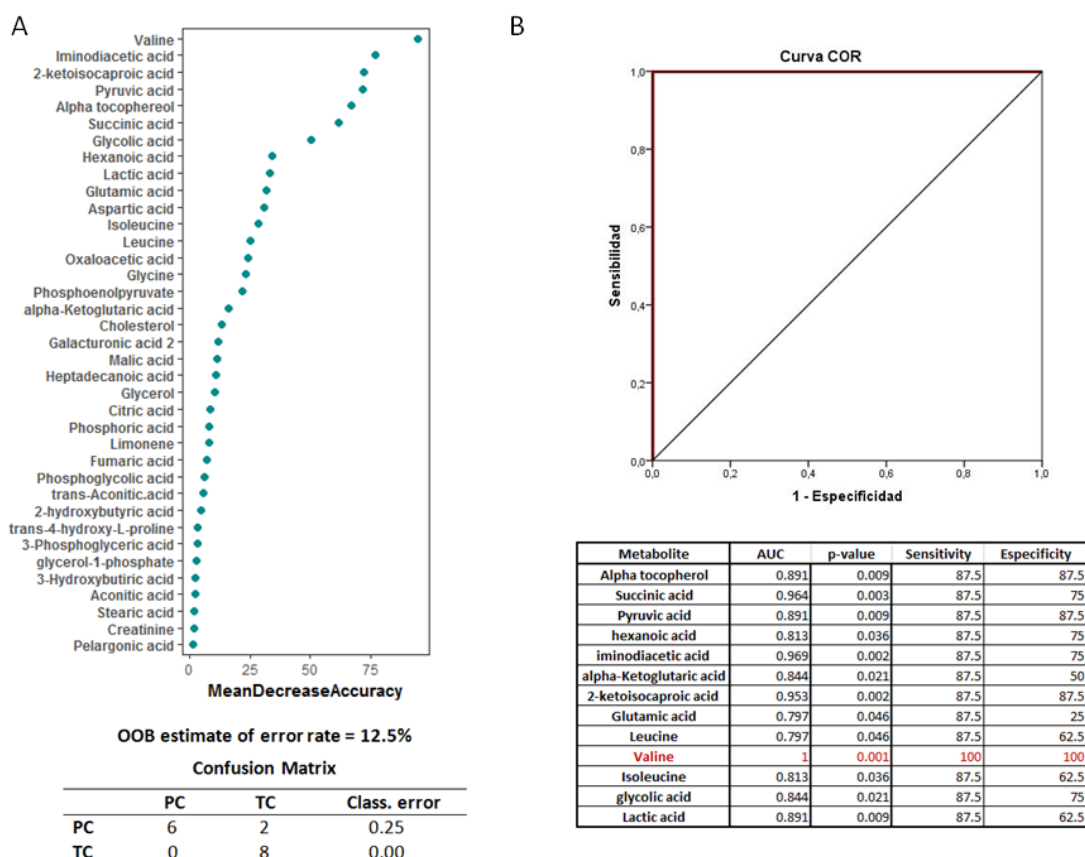
Las principales rutas metabólicas en las que estaban implicados estos 13 metabolitos fueron la vía glucolítica, el ciclo de Krebs y el metabolismo de los aminoácidos, especialmente el de los aminoácidos de cadena ramificada (Anexo 3). Como queda representado en la Figura 8, en el periodo previo a la pérdida del control virológico en los CT hay un incremento significativo de los intermediarios de la vía de la glucólisis (3-fosfoglicerato, fosfoenolpiruvato y el ácido pirúvico) así como una disminución de la glucosa. Además, en cuanto al ciclo de Krebs, se observó una disminución general de sus metabolitos siendo el descenso más significativo el del ácido succínico. Por el contrario, ciertos intermediarios de este mismo ciclo estaban aumentados, como por ejemplo el alfa-cetoglutarato que se encuentra significativamente incrementado en los controladores transitorios.



**Figura 8:** Alteraciones de la vía glucolítica, ciclo de Krebs y metabolismo de los aminoácidos en los controladores transitorios (CT) respecto a los controladores persistentes (CP). Los metabolitos incrementados y decrecidos que son estadísticamente significativos se encuentran en rojo y verde, respectivamente. Los tonos más claros de rojo y verde se utilizan para los metabolitos no significativos indicando la misma tendencia que en los significativos. Los metabolitos no detectados se muestran de color blanco y en gris los que no tienen una tendencia clara de aumento o disminución

Por último, cabe destacar el incremento significativo en el grupo CT de la concentración general de los aminoácidos, especialmente los de cadena ramificada (Leucina, Valina e Isoleucina) así como de sus derivados e intermediarios de su catabolismo (ácido iminodiacético y ácido 2- cetoisocaproico).

Dadas las diferencias encontradas entre el grupo CT, en los puntos de tiempo previos a la pérdida de control, y el grupo de controladores persistentes, se evaluó el comportamiento de estos metabolitos como potenciales marcadores biológicos capaces de predecir la pérdida de control. Para ello, en primer lugar, se realizó un análisis Random Forest (Figura 9A) que demostró que la valina, el ácido iminodiacético, ácido 2-cetoisocaproico, ácido pirúvico, alfa-tocoferol, ácido succínico y el ácido glicólico eran los metabolitos con mayor poder clasificatorio entre los grupos CT y CP. Este modelo multivariante basado en árboles de decisión tenía un error del 12.5% y la matriz de confusión generada por éste demostró que fue capaz de clasificar correctamente el 100% de los pacientes que iban a perder el control.



