



ESTUDI DE BIOMARCADORS PREDICTIUS EN EL CONTROL NATURAL DEL VIH EN CONTROLADORS D'ELIT

Jenifer Masip Morcillo

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

ESTUDI DE BIOMARCADORS PREDICTIUS EN EL CONTROL NATURAL DEL VIH EN CONTROLADORS D'ELIT

TESI DOCTORAL

JENIFER MASIP MORCILLO



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

DIRECTORS DE TESI:

ANNA RULL AIXA

JOAQUIM PERAIRE FORNER

CONSUELO VILADÉS LABORDA

FRANCESC VIDAL MARSAL

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI, TARRAGONA

GENER 2023



FAIG CONSTAR que aquest treball, titulat “Estudi de biomarcadors predictius en el control natural del VIH en Controladors d’Elit”, que presenta Jenifer Masip Morcillo per a l’obtenció del títol de Doctor, ha estat realitzat sota la meva direcció al Departament de Medicina i Cirurgia d’aquesta universitat.

HAGO CONSTAR que el presente trabajo, titulado “Estudi de biomarcadors predictius en el control natural del VIH en Controladors d’Elit”, que presenta Jenifer Masip Morcillo para la obtención del título de Doctor, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Medicina y Cirugía de esta universidad.

I STATE that the present study, entitled “Estudi de biomarcadors predictius en el control natural del VIH en Controladors d’Elit”, presented by Jenifer Masip Morcillo for the award of the degree of Doctor, has been carried out under my supervision at the Department of Medicine and Surgery of this university.

Tarragona, 11 de gener del 2023

El/s director/s de la tesi doctoral

Anna Rull Aixa

Joaquim Peraire Forner

Consuelo Viladés Laborda

Francesc Vidal Marsal

ÍNDEX

AGRAÏMENTS	9
RESUM	11
ABREVIATURES	13
I. JUSTIFICACIÓ DEL TREBALL.....	15
II. INTRODUCCIÓ	19
1. Virus de la immunodeficiència humana (VIH).....	19
1.1. VIH: estructura i genoma.....	19
2. Patogènesi de la infecció.....	21
2.1. Infecció aguda/primària	22
2.2. Infecció crònica.....	23
2.3. La SIDA.....	23
3. Controladors d'elit	23
3.1. Definicions i criteris de controlador d'elit	24
3.2. Fenotips de controladors d'elit	26
4. Factors associats al control persistent del VIH.....	20
4.1. Factors epidemiològics	21
4.2. Factors d'atenuació viral	21
4.3. Factors de l'hoste	22
5. La importància de la immunitat innata en el control natural del VIH.....	30
5.1. L'eficàcia antiviral de les cèl·lules T CD8 ⁺	31
5.2. Resposta de cèl·lules T CD4 ⁺ específiques en el control viral.....	33
6. Els controladors d'elit com a model de cura funcional	34
6.1. Tipus de cures del VIH	34
6.2. Estratègies de cura funcional	34
6.3. Estratègies de cura esterilitzant	35
6.4. Estratègia "Shock and Kill"	36
6.5. Teràpia antiretroviral combinada.....	30
6.6. El disseny d'una vacuna contra el VIH	30
7. Teràpia antiretroviral en controladors d'elit: una gran controvèrsia.....	32
8. Estudi dels mecanismes de control persistent del VIH mitjançant ciències òmiques....	41
8.1. Genòmica i transcriptòmica i el seu impacte funcional.....	42
8.2. La proteòmica en la patogènesi del VIH	43
8.3. Metabolòmica i lipidòmica: biomarcadors en l'immunometabolisme.....	44

III. HIPÒTESI I OBJETIUS	42
IV. MATERIALS I MÈTODES	53
1. Disseny de l'estudi i participants.....	53
2. Protocol ètic	54
3. Perfil d'expressió de miRNA mitjançant TaqMan Advanced miRNA Human Plasma Cards (TLDA).....	54
4. Prova de Liposcale: mesures del perfil lipídic i de lipoproteïnes	54
5. Determinació del perfil metabòlic (mètode analític)	55
6. Determinació del perfil lipídomic (mètode analític)	56
7. Anàlisi estadística.....	56
V. RESULTATS.....	61
TREBALL 1.....	61
TREBALL 2.....	91
VI. DISCUSSIÓ.....	121
1. Estudi 1: el perfil d'expressió de miRNA està associat a la progressió virològica en els controladors d'elit.....	121
1.1. Replicació i cicle cel·lular.....	122
1.2. Activació immune i Inflamació	123
1.3. Immunometabolisme	124
2. Estudi 2: el perfil metabòlic subjacent al fenotip de controladors d'elit a llarg termini associat al control viral i immunològic persistent	125
2.1. Perfil metabòlic	126
2.2. Perfil lipídomic.....	127
VII. CONCLUSIONS.....	133
VIII. ALTRES PUBLICACIONS RELLEVANTS.....	137
IX. REFERÈNCIES.....	141

AGRAÏMENTS

Vull expressar el meu sincer agraïment a totes les persones que han fet possible l'elaboració d'aquesta tesi doctoral. A la Universitat Rovira i Virgili per donar-me l'oportunitat d'iniciar la meua carrera com a investigadora amb la beca Martí i Franquès. Les col·laboracions amb l'Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili i amb l'Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona per la facilitació de dades i cohorts de treball.

Agraeixo als meus directors/tutors de tesi del grup INIM, el Dr. Vidal, el Dr. Peraire i la Dra. Viladés, el seu interès pel seguiment de la meua feina i el suport continu i donar-me l'oportunitat de conèixer el fascinant món del VIH.

De manera especial vull agrair a la Dra. Anna Rull la confiança, constància i bon consell amb què m'ha ajudat durant el desenvolupament d'aquesta tesi.

A tots els companys de la unitat de recerca i docència de l'Hospital Joan XXIII amb els quals he compartit més de tres anys d'alegria, estrès i altres sensacions. No ha sigut un camí fàcil, però ho hem aconseguit, aquí estem.

A la meua família, especialment als meus pares, que sempre estan quan els necessito, tot i que a vegades no us faci massa cas, sempre teniu raó, us estimo molt.

Per últim i no menys important, a la meua parella, el David, pel seu suport constant durant les diferents etapes de la meua vida, cadascuna més complicada que l'anterior. Ara et toca a tu.

A la meua boleta de pèl, Sena, per tota l'alegria que em dones sense res a canvi.

RESUM

En els darrers anys, els diferents estudis han permès identificar marcadors biològics i mecanismes d'acció implicats en la replicació vírica i la immunopatogènia del virus de la immunodeficiència humana (VIH) com ara factors genètics de l'hoste, principalment l'antigen leucocitari humà, així com mecanismes immunològics, com ara la resposta específica de cèl·lules T contra el virus. La identificació d'un grup de pacients infectats pel VIH que tenen la capacitat de mantenir nivells de càrrega viral indetectables en absència de tractament antiretroviral, anomenats controladors d'elit, representen un bon model patogènic per a una cura funcional del VIH. No obstant, la informació sobre els mecanismes exactes que es troben implicats en aquest control del VIH no estan completament descrits, els nous estudis suggereixen que el fenotip de controladors d'elit és molt heterogeni, en termes virològics, característiques immunològiques i fins i tot clíniques.

En l'escenari d'infecció pel VIH, les ciències òmiques ens ofereixen informació rellevant en el coneixement de les vies mecanicistes específiques implicades en el control viral persistent i el descobriment de biomarcadors potencials. Aquesta informació podria ajudar a definir una població de controladors d'elit amb més probabilitats de beneficiar-se de la intervenció a mesura que aprenem més sobre els determinants del control viral, la defensa immune i les característiques de la curació funcional.

Aquesta tesi es centra en l'estudi de diferents fenotips de controladors d'elit, com a model del control natural de la infecció pel VIH, i la identificació d'un perfil plasmàtic predictiu associat al control viral i/o immunològic, per identificar potents biomarcadors que ens permetin detectar ràpidament pèrdues futures de control natural en aquests individus. Tot i què és una població molt diversa i es troben molts factors implicats de forma simultània, els nostres resultats revelen perfils plasmàtics caracteritzats per biomolècules rellevants en l'immunometabolisme que ens permet discriminar entre els diferents fenotips de controladors d'elit.