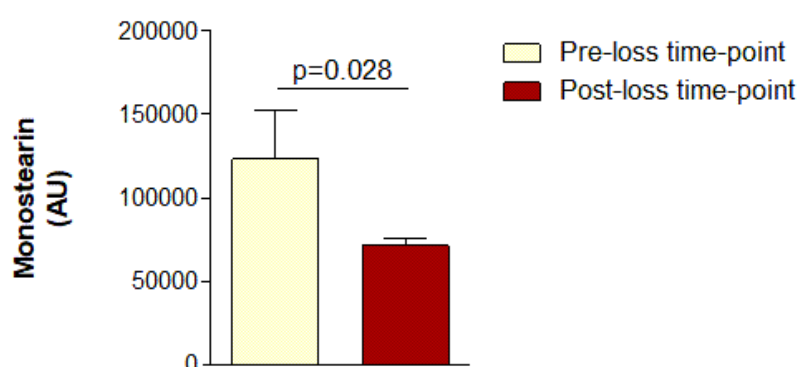
**Figura 9:** Potenciales marcadores biológicos de la pérdida de control del VIH. A) Análisis Random Forest, mostrando los metabolitos ordenados por su poder de predicción. B) Representación curva ROC correspondiente a la Valina. Tabla valores de la curva ROC de los metabolitos significativos.

Además, cabe destacar que estos metabolitos coinciden con los más significativamente distintos entre ambos grupos en el análisis estadístico univariante.

Para completar este análisis, se construyeron Curvas ROC (Figura 9B) de cada uno de los metabolitos significativos. La valina resultó ser el único metabolito capaz de diferenciar los grupos CT y CP con un 100% de sensibilidad y especificidad. Este resultado junto al Random Forest sugiere que este aminoácido parece ser un buen marcador biológico predictor de la pérdida espontánea del control virológico del VIH en los controladores de élite y una posible diana terapéutica.

### **Variación en el perfil metabolómico del grupo CT durante la progresión de la infección por VIH**

Por último, se estudió el efecto de la pérdida de control virológico sobre el metaboloma de los pacientes controladores de élite transitorios. Los resultados mostraron que, de los 70 metabolitos analizados, sólo un metabolito, la monostearina, un monoglicérido, era significativamente distinto antes y después de la pérdida de control. Los niveles de este monoglicérido disminuían significativamente (FC = -1,33) después de la pérdida del control virológico (Figura 10).



**Figura 10:** Gráfico de barras comparando los niveles de monostearina en el grupo CT antes y después de la pérdida de control.

## Discusión

Los resultados obtenidos demostraron que existe un perfil metabólico asociado a la pérdida de control virológico, en otras palabras, un perfil metabólico que permite distinguir los pacientes controladores transitorios de los controladores persistentes. Existen otros estudios metabólicos realizados en biofluidos de pacientes infectados por el VIH pero todos ellos se han centrado, principalmente, en detectar alteraciones metabólicas debidas a la progresión de la infección y la respuesta al tratamiento antirretroviral [37-40,42]. Por ello, el presente trabajo puede considerarse el primer estudio centrado en la determinación de las alteraciones metabólicas asociadas a la pérdida de control de la replicación del VIH en pacientes controladores de élite.

Este perfil diferencial está caracterizado por alteraciones de metabolitos implicados, principalmente, en la glucólisis, ciclo de Krebs y el metabolismo de los aminoácidos, destacando el de los aminoácidos de cadena ramificada. Existen evidencias de alteraciones significativas en rutas metabólicas tales como la glucólisis, el ciclo de Krebs, el metabolismo de los lípidos y el catabolismo de los aminoácidos en pacientes infectados por el VIH pero hasta el momento estos cambios no se habían asociado a la pérdida de control virológico [41].

La activación celular, la respuesta antiviral y otras funciones efectoras del sistema inmunológico dependen de un adecuado metabolismo de la glucosa. A nivel celular, concretamente en linfocitos T, se ha descrito que pacientes infectados por el VIH presentan un mayor consumo de glucosa y un incremento de la glucólisis respecto a individuos sanos [45,46]. Nuestros resultados mostraron que en el grupo de controladores transitorios en el periodo previo a la pérdida de control, existe un incremento de intermediarios de la vía glucolítica así como una disminución plasmática de glucosa. Estudios previos del grupo han demostrado que los controladores transitorios presentan una mayor diversidad viral, una mayor producción de citocinas pro-inflamatorias, como por ejemplo de RANTES, y una desregulación de proteínas asociadas con la migración celular y rutas inflamatorias [33]. Todo ello podría indicar que las diferencias metabólicas observadas entre los dos grupos de estudio, serían a causa de una mayor activación inmunológica en este grupo de pacientes antes de la

pérdida de control virológico. También se observó que los controladores transitorios presentaban un aumento significativo de las concentraciones plasmáticas de lactato, en otras palabras, acidemia láctica o hiperlactatemia. Este trastorno es indicativo de una deficiente capacidad oxidativa de la mitocondria [47,48].

En este mismo sentido, se percibió una disminución generalizada de los metabolitos del ciclo de Krebs en los controladores transitorios en comparación con los controladores persistente. Cabe destacar que los niveles de algunos intermediarios estaban incrementados en este mismo grupo. Este hecho puede parecer contradictorio, pero podría justificarse por la conversión de otros metabolitos en estos intermediarios del ciclo de Krebs, como un mecanismo de compensación ante una capacidad energética disminuida en esto pacientes. Ejemplo de ello, es el aumento que se observó en cuanto a las concentraciones plasmáticas del alfa-cetoglutarato. Este incremento podría estar ocasionado por la oxidación del glutamato que, precisamente se encuentra disminuido significativamente. De acuerdo con esto, previamente otros estudios han demostrado que este aminoácido ante niveles de energía reducidos puede convertirse en alfa-cetoglutarato para ser utilizado en el ciclo de Krebs con el fin producir energía. [49]. Por lo tanto, el conjunto de resultados obtenidos parece indicar una disfunción mitocondrial para la obtención de energía en el grupo de pacientes transitorios en el periodo que precede a la pérdida de control. Estudios previos han demostrado la importancia de la mitocondria para la progresión de la patología del VIH. La mitocondria puede influir directamente en la infectividad del virus, el curso de la infección y la prevalencia de los efectos secundarios de la terapia antirretroviral [50].

Dadas todas estas diferencias metabólicas entre ambos grupos en el periodo previo a la pérdida de control, los metabolitos alterados podrían ser candidatos a convertirse en potenciales marcadores biológicos predictivos de una futura pérdida de control de la replicación viral en pacientes controladores de élite, así como llegar a ser potenciales dianas terapéuticas. En este sentido, tras el análisis del *Random Forest* y las curvas ROC quedó demostrado que entre los metabolitos significativos, la valina podría considerarse el mejor marcador biológico predictivo de la pérdida espontánea del control virológico del VIH en pacientes controladores de élite.

Este aminoácido pertenece a los aminoácidos de cadena ramificada (Leucina, Valina, Isoleucina) y precisamente los resultados obtenidos indicaron una acumulación de estos en el grupo de controladores transitorios. Estos tres aminoácidos denominados por la estructura ramificada de su cadena lateral, se caracterizan por ser esenciales para el ser humano, es decir no pueden ser sintetizados, y además comparten los mismos enzimas en los primeros pasos de su degradación [51]. Algunos estudios relacionan elevadas concentraciones plasmáticas de leucina, valina e isoleucina así como sus cetoácidos derivados, con un catabolismo deficiente [52,53]. Por lo tanto, sus niveles aumentados en los controladores transitorios podrían deberse a una degradación reducida o incompleta, lo que ocasiona que se acumulen estos y sus subproductos, como por ejemplo el ácido 2 cetoisocaproico, un intermediario del catabolismo de la leucina que estaba incrementado significativamente. Además, esta acumulación puede, a su vez, estar relacionada con la posible deficiencia del ciclo de Krebs ya que los productos catabólicos de estos aminoácidos pueden utilizarse para el metabolismo energético oxidativo [53]

Asimismo, ciertos estudios demuestran que altas concentraciones de aminoácidos de cadena ramificada promueven el estrés oxidativo aumentando la producción de especies reactivas del oxígeno conllevando daño y disfunción mitocondrial [54]. El alfa-tocoferol, comúnmente conocida como vitamina E, desempeña un papel importante como antioxidante [55], lo que sugiere que su aumento en los controladores transitorios podría ser un mecanismo de defensa compensatorio ante la presencia de estrés oxidativo. Se ha visto que la suplementación con la vitamina E reduce el estrés oxidativo en pacientes infectados por VIH y produce una reducción de la carga viral [56].

Por último, este estudio demuestra que una vez el paciente infectado por el VIH ha perdido el control virológico no existen grandes diferencias en su metaboloma.

En resumen, el presente estudio demostró alteraciones significativas de metabolitos implicados en las principales vías metabólicas precedentes a la pérdida de control y, a su vez, determinó que concentraciones elevadas de valina podrían ser un indicativo de la inminente pérdida de control virológico en pacientes inicialmente catalogados como controladores de élite.

La principal limitación de este trabajo es el reducido número de muestras analizadas. En este aspecto, cabe destacar que este tipo de pacientes representan un porcentaje muy bajo del total de infectados por VIH por lo que es muy difícil obtener un gran número de muestras. Además la distinción entre los dos fenotipos y el extenso seguimiento de estos hace todavía más complicada la disponibilidad de muestras. Esta poca disponibilidad limita principalmente el poder estadístico del estudio, primordial en la identificación de potenciales marcadores biológicos predictivos. Por ello, es necesaria la realización de otros estudios con este mismo diseño de estudio pero utilizando un mayor número de muestras.

## **Conclusiones**

En el presente trabajo, se ha demostrado la existencia de un perfil metabolómico que precede a la pérdida espontánea de control del VIH. Además, se han determinado alteraciones de varias rutas metabólicas en los controladores transitorios precedentes a la pérdida de control. Estas alteraciones afectan principalmente a la glucólisis, al ciclo de Krebs y al metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada. Los metabolitos implicados en estas vías alteradas, especialmente la valina, podrían ser considerados potenciales marcadores biológicos predictivos de la pérdida de control de la replicación viral en pacientes controladores de élite.