ABREVIATURES

ADN: àcid desoxiribonucleic

ARN: àcid ribonucleic

CCR5: co-receptor de tipus 5

CD: cèl·lules dendrítiques

CE: controlador d'elit

ChE: èsters de colesterol

CMV: citomegalovirus

CP: controladors persistents

CT: controladors transitoris

CTL: limfòcits T citotòxics

CV: càrrega viral

CVD: malalties cardiovasculars o cardiovascular diseases

CXCR4: receptors de quimiocines tipus 4

HDL: lipoproteïnes d'alta densitat

HLA: antigen leucocitari humà

IFN-1: interferó de tipus I

IFN- α : interferó α

IFN- γ : interferó gamma

IL-15: interleucina 15

IL-2: interleucina 2

LDL: lipoproteïnes de baixa densitat

LTR: seqüències repetició terminal llarga

LTEC: long-term elite controllers

microRNA: miRNA

MIP-1 β : proteïna inflamatòria dels macròfags 1 beta

- NK: cèl·lules citocides naturals o natural killers
- OMS: Organització Mundial de la Salut
- PAMP: patrons moleculars associats a patògens
- PC: fosfatidilcolines
- PDC: cèl·lules dendrítiques plasmocitoides
- PRR: receptors de reconeixement de patògens
- RT: retrotranscriptasa o transcriptasa inversa
- SIDA: síndrome de la immunodeficiència adquirida
- TAR: tractament o teràpia antiretroviral
- TG: triglicèrids
- TLR: receptors immunitaris innats o toll-like receptor
- TNF- α : factor de necrosi tumoral α
- VHC: virus de l'hepatitis C
- VIH: virus de la immunodeficiència humana
- VLDL: lipoproteïnes de molt baixa densitat

I. JUSTIFICACIÓ DEL TREBALL

La teràpia amb agents antiretrovirals representa un dels grans avenços en el tractament del VIH, ja que aconsegueix controlar el virus a través de la repressió de la seva replicació, així com evitar la progressió de la malaltia. Tot i que el tractament antiretroviral actual és molt eficaç, ha millorat la salut, ha perllongat la vida dels pacients infectats i ha reduït les taxes de transmissió, no és curatiu. Per aquest motiu, actualment, un dels principals objectius en el món de la investigació en matèria de VIH és la recerca d'estratègies de tractament alternatives que potenciïn el sistema immunitari per tal d'assolir una cura funcional del VIH o remissió virològica persistent.

En aquest sentit, la identificació d'un grup de pacients infectats pel VIH que tenen l'extraordinària capacitat de mantenir nivells de càrrega viral indetectables en absència de tractament antiretroviral, anomenats controladors d'elit (CE), representen un model idoni per aprofundir en el coneixement dels mecanismes mitjançant els quals el sistema immunitari d'algunes persones és capaç de controlar el virus de manera espontània. L'estudi d'aquests mecanismes podria ser un punt clau per una atenció mèdica correcta i pel disseny de futures estratègies immunoterapèutiques utilitzant com a model el control natural persistent de la infecció pel VIH. No obstant, la justificació per utilitzar teràpia antiretroviral en aquesta població continua sent objecte de debat, i encara que diferents estudis van indicar una disminució dels marcadors d'activació immunitària després del tractament, els beneficis d'una teràpia antiretroviral sistemàtica segueixen sense estar clars.

Tanmateix, dins d'aquest grup de controladors d'elit, existeixen individus que experimenten una pèrdua de control virològica i/o immunològica amb una major progressió de la malaltia i els conseqüents esdeveniments de la síndrome de la immunodeficiència adquirida (SIDA). En aquest sentit, en els darrers anys, els diferents estudis han permès identificar marcadors biològics i mecanismes d'acció implicats en la replicació vírica i la immunodeficiència del VIH com ara factors de l'hoste, principalment l'antigen leucocitari humà (HLA), així com mecanismes immunològics, com ara la resposta específica de cèl·lules T contra el virus, anomenada polifuncionalitat. No obstant, la informació sobre el control natural a llarg termini del VIH continua sent escassa. Els nous estudis suggereixen que el fenotip de controladors d'elit és molt heterogeni, en termes virològics, característiques immunològiques i fins i tot clíniques, de manera que aquesta alta diversitat de paràmetres és una important limitació en l'estudi de biomarcadors específics.

En l'escenari d'infecció pel VIH, les ciències òmiques ofereixen un valor addicional a altres tècniques convencionals ja descrites i són una potent eina pel diagnòstic, el pronòstic i la predicció del risc de malalties. També ens ofereixen informació rellevant en el coneixement de les vies mecanicistes específiques implicades en el control viral persistent, el descobriment de biomarcadors potencials amb possible aplicació clínica i la caracterització de dianes immunoterapèutiques susceptibles per a una remissió viral a llarg termini. En estudis previs de l'immunometabolisme en CE es van descriure associacions entre perfils òmics específics i altres paràmetres de la funció immune amb el control espontani del VIH. Aquest treball és un compendi de dos articles publicats ^{1,2}, que es centren en la identificació d'un perfil òmic predictiu associat al control viral i/o immunològic persistent, amb l'estudi de potents biomarcadors per tal de comprendre els mecanismes implicats en el control natural del VIH estudiant dues cohorts diferents de controladors d'elit. El primer estudi que es presenta en aquesta tesi (Article 1)¹ caracteritza per primera vegada un perfil transcriptòmic amb marcadors predictius de molècules de microRNA plasmàtiques circulants, on es va mostrar una diferència consistent en l'expressió d'aquests abans de la pèrdua del control viral entre dos fenotips de controlador d'elit, controladors persistents (CP) i controladors transitoris (CT). Aquestes diferències en els patrons d'expressió de miRNA van persistir després de la pèrdua de control, demostrant una associació important entre el perfil de miRNA i la virèmia. D'altra banda, seguint el patró de les determinacions òmiques, ens vam centrar en avaluar els perfils metabòlics i lipídics d'una altra cohort de controladors d'elit (Article 2)², en aquest cas de controladors d'elit a llarg termini (LTEC). Els diferents fenotips estudiats, els controladors extrems (>10 anys de control) i controladors losing (pèrdua de control abans dels 5 anys), mostraven diferències en els perfils òmics. En particular, aquells controladors extrems mostraven un perfil metabòlic específic, amb nivells alts de metabòlits implicats en vies energètiques importants, els quals es van associar amb el control natural de la infecció pel VIH, mentre que els individus que perdien el control de forma espontània durant el seguiment, mostraven un increment d'un conjunt de lípids que no mostraven la resta d'individus.

En conjunt, els nostres estudis revelen perfils plasmàtics associats al control viral i/o immunològic que ens permet discriminar entre els diferents fenotips de controladors d'elit estudiats. Tot i què el mecanisme exacte que es troba implicat en aquest control natural del VIH no està completament descrit, atès que és una població molt diversa i es troben molts factors implicats en el control natural del VIH de forma simultània, la identificació de biomolècules rellevants en l'immunometabolisme ens seria d'utilitat per a trobar potents biomarcadors predictius de la progressió de la infecció.

II. INTRODUCCIÓ

II. INTRODUCCIÓ

1. Virus de la immunodeficiència humana (VIH)

El VIH continua sent un dels problemes més grans per a la salut pública mundial. La síndrome d'immunodeficiència adquirida (SIDA) es va reconèixer per primera vegada com una nova malaltia l'any 1981 quan un nombre creixent d'homes homosexuals joves van sucumbir a infeccions oportunistes inusuals i malalties malignes rares³. Des de la seva primera identificació, la forma pandèmica del VIH-1 ha infectat almenys 60 milions de persones i ha causat més de 25 milions de morts⁴. Tot i tractar-se d'una malaltia sense cura, els avenços en la prevenció, diagnòstic, tractament antiretroviral (TAR) i l'atenció de forma eficaç de les infeccions oportunistes, ha esdevingut què la infecció pel VIH sigui un problema de salut crònic tractable, que permet a les persones infectades portar una vida llarga i saludable (Organització Mundial de la Salut, OMS)⁵. No obstant, l'accés a la teràpia no és universal i les perspectives de tractaments curatius i d'una vacuna eficaç són incertes^{6,7}.

El virus de la immunodeficiència humana s'agrupa al gènere *Lentivirus* dins de la família dels *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae*. Segons les característiques genètiques i les diferències en els antígens virals, el VIH es classifica en els tipus 1 i 2 (VIH-1, VIH-2)⁸. Les anàlisis epidemiològiques i filogenètiques actualment disponibles impliquen que la seqüència del VIH-1 es va introduir a la població humana a partir de la dècada de 1920 a l'Àfrica Central (Kinshasa)⁹.

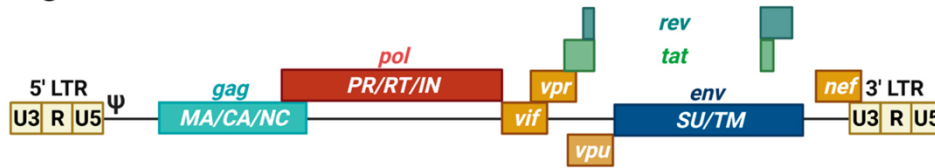
1.1. VIH: estructura i genoma

El genoma del VIH codifica un total de tres proteïnes estructurals, dues proteïnes d'embolcall, tres enzims i sis proteïnes accessòries. Estructuralment, el VIH té una forma aproximadament esfèrica amb un diàmetre de 80-100 nm, format per tres capes; 1) L'embolcall, una bicapa lipídica que conté 72 espícules, complexos proteics integrats a la membrana formats per proteïnes virals codificades pel gen *env*. Cada espiga està formada per una peça de la proteïna gp41, integrada a la membrana, i un cap exterior format per la proteïna gp120, essencial per acoblar-se amb l'exterior de determinades cèl·lules abans de la seva invasió; 2) la capa intermèdia, formada per la nucleocàpsida icosaèdrica, i 3) la capa interna, formada per ARN viral i nucleoproteïna (**Figura 1**).