Los resultados en su conjunto indican que en los controladores transitorios antes de la pérdida de control, tiene lugar una mayor activación inmunológica y un posible estrés oxidativo que implica una disfunción mitocondrial. Sin embargo, no se pudieron apreciar apenas diferencias metabolómicas en el grupo de controladores transitorios como efecto de la progresión de la infección. Dada la limitación del número de muestras, este estudio debe ser complementado con futuros estudios que estudien ampliamente la implicación de la pérdida de control virológico en las alteraciones del metaboloma de los controladores de élite. De este modo se podrán identificar las vías mecánicas involucradas en el control espontáneo que es esencial para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra el VIH.

## Autoevaluación

Personalmente, valoro el trabajo realizado como una experiencia muy satisfactoria por todos los conocimientos aprendidos y por el interés científico de los resultados obtenidos.

Inicialmente, cuando el personal del grupo de investigación de Infección e Inmunidad (INIM) me explicó el estudio en el que podía colaborar, me pareció una temática muy interesante aunque tenía cierto temor a que el análisis estadístico que debía realizar me pudiese resultar difícil.

Afortunadamente, con mayor o menor dificultad dependiendo de la tarea, pude llevar a cabo la estadística necesaria para este trabajo. Además, el considerable tiempo dedicado al análisis de datos se vio recompensado por obtener unos resultados con un sentido científico. Precisamente, lo más gratificante de la realización de este trabajo fue ver como se transformaban un conjunto de datos en unos resultados que se ajustaban a los objetivos establecidos.

Este trabajo fue para mí muy enriquecedor, por todo lo aprendido referente a la infección por VIH, así como conceptos de estadística y el uso de programas como R, SPSS y GraphPad Prism. Considero que conocer el funcionamiento de estos programas puede llegar a ser muy útil en algún momento de mi futuro profesional.

Finalmente, decir que me siento muy afortunada y satisfecha porque mi labor pueda contribuir de alguna manera a las investigaciones del grupo.

## Bibliografía

1. Seitz, R. Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfus. Med. Hemotherapy* 43, 203–222 (2016).
2. Delgado, R. Características virológicas del VIH. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 29, 58–65 (2011).
3. Barré-Sinoussi, F., Ross, A. L. & Delfraissy, J.-F. Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 877–883 (2013).
4. Deeks, S. G., Overbaugh, J., Phillips, A. & Buchbinder, S. HIV infection. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 1, 15035 (2015).
5. Soto-Ramírez, L. E. Mecanismos patogénicos de la infección por VIH. *Rev. Investig. clínica, Dep. Infectología, Inst. Nac. Ciencias Médicas y Nutr. Salvador Zubirán* 56, 143–152 (2004).
6. King, S. R. HIV: Virology and mechanisms of disease. *Ann. Emerg. Med.* 24, 443–449 (1994).
7. Beyer, D. Estructura del virión del VIH. (2006). Available at: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:HI-virión.png#/media/File:HI-virión.png>. (Accessed: 22nd May 2018)
8. Thomas Splettstoesser. Structure of the HIV-1 genome. (2014). Available at: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:HIV-genome.png>. (Accessed: 22nd May 2018)
9. Kirchhoff, F. HIV Life Cycle: Overview. In: *Encyclopedia of AIDS* (eds. Hope, T. J., Richman, D. & Stevenson, M.) (Springer New York, 2013).
10. Alcamí, J. & Coiras, M. Inmunopatogenia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 29, 216–226 (2011).
11. Alcamí, J. Ciclo replicativo del VIH. Dianas terapéuticas consolidadas y dianas potenciales. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 26, 3–10 (2008).
12. Jurema Oliveira. HIV time course. (2005). Available at: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hiv-timecourse-es.png>. (Accessed: 27th May 2018)

13. Gatell, J. M. & Zamora, L. Historia natural de la infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1. Clasificación y criterios diagnósticos para vigilancia epidemiológica. In: Guía práctica del sida: Clínica, diagnóstico y tratamiento 73–106 (Editorial Escofet Zamora S.L, 2013).
14. Fanales-Belasio, E., Raimondo, M., Suligoi, B. & Buttò, S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: A brief overview. *Ann Ist Super Sanità* 46, 5–14 (2010).
15. Codina, C., Martin, M. & Ibarra, O. La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. In: *Farmacia Hospitalaria* 1493–1516 (2002).
16. Poorolajal, J., Hooshmand, E., Mahjub, H., Esmailnasab, N. & Jenabi, E. Survival rate of AIDS disease and mortality in HIV-infected patients: a meta-analysis. *Public Health* 139, 3–12 (2016).
17. Battegay, M., Nüesch, R., Hirschel, B. & Kaufmann, G. R. Immunological recovery and antiretroviral therapy in HIV-1 infection. *Lancet Infect. Dis.* 6, 280–287 (2006).
18. Gurdasani, D. et al. A systematic review of definitions of extreme phenotypes of HIV control and progression. *AIDS* 28, 149–162 (2014).
19. Thèze, J., Chakrabarti, L. A., Vingert, B., Porichis, F. & Kaufmann, D. E. HIV controllers: A multifactorial phenotype of spontaneous viral suppression. *Clin. Immunol.* 141, 15–30 (2011).
20. Lambotte, O. et al. HIV Controllers: A Homogeneous Group of HIV-1--Infected Patients with Spontaneous Control of Viral Replication. *Clin. Infect. Dis.* 41, 1053–1056 (2005).
21. Leon, A. et al. Rate and predictors of progression in elite and viremic HIV-1 controllers. *AIDS* 30, 1209–1220 (2016).
22. Gonzalo-Gil, E., Ikediobi, U. & Sutton, R. E. Mechanisms of Virologic Control and Clinical Characteristics of HIV+ Elite/Viremic Controllers. *Yale J. Biol. Med.* 90, 245–259 (2017).
23. Sabin, C. A. & Lundgren, J. D. The natural history of HIV infection. *Curr. Opin. HIV AIDS* 8, 311–317 (2013).
24. Okulicz, J. F. & Lambotte, O. Epidemiology and clinical characteristics of elite controllers. *Curr. Opin. HIV AIDS* 6, 163–168 (2011).