Dins del nucli de la partícula del VIH es troben dues molècules d'ARN (àcid ribonucleic) monocatenàries idèntiques. A l'interior de la càpsida, a més de les dues còpies idèntiques de l'ARN viral, hi ha còpies de tres enzims necessaris per a la multiplicació del virus: una transcriptasa inversa, una integrasa i una proteasa. El genoma del provirus del VIH (DNA proviral), es genera per la transcripció inversa del genoma de l'ARN viral a l'ADN (àcid desoxiribonucleic), la degradació de l'ARN i la integració de l'ADN de doble cadena del VIH al genoma humà. El genoma d'ADN està flanquejat als dos extrems per seqüències LTR (repetició terminal llarga). La regió 5' LTR codifica el promotor de la transcripció dels gens virals. En la direcció 5' a 3' es llegeix el marc de lectura de les proteïnes estructurals codificades pels gens *gag*, *pol* i *env* (**Figura 1**). El gen *gag*, codifica les proteïnes de la membrana del nucli exterior (MA, p17), la proteïna de la càpsida (CA, p24), la nucleocàpsida (NC, p7) i una altra més petita, proteïna estabilitzadora d'àcids nucleics. El gen *gag* és seguit pel marc de lectura *pol* que codifica els enzims proteasa (PR, p12), transcriptasa inversa (RT, p51) i RNasa H (p15) o RT més RNasa H (juntament p66) i integrasa (IN, p32). Al costat del gen *pol*, segueix el gen *env* del qual es deriven les dues glicoproteïnes d'embolcall gp120 (proteïna de superfície, SU) i gp41 (proteïna transmembrana, TM).

A més de les proteïnes estructurals, el genoma del VIH en codifica diverses proteïnes reguladores. La proteïna *Tat* (transactivadora) és essencial per a la producció de nous virions, ja que promou activament l'activació de la transcripció. Existeix en dues formes, una llarga amb 101 residus d'aminoàcids de llargada, i una de més curta amb només 72. La proteïna *Rev* (RNA splicing-regulador), regula el transport controlant la velocitat d'exportació d'ARNm. Tan *Tat* com *Rev* són essencials per a l'inici de la replicació del VIH, l'acció sinèrgica d'ambdues augmenta molt l'expressió de les proteïnes virals. Altres proteïnes reguladores com *Nef* (factor regulador negatiu; disminueix l'expressió dels marcadors CD4 i MHCI), *Vif* (factor d'infectivitat viral; muntatge i maduració), *Vpr* (proteïna viral r; transport d'ADN al nucli) i *Vpu* (proteïna viral única; disminueix l'expressió de CD4 i afavoreix l'alliberament de virions) tenen un impacte en la replicació viral, la germinació del virus i la patogènesi.

HIV-1 genome



HIV-1 mature virion

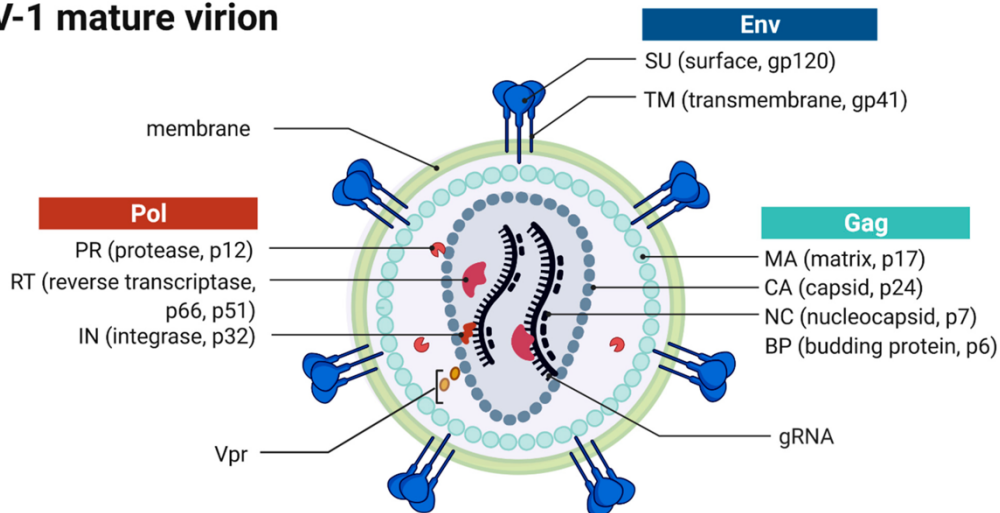


Figura 1. Esquema representatiu del genoma del VIH i estructura del virió. (Dalt) Visió general esquemàtica de l'organització genòmica del genoma del VIH-1 flanquejat als dos extrems per seqüències LTR, amb marc de lectura 5' a 3' que contenen el promotor viral i les seqüències necessàries per a la transcripció inversa, integració i expressió gènica, que codifiquen les diferents proteïnes estructurals, reguladores i accessoris. *Gag* codifica proteïnes estructurals de la matriu (MA), càpsida (CA) i nucleocàpsida (NC) que formen el nucli viral. *Pol* codifica per als enzims virals proteasa (PR), transcriptasa inversa (RT) i integrasa (IN). El gen *pol* és seguit pels dos gens reguladors *rev* i *tat* i tres gens accessoris *vif*, *vpr* i *vpu*. *Env* codifica les glicoproteïnes de l'embolcall viral: la unitat de superfície (SU) gp120 i la transmembrana unitat (TU) gp41. *Env* va seguit d'un altre gen accessori *nef*. **(Baix)** Representació esquemàtica de l'estructura d'una partícula viral infecciosa, de forma esfèrica i està embolcallat per una membrana de bicapa lipídica derivada de la cèl·lula hoste que conté 7-35 glicoproteïnes d'embolcall trímers. La capa interna de la membrana ancora les proteïnes MA derivades de *Gag* i també conté *Vpr* i PR. La càpsida es troba al centre del virió i conté les dues còpies del genoma d'ARN (gRNA), RT i IN. El gRNA està estabilitzat per les proteïnes de la nucleocàpsida. Imatge extreta de *van Heuvel. et al*¹⁰.

2. Patogènesi de la infecció

A causa de la gran activació del sistema immunitari després de la infecció, si no es rep tractament, els pacients experimenten una disminució del nombre de cèl·lules T CD4⁺, això es deu a una menor producció cel·lular per part de les cèl·lules mare o per una sobredestrucció d'aquestes. En absència de tractament antiretroviral, la resposta típica del pacient a la infecció pel VIH té tres fases principals: una infecció aguda inicial; un període llarg asimptomàtic o fase crònica; i finalment un augment de la càrrega viral amb un col·lapse simultani del recompte de cèl·lules T CD4⁺ sanes durant el qual apareix la SIDA (**Figura 2**).

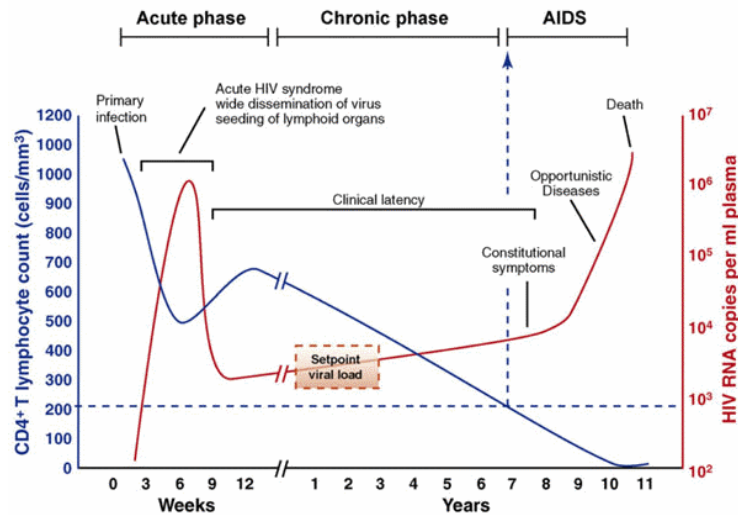


Figura 2. Evolució de la infecció pel VIH en individus infectats i sense tractament. La fase d'infecció primària es caracteritza per un augment de la càrrega viral plasmàtica i una disminució gradual de la població de cèl·lules T CD4⁺. Seguidament es produeix una resposta immune al VIH acompanyada d'una disminució de la virèmia i un llarg període de latència clínica. Durant la fase d'infecció crònica es produeix una reducció de les cèl·lules T CD4⁺ de forma lineal. Quan la població de limfòcits T CD4⁺ assoleix nivells per sota dels 200 cèl·lules/ μ l comença la fase SIDA. L'aparició de la SIDA s'associa amb un ràpid augment de la replicació viral i una evolució accelerada de la malaltia. L'esgotament del sistema immunitari comporta una major susceptibilitat a infeccions oportunistes que condueix al pacient fins a la mort. Imatge extreta de An, P. & Winkler, C. A. ¹¹.

2.1. Infecció aguda/primària

Sense tractament, la infecció pel VIH ha evolucionat en fases i empitjora amb el transcurs del temps. El VIH destrueix gradualment el sistema immune i, a la llarga, causa la síndrome d'immunodeficiència adquirida (SIDA). L'etapa d'infecció aguda o primària s'inicia quan el virus entra per primera vegada al cos i dura entre 3 a 4 setmanes, durant les quals estan presents tant l'ARN del VIH com l'antigen p24¹². La simptomatologia és semblant a la de la grip, com febre, mal de cap i erupció cutània. El virus arriba als ganglis limfàtics, on es replica activament i allibera noves partícules de virus al torrent sanguini. El VIH utilitza cèl·lules T CD4⁺ dins dels ganglis limfàtics per reproduir-se ràpidament, fent que aquests augmentin la seva mida amb noves cèl·lules i virus. Després de dues setmanes, els ganglis infectats estan tan plens que esclaten, propagant-se per tot el cos. Durant les properes setmanes, la càrrega viral augmenta a nivells molt alts (>10 milions de còpies/ml) i es manté elevada durant 10-12 setmanes després de la infecció¹², és per això que augmenta considerablement el risc de transmissió. L'etapa d'infecció aguda, per tant, és una fase clau que ens proporciona molta informació predictiva de la infecció per HIV.

L'intestí és un lloc clau de la infecció pel VIH i la patogènesi. La lesió epitelial i la pèrdua de cèl·lules T CD4⁺ al tracte gastrointestinal durant la infecció aguda poden provocar la difusió de productes microbians que alimenten l'activació immune¹³. La infecció aguda pel VIH provoca l'apoptosi i disfunció d'enteròcits, defectes en la reparació de la mucosa i un esgotament més precoç i massiu de les cèl·lules T CD4⁺ de la mucosa. Aquest esgotament de cèl·lules T es deu probablement a una combinació d'infecció viral directa, mort cel·lular induïda per l'activació i respostes citotòxiques derivades de l'hoste^{14,15}.

2.2. Infecció crònica

Tot i que el grau d'esgotament de les cèl·lules T CD4⁺ a l'intestí no s'ha relacionat amb el pronòstic de la malaltia per se, pot estar millorant indirectament l'activació immune en la infecció crònica pel VIH¹⁵. En aquest període asimptomàtic o latent, que també anomenem fase crònica, el pacient no presenta cap símptoma important de malaltia, tot i que el VIH està infectant contínuament noves cèl·lules i es reproduïx activament. Normalment, aquest període de latència oscil·la entre 7 i 10 anys, però, la progressió de la malaltia mostra una gran variabilitat entre individus^{16,17}.

Aquesta disminució de la població de cèl·lules T CD4⁺ pot afavorir l'aparició d'infeccions oportunistes que provoquen la mort dels pacients. Possiblement, un retard en el diagnòstic, l'edat avançada, una població CD4⁺ basal baixa, la coinfecció amb el virus de l'hepatitis C (VHC) o altres disfuncions en el sistema immunitari, podrien ser la causa d'aquesta incapacitat de recuperar-se immunològicament^{18,19}.

2.3. La SIDA

Després d'aquest període asimptomàtic, la càrrega viral augmenta ràpidament amb una caiguda simultània del recompte de cèl·lules T CD4⁺ (<200 cèl·lules/ml) o bé quan el sistema immunitari no pot combatre les infeccions que afecten l'organisme i aprofita la seva debilitat (malalties oportunistes). Aquesta etapa es pot donar per la falta de TAR o bé per una mala adherència al tractament¹⁶.

3. Controladors d'elit

La prevalença estimada dels controladors d'elit oscil·la entre el 0,15% i l'1% entre les persones que viuen amb el VIH. La majoria de les definicions classifiquen aquest 1%²⁰ com a controladors amb una mitjana d'ARN viral entre 43–903 còpies/ml i una mitjana de població de CD4⁺ major

de 500 cèl·lules/mm³. Els nivells mitjans d'ARN del VIH en plasma es mantenen baixos, encara que sovint poden ser detectables, confirmant la persistència de replicació viral. Els valors de CD4⁺ són alts, però amb una forta evidència de disminució per a totes les definicions. El percentatge mitjà de temps sense TAR com a CE va ser major o igual al 92%. Els CE són rars, tenen menys probabilitats de progressar cap a una malaltia clínica, però eventualment poden perdre el control viral i progressar, tant virològicament com clínicament, a condicions que defineixen la SIDA.

3.1. Definicions i criteris de controlador d'elit

La infecció pel VIH implica un procés ampli i dinàmic i varia en els diferents fenotips de les persones que viuen amb el VIH. Els nostres estudis de cohorts multicèntrics i prospectius inclouen diferents fenotips de pacients que viuen amb el VIH.

Diversos anys després del descobriment del VIH tipus 1 (VIH-1), es va identificar un petit subconjunt d'individus amb una rara capacitat de mantenir espontàniament una càrrega viral indetectable en absència de TAR. S'han aplicat diverses definicions a aquests individus, coneguts com a controladors d'elit (CE), que de manera natural mantenen la seva càrrega viral per sota del límit de detecció (<50 HIV-1-RNA còpies/ml), mantenint un control viral i/o immunològic durant llargs períodes de temps sense la necessitat de TAR. Un subconjunt similar d'individus infectats pel VIH anomenats controladors virèmics (VC) aconseguixen un menor grau de control virològic (entre 200-2000 còpies/ml), alhora que mantenen uns recomptes de cèl·lules T CD4⁺ elevats (normalment ≤500/μl), també en absència de TAR (**Figura 3**). Aquesta característica podria convertir aquests individus en un bon model patogènic per a una cura del VIH. No obstant, els CE comprenen una població heterogènia pel que fa a les característiques virològiques, immunològiques, i fins i tot clíniques.

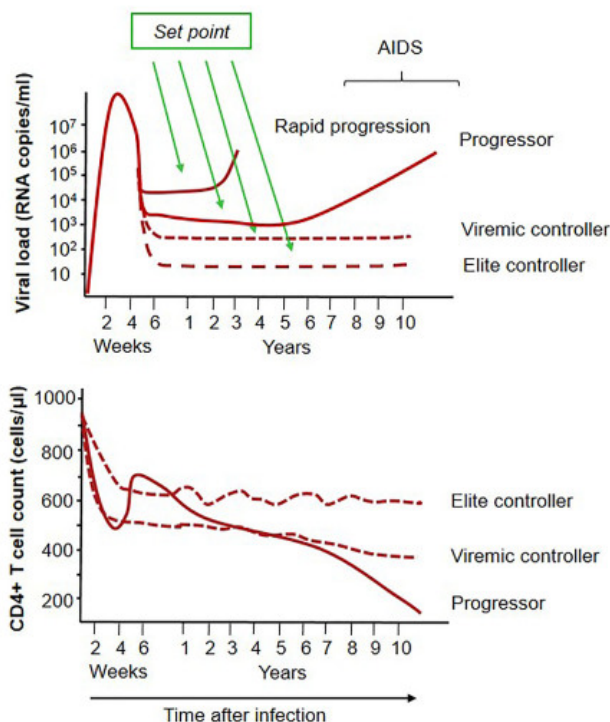


Figura 3. Progressió de la malaltia després de la infecció pel VIH-1 en progressors del VIH-1, CE i CV. (Dalt) Evolució de la càrrega viral (còpies d'ARN/ml) en els progressors en comparació amb els controladors (controladors virèmics i controladors d'elit). Els controladors tenen resultats més favorables en comparació amb la majoria de les persones infectades pel VIH que no tenen la capacitat d'aconseguir la supressió virològica en absència de TAR. **(Baix)** Els controladors es caracteritzen per la seva capacitat de mantenir un recompte elevat de limfòcits T CD4⁺ en absència de TAR. En canvi, en els progressors, a causa de la replicació viral implacable, hi ha una pèrdua inexorable de cèl·lules T CD4⁺ i un declivi del sistema immunitari, que finalment resulta en la síndrome d'immunodeficiència adquirida (SIDA). Imatge extreta de *Gonzalo-Gil et al.*²¹.