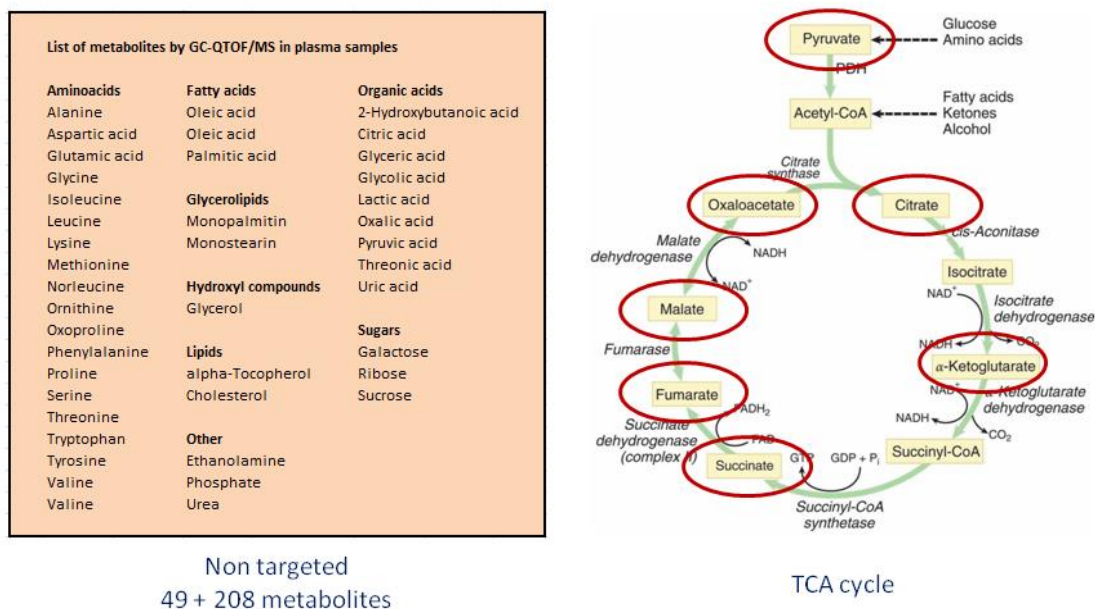
25. Deeks, S. G. & Walker, B. D. Human Immunodeficiency Virus Controllers: Mechanisms of Durable Virus Control in the Absence of Antiretroviral Therapy. *Immunity* 27, 406–416 (2007).
26. F. Okulicz, J. Elite Controllers and Long-term Nonprogressors: Models for HIV Vaccine Development? *J. AIDS Clin. Res.* 03, 1–4 (2012).
27. Shasha, D. & Walker, B. D. Lessons to be Learned from Natural Control of HIV - Future Directions, Therapeutic, and Preventive Implications. *Front. Immunol.* 4, (2013).
28. Cockerham, L. R. & Hatano, H. Elite control of HIV: is this the right model for a functional cure? *Trends Microbiol.* 23, 71–75 (2015).
29. Walker, B. D. & Yu, X. G. Unravelling the mechanisms of durable control of HIV-1. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 487–498 (2013).
30. O’Connell, K. A., Bailey, J. R. & Blankson, J. N. Elucidating the elite: mechanisms of control in HIV-1 infection. *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 631–637 (2009).
31. Dominguez-Molina, B. et al. HLA-B\*57 and IFNL4-related polymorphisms are associated with protection against HIV-1 disease progression in controllers. *Clin. Infect. Dis.* 64, 621–628 (2017).
32. Lecuroux, C. et al. Both HLA-B\*57 and Plasma HIV RNA Levels Contribute to the HIV-Specific CD8+ T Cell Response in HIV Controllers. *J. Virol.* 88, 176–187 (2014).
33. Pernas, M. et al. Factors Leading to the Loss of Natural Elite Control of HIV-1 Infection. *J. Virol.* 92, 1805–1817 (2017).
34. Zhang, A., Sun, H., Wang, P., Han, Y. & Wang, X. Recent and potential developments of biofluid analyses in metabolomics. *J. Proteomics* 75, 1079–1088 (2012).
35. Strimbu, K. & Tavel, J. A. What are biomarkers? *Curr. Opin. HIV AIDS* 5, 463–466 (2010).
36. Nicholls, A., Theodoridis, G. & Wilson, I. D. Global metabolic profiling in health and disease. In: *Global Metabolic Profiling: Clinical Applications 2–5* (Future Science Ltd, 2014).