Utilitzant dades de CASCADE²², vam valorar una sèrie de definicions utilitzades habitualment per estimar la prevalença dels CE i els factors associats, la proporció del temps total de seguiment i els valors de cèl·lules T CD4⁺ i ARN del VIH. De manera general per definir aquest fenotip s'utilitzen definicions establertes pel International HIV Controller Consortium que estableixen els criteris següents²³: (1) determinacions serològiques positives de anticossos de VIH, (2) cap teràpia antiretroviral durant el període de 12 mesos anterior, i (3) almenys tres determinacions d'ARN del VIH en plasma que es prenen durant aquest període d'almenys 12 mesos, totes les quals han d'estar per sota del límit de detecció dels assajos clínics disponibles actualment (50 o 75 còpies d'ARN/ml). Entre les 10 definicions establertes (**Taula 1**), 3 són les que més s'utilitzen: 1) Definició E, utilitzada pel Consorci Internacional de Controladors del VIH, d'individus que mantenen els nivells d'ARN del VIH per sota de 75 còpies/mL durant almenys 1 any²⁴, 2) Definició F, una adaptació de la definició E que no permet nivells previs d'ARN del VIH >1000 còpies/ml²⁵, i 3) Definició J, proposada inicialment per la National Agency for AIDS Research (ANRS), de

individus coneguts per ser VIH positius durant més de 10 anys amb 2 o més mesures de l'ARN del VIH inferior a 400 còpies/ml²⁶. Alguns d'aquests individus han estat infectats des de fa més de 25 anys, mantenint el recompte de cèl·lules T CD4⁺ i càrrega virals persistents per sota dels límits de detecció. Altres han progressat posteriorment, per tant, un seguiment proper de grans cohorts pot permetre definir els paràmetres associats al control seguit de la pèrdua de control.

Taula 1. 10 definicions de controladors d'elit en la literatura aplicada al conjunt de dades CASCADE. Tots els individus requereixen estar en absència de tractament antiretroviral i sense simptomatologia de SIDA. Informació obtinguda de la base de dades CASCADE²².

Definició de controlador d'elit

A	VIH ⁺ ≥ 6 mesos amb ≥2 mesures consecutives d'ARN <75 còpies/ml ²⁷
B	VIH ⁺ ≥ 1 any amb ≥1 mesures d'ARN <50 còpies/ml ²⁸
C	VIH ⁺ ≥ 1 any amb ≥1 mesures d'ARN <75 còpies/ml ²⁹
D	VIH ⁺ ≥ 1 any amb ≥3 mesures d'ARN <2000 còpies/ml ³⁰
E	VIH ⁺ ≥ 1 any amb ≥3 mesures consecutives d'ARN <75 còpies/ml en ≥ 12 mesos ²⁵
F	VIH ⁺ ≥1 any amb ≥3 mesures consecutives d'ARN <75 còpies/ml en ≥ 12 mesos, sense cap rebot viral ≥ 1000 còpies/ml ²⁶
G	VIH ⁺ ≥ 2 anys amb ≥2 mesures d'ARN <75 còpies/ml ³¹
H	VIH ⁺ ≥ 5 anys amb ≥5 mesures consecutives d'ARN <500 còpies/ml ³²
I	VIH ⁺ ≥ 10 anys amb tot el ARN mesurat <50 còpies/ml ³³
J	VIH ⁺ ≥ 10 anys amb ≥ 90% d'ARN (≥ 2 ARN del VIH total) <400 còpies/ml ³⁴

3.2. Fenotips de controladors d'elit

Finalment, diversos d'aquests mecanismes també han servit per diferenciar diferents fenotips dins de la població de controladors d'elit; els que anomenem controladors persistents (CP), controladors transitoris (CT) i controladors d'elit a llarg termini (long-term elite controllers; LTEC). Els controladors persistents tenen respostes ràpides de cèl·lules T específiques del VIH, associades a una baixa diversitat i variabilitat genètica viral en comparació amb els controladors transitoris. Concretament, l'absència de pujades de càrrega viral espontània o "blips virals"³⁵, nivells més baixos de quimiocines inflamatòries plasmàtiques^{36,37}, nivells més baixos d'ADN proviral cel·lular^{35,38}, menor diversitat viral^{36,37} i una resposta cel·lular^{36,38} en absència de virus competent per a la replicació³⁷. De la mateixa manera, els controladors persistents, mostren nivells més baixos d'inflamació sistèmica, a diferència dels controladors transitoris que es defineixen com a individus que experimenten un pèrdua espontània del control viral durant el seguiment (2 mesures de càrrega viral per sobre del límit de detecció en 12 mesos) (**Figura 4**).

Per altra banda, un dels fenotip de control del VIH més estrictes són els controladors d'elit a llarg termini, un subgrup heterogeni i molt reduït de CE amb control viral i un estat immunològic estable durant més de 10 anys. Pel que fa la seva definició, es van identificar en estudis de cohorts a causa de l'absència de condicions relacionades amb la SIDA, sense tractament antiretroviral, amb nivells de cèl·lules T CD4⁺ superiors a 500 cèl·lules, sense símptomes clínics durant més de 10 anys de seguiment amb una càrrega viral per sota de les 50 còpies/ml³⁹. Entre aquest fenotip també es poden diferenciar altres tipus de controladors d'elit a llarg termini; aquells que mantenen el control viral i immunològic durant tot el seu seguiment (controladors extrem) i d'altres que durant la seva trajectòria d'estudi perden el control viral i/o immunològic (controladors losing) (Figura 4).

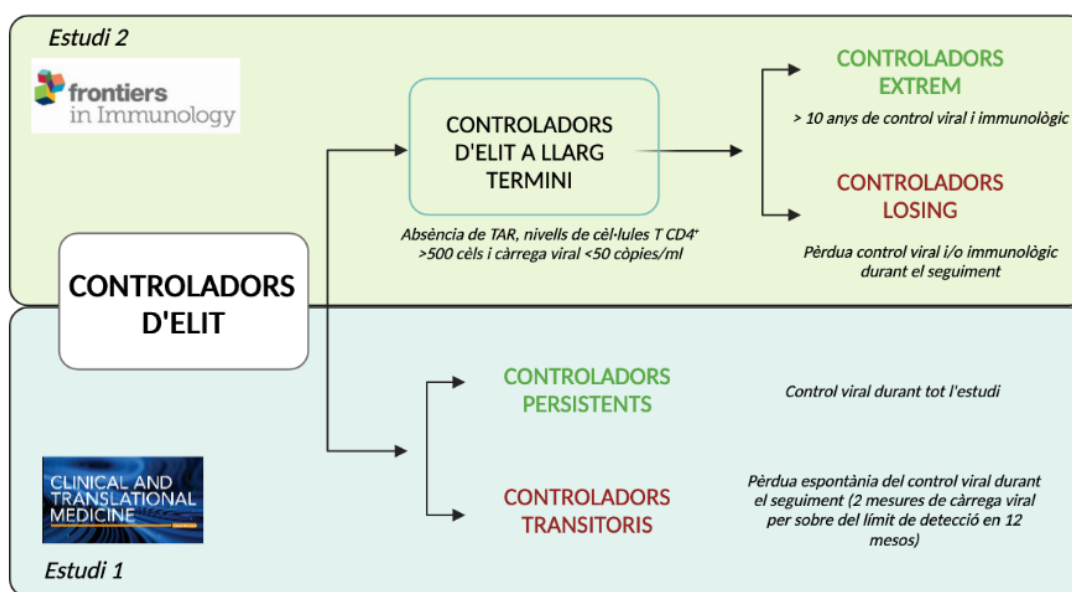


Figura 4. Diagrama de flux que il·lustra les dues cohorts en els dissenys d'estudi. (Dalt) En l'estudi 2, es treballa amb una cohort de controladors d'elit a llarg termini, un subgrup heterogeni i molt reduït de CE amb control viral i un estat immunològic estable durant més de 10 anys. Aquests es subdivideixen en controladors extrem i controladors "losing" en funció del control viral i/o immunològic durant el seu seguiment d'estudi. **(Baix)** En l'estudi 1, els controladors d'elit es subdivideixen en controladors persistents i controladors transitoris en funció del control viral durant 24 mesos, amb determinacions abans de la pèrdua del control viral com a condició prèvia i mesures després de la pèrdua del control viral, condició posterior. Imatge pròpia, creada amb BioRender.com.

4. Factors associats al control persistent del VIH

Els mecanismes darrera d'aquest control viral encara no estan clars, tot i que es creu que alguns dels factors que intervenen en la caracterització d'aquests pacients són factors genètics de l'hoste, inclosa la resposta immune específica de les cèl·lules T CD4⁺ i CD8⁺⁴⁰, així com les

molècules HLA de classe I⁴¹. Aquestes són predictives del curs de la infecció pel VIH-1 amb una major prevalença per a certs al·lels HLA-B, com el HLA-B*27, B*57 i B*14, que predominen entre els controladors i estan associades amb el control virològic⁴². Alguns estudis van determinar que les cèl·lules T CD8⁺ d'aquest individu eren qualitativament superiors en comparació amb les dels progressors de la malaltia. Això es va atribuir a la seva polifuncionalitat, caracteritzada per un procés eficient de desgranulació i alliberament de perforina i granzim B, a més de la secreció de citocines com són l'interferó gamma (IFN- γ), el TNF- α , la interleucina 2 (IL-2) i la proteïna inflamatori dels macròfags (MIP-1 β). A més, el perfil funcional de les cèl·lules T CD8⁺ específic del VIH-1 en progressors era limitat en comparació amb el dels no progressors^{43,44}.

4.1. Factors epidemiològics

No s'han definit els factors epidemiològics associats al control del VIH *in vivo*. Els individus que acaben convertint-se en controladors d'elit semblen tenir menys probabilitats de tenir una infecció primària simptomàtica que aquelles destinades a romandre virèmiques⁴⁵, fet que suggereix que les interaccions entre virus i hoste que condueixen a un control natural i permanent de la replicació viral ja estan en joc durant les primeres fases de la malaltia del VIH⁴⁶.

La via d'infecció així com el gènere no són factors limitants en el controladors d'elit⁴⁷. Tanmateix, els nivells d'ARN en plasma són més baixos en les dones que en els homes independentment de tots els altres factors⁴⁸. L'impacte potencial de la raça, la ubicació geogràfica i/o el subtipus viral en els resultats immunològics i virològics segueix sent desconegut, tot i que s'han identificat controladors en múltiples ètnies i amb diferents subtipus de virus³⁴.

4.2. Factors d'atenuació viral

Diversos estudis i informes de casos han argumentat que les mutacions o supressions dins dels gens funcionals i accessoris del VIH (*rev*, *tat*, *vif*, *vpr* i *vpu*) poden conduir al control del virus i/o a la no progressió virològica i immunològica. Específicament, es va avaluar un grup d'individus infectats per transfusió de sang d'un donant comú els quals contenien una supressió en el gen *nef* i que mantenien una virèmia baixa durant anys⁴⁹. No obstant, molts d'aquests individus estudiats van progressar a la SIDA, suggerint que l'atenuació viral del gen *nef* no condueix específicament a aquest control permanent⁵⁰.

La interpretació de la majoria dels estudis sobre l'atenuació viral és difícil perquè generalment inclouen un nombre reduït de pacients, impliquen l'anàlisi de seqüències virals amplificades en lloc de l'aïllament del VIH competent per a la replicació. S'ha demostrat que és difícil aïllar virus

competents per a la replicació dels controladors del VIH degut als nivells plasmàtics de càrrega viral tan reduïts en aquests individus o a la presència de virus atenuats. La cinètica de replicació viral en els controladors del VIH era normal *in vitro* i sense cap inserció genètica de delecions, fet que suggereix que els factors hoste tenen un paper important en el control viral natural^{51,52}.

4.3. Factors de l'hoste

Com hem introduït anteriorment, el factor hoste més rellevant associat amb el control del virus és la presència de certs al·lels HLA de classe I, especialment al·lels HLA B⁵³. HLA-B5701 i, en menor mesura, HLA-B27 estan fortament enriquits entre les cohorts nord-americanes i europees de controladors del VIH en comparació amb els no controladors^{26,54,55}, mentre que el subtipus HLA-B5703 es troba en major mesura entre les poblacions africanes capaces de mantenir càrregues virals baixes⁵⁶. El paper mecanicista de HLA-B5701 en el control del VIH segueix sent una qüestió oberta, però, perquè (1) HLA-B5701 està en fort desequilibri d'enllaç amb el gen HCP5, que pot estar encara més fortament associat amb control, encara que no es coneix el mecanisme d'aquesta associació⁵⁷, (2) Les mutacions d'escapament seleccionades per HLA-B5701 no estan necessàriament associades amb el rebot viral⁵⁴, (3) molts individus positius per HLA-B5701 amb càrregues virals elevades no tenen proves clares de mutacions d'escapament de cèl·lules T⁵⁸ i (4) la molècula HLA-B5701 interacciona directament amb certs receptors assassins de tipus immunoglobulina, cosa que suggereix un component genètic mediat per la resposta immune innata⁵⁹.

A més dels factors genètics que influeixen en les respostes immunitàries específiques del VIH, els polimorfismes genètics de l'hoste que afecten la capacitat del VIH d'entrar a les cèl·lules podrien tenir efectes moduladors importants sobre el control viral. L'homozigotat per a una supressió de 32 parells de bases dins del gen que codifica CCR5, un coreceptor per a l'entrada del VIH a les cèl·lules CD4, protegeix fortament contra l'adquisició del VIH, mentre que l'heterozigotat per a l'al·lel *CCR5Δ32* s'associa amb una progressió retardada cap a la SIDA⁶⁰. Tot i que l'expressió de CCR5 té un paper clar i central en la patogènesi del VIH, només és part d'una història complexa que també implica l'expressió de lligands del receptor de quimiocines. CCL3L1 és un gen que codifica MIP-1 α , el lligand hoste supressor de CCR5. Com més gran sigui el nombre de còpies del gen CCL3L1, menor serà la càrrega viral⁶¹, per tant dins dels controladors del VIH predomina l'absència relativa del genotip CCR5-CCL3L1 combinat.

Dades recents indiquen que el mecanisme pel qual aquestes característiques genètiques protegeixen de la progressió de la malaltia és multifactorial i implica una entrada viral

restringida, una immunitat mediada per cèl·lules preservada i potser altres mecanismes⁶². Altres receptors de quimiocines i/o lligands del receptor de quimiocines (per exemple, SDF-1) també poden estar associats de manera causal amb el control⁶³, tot i que això no s'ha provat encara entre els controladors del VIH.

En els darrers anys, s'han identificat una sèrie de factors intrínsecs de l'hoste intracel·lular que perjudiquen la replicació del VIH, però encara està per determinar si aquests tenen un paper en limitar la replicació del virus en els controladors. Un d'ells és APOBEC3G, un enzim cel·lular que pertany a la família de les citidines desaminases, amb un paper important en la immunitat antiviral. Aquesta funció antiviral principalment es dona amb una restricció potent de la replicació del VIH⁶⁴ a causa de la hipermutació massiva dG → dA en llocs claus "hot spots" del nou ADN viral durant la transcripció inversa. El VIH eludeix aquest sistema de defensa de l'hoste mitjançant l'acció de la seva proteïna accessòria *vif*, que pot provocar una degradació accelerada de l'enzim APOBEC3G^{65,66}. Un altre mediador de la resistència antiviral cel·lular innata és Trim 5α, que s'ha demostrat que modula la infecció en un model de mico de la SIDA abans del pas inicial de la transcripció inversa⁶⁷. No està clar si la variabilitat genètica d'aquests o d'altres factors de restricció de l'hoste que encara no s'han definit poden modular el control del VIH en humans.

5. La importància de la immunitat innata en el control natural del VIH

La infecció aguda pel VIH s'associa amb una destrucció ràpida i potser irreversible de l'extensa població de cèl·lules T CD4⁺ que resideix al teixit limfoide associat a l'intestí⁶⁸, on la meitat o més de les cèl·lules T CD4⁺ residents a l'intestí es perden en les primeres setmanes d'infecció^{69,70}. Aquesta pèrdua de la integritat de la mucosa provoca un deteriorament de la immunitat cel·lular local i una translocació crònica de productes microbians que contribueixen a una inflamació persistent⁷¹. Tots aquests esdeveniments es produeixen abans que es generi una resposta adaptativa de cèl·lules T i, per tant, la resposta immune de l'hoste probablement estigui mediada per la resposta immune innata⁷².

D'acord amb una sèrie recent d'estudis genètics de l'hoste, es va trobar que els individus que co-expressen KIR3DS1 (un receptor regulador a la superfície de les cèl·lules NK) i una família d'al·lels HLA-Bw4-08I capaços d'unir-se a KIR3DS1 i activar les cèl·lules assassines o natural killers (NK) tenen nivells de càrrega viral més baixos i menys risc de progressió de la malaltia^{73,74}. En el àmbit dels individus controladors l'efecte de l'al·lel de HLA-B57 sobre la càrrega viral

va ser encara més gran quan s'expressa en el context d'alts nivells de KIR3DL1, un inhibidor de KIR, suggerint que la resposta immune innata té un paper important en el resultat de la malaltia. L'al·lel HLA-B57 pertany a la família d'al·lells de Bw4, lligand natural de KIR3DL1. En condicions normals, l'expressió de HLA-B57 impediria que les cèl·lules NK lisiin aquestes cèl·lules durant la immunovigilància. Quan una cèl·lula s'infecta comportaria una baixada de HLA-B57 i la pèrdua del senyal inhibidor de NK mediat per KIR3DL1, produint la lisi de les cèl·lules infectades. Aquest mecanisme proporciona una explicació potencial de per què les persones que expressen HLA-B57, com són els controladors d'elit, tenen una progressió de la malaltia menys simptomàtica⁷⁵, on les cèl·lules NK limiten la virèmia inicial i condueixen a un millor estalvi de cèl·lules T CD4⁺ en els teixits⁵⁹.

No obstant, es necessiten dades funcionals sobre la contribució potencial de la immunitat innata al control viral inicial. Recentment s'ha demostrat que els polimorfismes del receptor 9 de tipus toll (TLR), importants en la mediació de les respostes immunitàries innates contra els patrons d'ADN comuns en virus i bacteris, afecten el curs clínic de la malaltia, cosa que suggereix a més un vincle entre el sistema immunitari innat i la patogènesi de la malaltia⁷⁶. Un altre component important del sistema immunitari innat són les cèl·lules dendrítiques plasmocitoides (PDC), que produeixen interferons de tipus I, com per exemple l'interferó- α (IFN- α), en resposta a infeccions víriques. El VIH, que estimula aquestes cèl·lules mitjançant receptors de tipus toll⁷⁷, provoca una disminució ràpida i sostinguda del nombre de PDC circulants⁷⁸, ja que pot infectar-les directament⁷⁹. Els nivells de cèl·lules PDC són més alts en els que no progressen clínicament a llarg termini en comparació amb els progressors, suggerint que aquestes cèl·lules poden protegir contra la progressió de la malaltia, tot i que és possible que la seva presència sigui simplement una conseqüència de baixes quantitats de la replicació viral⁸⁰.