37. Sitole, L. J., Williams, A. A. & Meyer, D. Metabonomic analysis of HIV-infected biofluids. *Mol. BioSyst.* 9, 18–28 (2013).
38. Ghannoum, M. A. et al. Metabolomics reveals differential levels of oral metabolites in HIV-infected patients: toward novel diagnostic targets. *OMICS* 17, 5–15 (2013).
39. Rodríguez-Gallego, E. et al. A baseline metabolomic signature is associated with immunological CD4+ T-cell recovery after 36 months of antiretroviral therapy in HIV-infected patients. *Aids* 32, 565–573 (2018).
40. Rodríguez-Gallego, E. et al. Circulating metabolomic profile can predict dyslipidemia in HIV patients undergoing antiretroviral therapy. *Atherosclerosis* 273, 28–36 (2018).
41. Hollenbaugh, J. A., Munger, J. & Kim, B. Metabolite profiles of human immunodeficiency virus infected CD4+ T cells and macrophages using LC–MS/MS analysis. *Virology* 415, 153–159 (2011).
42. Scarpellini, B. et al. Plasma Metabolomics Biosignature According to HIV Stage of Infection, Pace of Disease Progression, Viremia Level and Immunological Response to Treatment. *PLoS One* 11, 1–13 (2016).
43. Breiman, L. Random Forests. *Mach. Learn.* 45, 5–32 (2001).
44. Cerda, J. & Cifuentes, L. Uso de curvas ROC en investigación clínica: Aspectos teórico-prácticos. *Rev. Chil. infectología* 29, 138–141 (2012).
45. Palmer, C. S. et al. Increased glucose metabolic activity is associated with CD4+ T-cell activation and depletion during chronic HIV infection. *AIDS* 28, 297–309 (2014).
46. Palmer, C. S., Ostrowski, M., Balderson, B., Christian, N. & Crowe, S. M. Glucose Metabolism Regulates T Cell Activation, Differentiation, and Functions. *Front. Immunol.* 6, (2015).
47. Garrabou, G. et al. Genetic and Functional Mitochondrial Assessment of HIV-Infected Patients Developing HAART-Related Hyperlactatemia. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 52, 443–451 (2009).

48. Pérez-Matute, P., Pérez-Martínez, L., Blanco, J. R. & Oteo, J. A. Role of mitochondria in HIV infection and associated metabolic disorders: focus on nonalcoholic fatty liver disease and lipodystrophy syndrome. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 1–13 (2013).
49. King, M. Amino Acid Synthesis and Metabolism. *The medical biochemistry page* (2018). Available at: <http://themedicalbiochemistrypage.org/amino-acid-metabolism.php>. (Accessed: 10th May 2018)
50. Villeneuve, L. M. et al. HIV-1 transgenic rats display mitochondrial abnormalities consistent with abnormal energy generation and distribution. *J. Neurovirol.* 22, 564–574 (2016).
51. Cole, J. T. Metabolism of BCAAs. In: *Branched Chain Amino Acids in Clinical Nutrition* (eds. Rajendram, R., Preedy, V. R. & Patel, V. B.) 1, 13–25 (Springer New York, 2015).
52. Manoli, I. & Venditti, C. P. Disorders of branched chain amino acid metabolism. *Transl. Sci. Rare Dis.* 1, 91–110 (2016).
53. Kujala, U. M. et al. Branched-Chain Amino Acid Levels Are Related with Surrogates of Disturbed Lipid Metabolism among Older Men. *Front. Med.* 3, 1–9 (2016).
54. Zhenyukh, O. et al. High concentration of branched-chain amino acids promotes oxidative stress, inflammation and migration of human peripheral blood mononuclear cells via mTORC1 activation. *Free Radic. Biol. Med.* 104, 165–177 (2017).
55. Niki, E. Evidence for beneficial effects of vitamin E. *Korean J. Intern. Med.* 30, 571–579 (2015).
56. Allard, J. P. et al. Effects of vitamin E and C supplementation on oxidative stress and viral load in HIV-infected subjects. *AIDS* 12, 1653–1659 (1998).

# **ANEXOS**

**Anexo 1:** Lista de los metabolitos que se pudieron analizar mediante la aproximación no dirigida y metabolitos del ciclo de Krebs analizados (rodeados en rojo) mediante el análisis dirigido.