5.1. L'eficàcia antiviral de les cèl·lules T CD8⁺

L'estudi de la resposta *in vitro* per limfòcits T citotòxics (CTL) ha demostrat que en els pacients seropositius existeix una expansió clonal de limfòcits CD8⁺ amb activitat citotòxica. Coincidint amb la disminució de la virèmia després de la infecció aguda pel VIH, hi ha un augment de les cèl·lules T CD8⁺ específiques del VIH capaces de matar directament les cèl·lules infectades. Això, a més de l'associació entre determinades molècules HLA de classe I el control del virus, han contribuït a la suposició que la immunitat efectiva de les cèl·lules T CD8⁺ específica del VIH es troba associada a múltiples mecanismes amb efecte antiviral, com la lisi de cèl·lules infectades i el bloqueig de la propagació de la infecció⁸¹, essent un factor dominant en la contenció del VIH, tot i que el mecanisme no s'ha definit. No obstant, no hi ha una associació clara entre el nombre

de cèl·lules T CD8⁺ específiques del VIH i el control viral ^{82,83}, la funció d'aquestes cèl·lules és clarament més elevada en els controladors del VIH en comparació amb els no controladors. Dins d'aquestes funcions s'inclou la capacitat de proliferar en trobar-se amb antígens del VIH ⁸⁴, la capacitat de produir la proteïna citolítica perforina ⁸⁴ i la capacitat de produir factors solubles com són les citoquines, que poden mediar aquest efecte antiviral bloquejant l'entrada del virus a les cèl·lules, entre les quals podem destacar l'interferó gamma (IFN- γ), proteïna inflamatòria de macròfags 1 beta (MIP-1 β), factor de necrosi tumoral alfa (TNF- α), interleucina 2 (IL-2) i/o CD107a) ^{43,85}.

Estudis més recents mostren que es pot utilitzar un assaig de "neutralització" del virus per avaluar el potencial antiviral de les cèl·lules T CD8⁺ directament d'una manera comparable a la mesurada amb les respostes d'anticossos. En comparació amb els no controladors, els controladors del VIH de cèl·lules T CD8⁺ acabades d'aïllar tenien capacitats més altes per inhibir la replicació del VIH en cèl·lules T CD4⁺ autòlogues infectades ⁸⁶. Conjuntament, aquests resultats argumenten que les respostes de les cèl·lules T CD8⁺ dirigides al VIH estan relacionades amb el control viral complet o gairebé complet en almenys alguns controladors del VIH.

L'eficàcia antiviral de les cèl·lules T CD8⁺ present als controladors del VIH pot derivar de la capacitat de certes molècules HLA com B57 de presentar un ampli nombre de pèptids del VIH per al reconeixement de cèl·lules T, la capacitat d'aquestes molècules de generar respostes de cèl·lules T CD8⁺ d'alta magnitud ^{75,87} i/o la capacitat d'aquestes molècules d'orientar preferentment proteïnes altament conservades ^{46,75}. Pel que fa a aquesta darrera preocupació, la quantitat de virèmia plasmàtica en la infecció crònica està associada inversament amb l'amplitud de la resposta específica de *gag* i directament associada amb l'amplitud de la resposta específica d'*env* ⁵⁶. Aquestes associacions oposades amb el control viral es poden explicar per l'impacte relatiu de les mutacions seleccionades per la immunitat en l'aptitud viral. Les mutacions dins de *gag* poden tenir una probabilitat més alta d'induir un defecte d'aptitud, mentre que les mutacions dins de la proteïna *env* molt variable i flexible poden tenir menys probabilitats de provocar un deteriorament substancial del creixement. Això es va il·lustrar bé entre una cohort d'individus amb HLA-B5701, on es va demostrar que les mutacions dins d'un epítop de pèptid p24 *gag* altament conservat presentat per aquest al·lel redueixen la capacitat de replicació *in vitro* ⁸⁸ però no necessàriament condueixen a un rebot virològic *in vivo* ⁵⁴. Quan es transmeten a individus no HLA-B57, aquestes mutacions d'escapament reverteixen ràpidament ⁸⁹, proporcionant una forta evidència que aquestes mutacions redueixen l'aptitud viral *in vivo*.

Alternativament, l'efecte antiviral millorat observat per a les respostes de cèl·lules T CD8⁺ específiques de *gag* pot tenir a veure amb la presentació anterior dels epítops de *gag* a les cèl·lules infectades. Com que la proteïna *gag* s'introdueix al citoplasma durant l'entrada viral inicial, es pot processar i presentar immediatament a CTL. Com a resultat, el CTL específic de *gag* pot reconèixer les cèl·lules infectades dins de les 4 hores posteriors a la infecció, mentre que les respostes específiques *d'env* no estan actives fins a les 24 hores, a causa de la necessitat de síntesi de proteïnes *de novo* per a aquesta última⁹⁰.

En resum, aquests estudis proporcionen dades sòlides que suggereixen que les cèl·lules T CD8⁺ específiques del VIH poden conduir en alguns pacients a una inhibició molt eficient de la replicació viral. Tanmateix, no està clar si aquesta resposta és suficient o fins i tot necessària.

5.2. Resposta de cèl·lules T CD4⁺ específiques en el control viral

Un control adicional que modula el factor hoste seria les cèl·lules T CD4⁺, necessàries per al manteniment a llarg termini de les cèl·lules T de memòria CD8⁺ específiques d'antigen^{91,92}. La resposta cel·lular específica no es limita als limfòcits CD8⁺; s'ha demostrat una resposta CD4⁺ específica probablement sigui important per a l'activació d'una resposta immune eficaç davant del VIH i és especialment intensa en pacients en estadi de primera infecció.

El VIH és essencialment una infecció del sistema immunitari, amb l'objectiu principal la destrucció de les cèl·lules T CD4⁺^{69,70,93}. Es creu que la pèrdua de cèl·lules T CD4⁺ crítiques per establir respostes immunitàries adaptatives efectives és una de les principals raons per les quals els humans no són capaços de controlar amb èxit el VIH, suggerint el paper important de les cèl·lules T CD4⁺ funcionals específiques de l'antigen són realment necessàries per mantenir la capacitat de les cèl·lules T CD8⁺ i així controlar la replicació viral⁹⁴.

En una cohort de 30 controladors del VIH a San Francisco, la proporció de cèl·lules T CD4⁺ específiques del VIH que expressen IFN- γ i IL-2 va ser la correlació més consistent de control⁹⁵. Altres tendències similars es van observar en un grup de controladors virològics relatius (ARN<1000 còpies/ml)⁹⁶, en una cohort de no progressors (definida en funció de la població de cèl·lules T CD4⁺)⁹⁷ i en controladors d'elit⁹⁸. La molècula immunoreguladora inhibidora CTLA-4 es troba més expressada en les cèl·lules T CD4⁺ específiques del VIH en tots els individus infectats però no en els controladors del VIH, suggerint que la molècula CTLA-4 podria ser un marcador específic de cèl·lules T CD4⁺ associat al control viral⁹⁹. L'expressió d'aquest receptor pot disminuir la capacitat de les cèl·lules T CD4⁺ per proliferar en resposta als pèptids del VIH o a l'antigen p24, una funció que es manté en els controladors a llarg termini¹⁰⁰⁻¹⁰³. Tanmateix, una

proporció substancial dels controladors del VIH, gairebé el 50%, no tenen activitat mesurable de cèl·lules T CD4⁺ específiques del VIH, tal com determina la producció de citocines¹⁰⁴. Això indica de nou que altres mecanismes a part de la immunitat de les cèl·lules T contribueixen a un control natural del VIH.

6. Els controladors d'elit com a model de cura funcional

6.1. Tipus de cures del VIH

Existeixen dos tipus de cures per al VIH, la cura funcional que no elimina el virus però manté el control a llarg termini sense tractament, i la cura esterilitzant que permet l'eliminació completa dels provirus competents per a la replicació. S'espera que els estudis sobre controladors del VIH proporcionin pistes importants per al desenvolupament de teràpies o estratègies per a la curació funcional del VIH, com la estratègia del "Shock and Kill", que elimina el reservori latent del virus, així com vacunes terapèutiques i la teràpia de transferència gènica mediada per vectors^{105,106}.

6.2. Estratègies de cura funcional

L'expressió de "cura funcional" és contradictòria i s'utilitza de manera inconsistent en una àmplia gamma d'iniciatives de recerca destinades a curar el VIH, no obstant, s'utilitza amb més freqüència per referir-se al control persistent de la infecció a llarg termini sense TAR, és a dir, restaurar la capacitat del sistema immunitari de combatre la infecció¹⁰⁷. El concepte de cura funcional ha sorgit en els darrers 2 anys com a sostenibilitat a llarg termini de les teràpies antiretrovirals essencials, tot i què, es requereix el desenvolupament d'opcions de tractament més ambicioses.