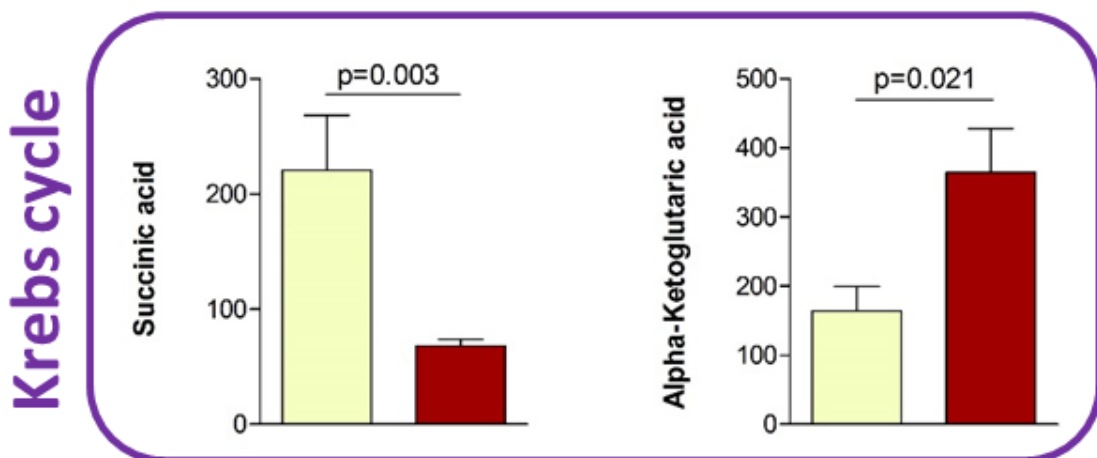
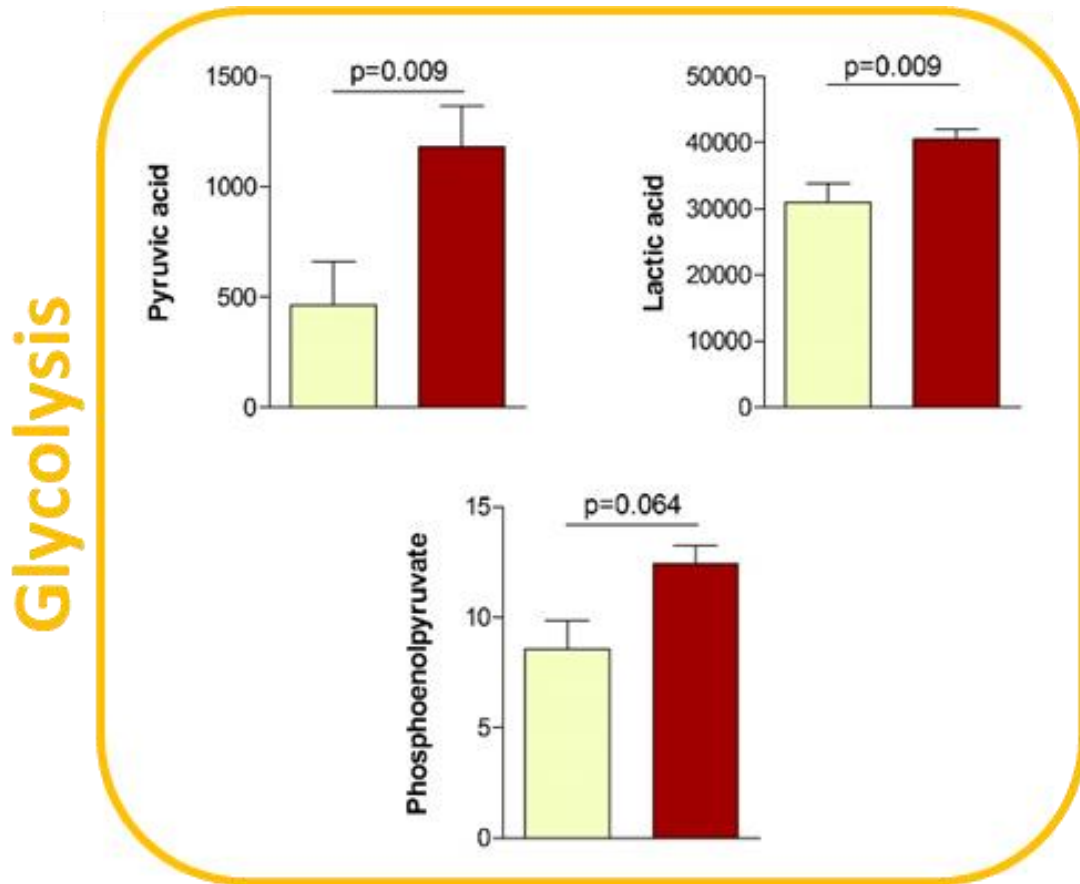


**Anexo 2:** Lista de los metabolitos estadísticamente significativos entre los grupos CP y CT, obtenidos de la Prueba U de Mann-Whitney.

| Metabolite              | PC<br>Persistent Controllers | TC<br>Transient Controllers | P-value |
|-------------------------|------------------------------|-----------------------------|---------|
| Alpha tocopherol        | 85199(49572-170761)          | 374100(269281-487424)       | 0,009   |
| Succinic acid           | 209,18 (107-367)             | 72,71(50,89-81,39)          | 0,003   |
| Pyruvic acid            | 282(159-454)                 | 1022(732-1616)              | 0,009   |
| Hexanoic acid           | 58701(30479-130557)          | 28050(25712-30753)          | 0,036   |
| Iminodiacetic acid      | 553326(484599-644879)        | 1260789(994274-1489305)     | 0,002   |
| alpha-Ketoglutaric acid | 153,1(105,95-233,57)         | 325,95(232,61-499,32)       | 0,021   |
| 2-Ketoisocaproic acid   | 1143127(839690-1407129)      | 1768711(1605497-2152416)    | 0,002   |
| Glutamic acid           | 4114(1878-4750)              | 1761(1401-2664)             | 0,046   |
| Leucine                 | 345,19(246,48-620,07)        | 630,76(490,32-968,34)       | 0,046   |
| Valine                  | 2399(1780-2571)              | 3162,78(2860,55-3689,56)    | 0,001   |
| Isoleucine              | 584,78(358,13-985,81)        | 997,7(730,56-1458,84)       | 0,036   |
| Glycolic acid           | 29168897(26104881-30077592)  | 30296220(30110701-30722305) | 0,021   |
| Lactic acid             | 30971(24068-38878)           | 42124(36650-43394)          | 0,009   |

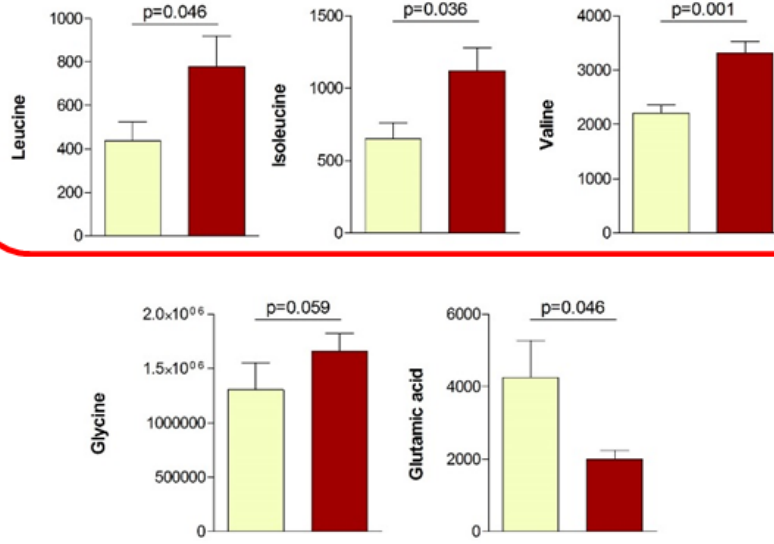
Los resultados aparecen expresados en mediana y entre paréntesis el rango intercuartílico. Se consideraron estadísticamente significativos todos los p valores <0,05.

**Anexo 3:** Gráficos de barras de metabolitos significativos en la comparación entre el grupo CP (amarillo) y el grupo CT (rojo), divididos según la ruta metabólica en la que están involucrados.

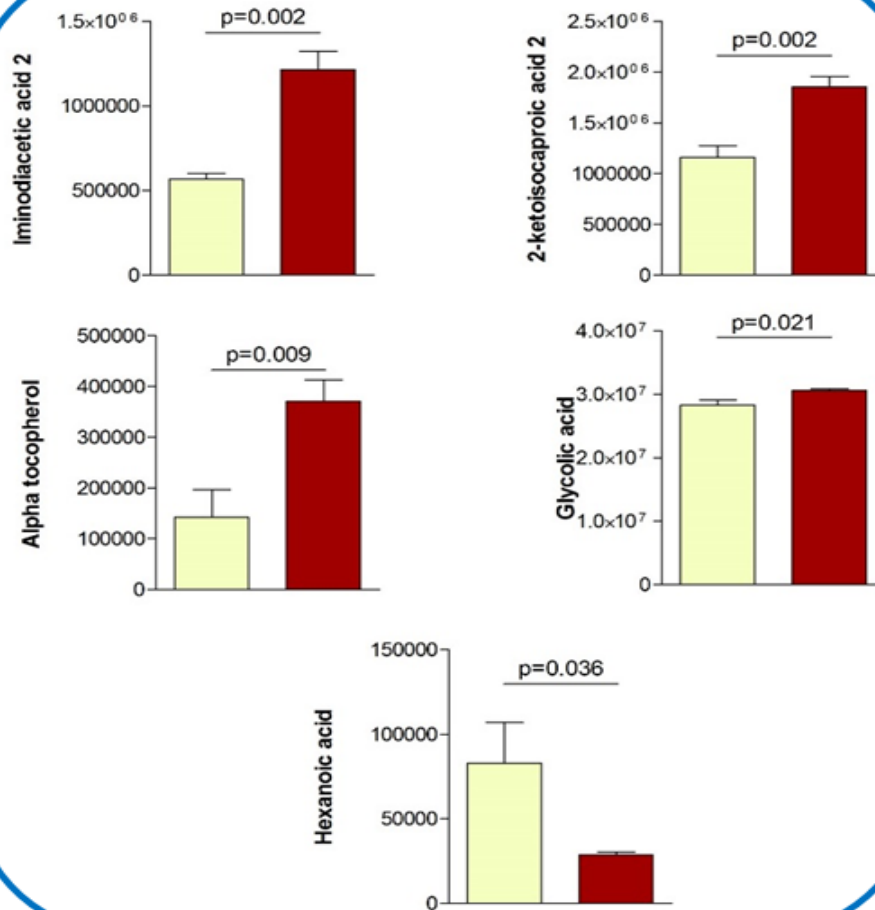


# Amino acids

## Branched-amino acids



# Others



ANNEX 2

FITXA DE SEGUIMENT DEL TUTOR/A del TFG

Nom i Cognoms de l'Alumne/a: MIRIAN BELOSO SANTIAGO

Nom i Cognoms del Tutor/a: CARMEN PORTILLO GUISADO

Data de la entrevista amb l'alumne: 6 de Junio 2018

Recomanacions durant el seguiment: Terminar Introducció, hacer discusion. Preparar una portada e indice correctos. Explicar la hipótesis. Incluir bibliografía relevante en el texto. Incluir lista de bibliografía. Incluir conclusiones. Incluir autoevaluación.

Observacions: Debido a la proximidad a la fecha límite de la entrega del Anexo 2 (9 de junio) No tendré oportunidad de verificar si las recomendaciones se han realizado por la alumna

Observacions Darrera revisió:

Signatura del Tutor/a



Signatura del Alumne/a



Tarragona a 7 de Junio 2018