S'utilitza la teràpia de transferència gènica mediada per vectors per aconseguir una cura funcional, ja que les vacunes profilàctiques existents contra el VIH no estimulen el sistema immunitari per generar anticossos neutralitzants (bNAbs). S'administren vectors gènics, anomenats immunoprofilaxis vectorials (VIP) per aconseguir l'expressió a llarg termini dels anticossos neutralitzants. El virus adenoassociat (AAV) és el vector més comú, fet que la seva seguretat i eficiència de l'expressió gènica s'han verificat completament^{108,109}. Els resultats d'aquest estudi van mostrar que gairebé la meitat dels ratolins presentaven una càrrega viral suprimida després de la retirada de TAR. Tanmateix, es va provar l'administració d'un altre anticòs neutralitzant (3BNC117), on una única injecció va donar lloc a una protecció a llarg termini (13 setmanes) en virus de la immunodeficiència humana en macacs (SHIV)¹¹⁰, on la

infusió de 3BNC117 podria millorar significativament les respostes neutralitzants als virus heteròlegs, cosa que suggereix que la immunoteràpia mediada per aquest anticòs neutralitzant millora la immunitat humoral de l'hoste contra el VIH¹¹⁰⁻¹¹³.

Tot i que es produeixen mutacions d'escapament durant el tractament amb anticossos neutralitzants, aquests estudis demostren que l'estratègia de "trasplantament de gens" dels bNAbs podria convertir-se en un substitut acceptable del TAR^{110,114}. El trasplantament de gens consisteix a introduir múltiples bNAbs existents al cos al mateix temps o bé trobar i utilitzar súper bNAbs dirigits a tots els genotips i mutants per superar la diversitat de soques i mutacions. Aquesta última opció és més ideal però alhora és difícil trobar els súper bNAb que puguin evitar la mutació d'escapament i neutralitzar tots els aïllats de VIH, obstacle clau per a la prevenció i la cura funcional del VIH¹¹⁰.

6.3. Estratègies de cura esterilitzant

El famós "pacient de Berlín" representa un cas d'èxit de cura esterilitzant. Timothy Brown, l'anomenat pacient de Berlín¹¹⁵, positiu tant per al VIH com per a la leucèmia mieloide aguda (AML), va utilitzar teràpia cel·lular amb dos trasplantament de cèl·lules mare hematopoètiques al·logèniques (allo-HSCT) d'un donant homozigot per a la mutació CCR5delta32 (*CCR5Δ32*). La cèl·lula mare de la mutació *CCR5Δ32* és un tipus de cèl·lula amb deficiència de CCR5, que fa que les cèl·lules siguin altament resistents a la infecció pel VIH. Vuit anys més tard, sembla estar lliure tant del VIH com de la LMA. El Pacient de Londres¹¹⁶, també va rebre trasplantament de donants amb una mutació homozigota de *CCR5Δ32*¹¹⁵. No obstant, dos altres pacients, el pacient de Boston¹¹⁷ i el pacient de Minnesota¹¹⁸, van experimentar un rebrot de virèmia després de rebre el mateix transplament d'allo-HSCT en absència de *CCR5Δ32*. Aquestes estudis realment confirmen que *CCR5Δ32* té un paper crític en la supressió o erradicació viral. Tot i això, l'homozigositat per a *CCR5Δ32* no confereix resistència absoluta al VIH, individus amb el genotip *CCR5Δ32/Δ32* també estan infectades per virus X4 o R5X4^{119,120}. Durant les últimes dècades, s'ha desenvolupat una teràpia gènica amb cèl·lules mare hematopoètiques dirigida a l'edició del genoma o la supressió de CXCR4, ja que les mateixes teràpies gèniques que s'han aplicat a l'edició de CCR5 també es poden utilitzar per a CXCR4.

Tanmateix, s'estan desenvolupant altres estratègies per dur a terme una cura esterilitzant eficaç del VIH, com ara l'edició del genoma, la teràpia gènica i l'estratègia del "Shock and Kill". Des d'aquesta perspectiva, la cura funcional és tan important com la cura esterilitzadora¹²¹.

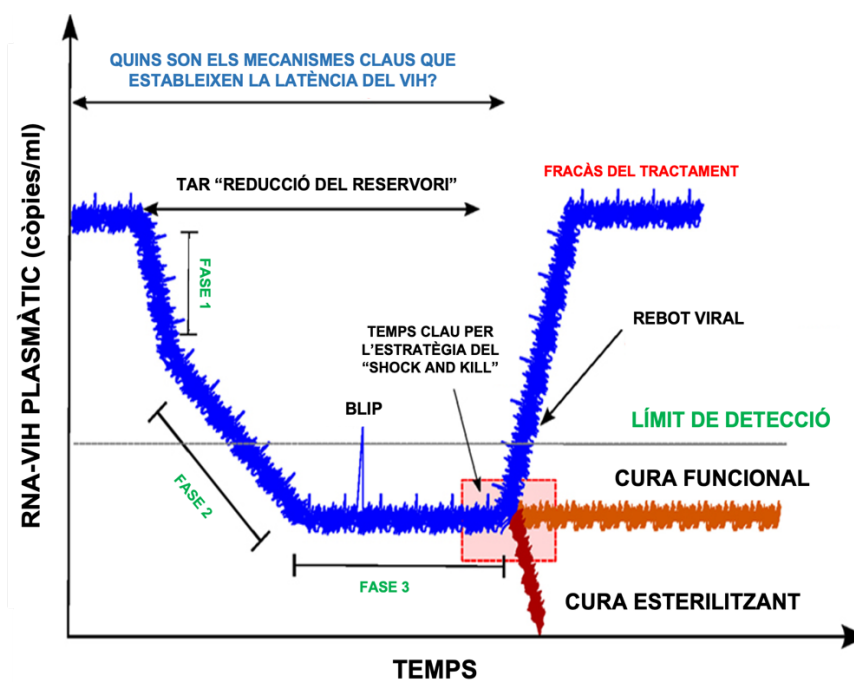


Figura 5. Estratègies cap a una cura del VIH. El VIH passa per tres fases després de l'inici del TAR. La primera fase descriu la ràpida desintegració de cèl·lules infectades productivament, per exemple, les cèl·lules T CD4⁺ activades. La segona fase està dirigida per cèl·lules que no estan completament identificades però possiblement són macròfags i cèl·lules dendrítiques. La tercera fase és un nivell baix però estable de virèmia residual que dona una fase d'altiplà, que conté episodis virèmics ocasionals (anomenats blips). Aquesta tercera fase s'ha atribuït a reservoris a llarg termini mantinguts per l'activació de cèl·lules T CD4⁺ infectades latentment. Recentment, s'ha plantejat la hipòtesi que l'adaptació d'una estratègia d'eliminació de puntades després de la cessació del TAR podria conduir a una cura esterilitzant o una cura funcional, és a dir, aconseguir una virèmia controlada per sota de la detecció. Aquesta figura és una modificació de la referència de *van Lint et al.*¹²².

6.4. Estratègia "Shock and Kill"

Un component important per a HSCT és l'enfocament conegut com a "Shock and Kill" dirigit al reservori latent del VIH. Aquesta estratègia consisteix a reactivar i erradicar els virions infecciosos dins i fora de la cèl·lula, però també eliminar el gen del provirus amagat a les cèl·lules infectades i als reservoris latents. El primer pas d'aquest procés requereix utilitzar agents de reversió de latència (LRA) que indueixen l'expressió del virus del VIH latent¹²³. Amb l'ús de fàrmacs clínics, s'han aconseguit bons resultats pel virus fora de la cèl·lula. No obstant això, una veritable cura del VIH només resultarà de l'eliminació de les cèl·lules latents del VIH (silencioses o no productives) després de la integració dels genomes del VIH. Aquestes cèl·lules presenten poca diferència amb les cèl·lules normals, cosa que fa que siguin difícils de descobrir i erradicar. Tanmateix, els provirus del VIH a les cèl·lules latents es poden reactivar en determinades condicions, donant lloc a un rebrot viral després de la retirada del fàrmac¹²⁴. És important destacar que les cèl·lules latents tenen una vida mitjana llarga *in vivo* (44 mesos aprox) i fins i tot en els pacients hospitalitzats, es requereix un període de 73 anys per eliminar completament

les cèl·lules latents¹²⁵. L'estratègia del "Shock and Kill"¹²⁶, activa les cèl·lules latents i després utilitza fàrmacs existents contra el VIH per inhibir la nova generació de virus infecciosos pel VIH. Es requereixen dos tipus de fàrmacs: un "agent de xoc" per activar les cèl·lules del VIH latents, i un altre "agent de matança", que bloqueja l'activació del virus latent i protegeix les cèl·lules de formar una nova latència¹²¹.

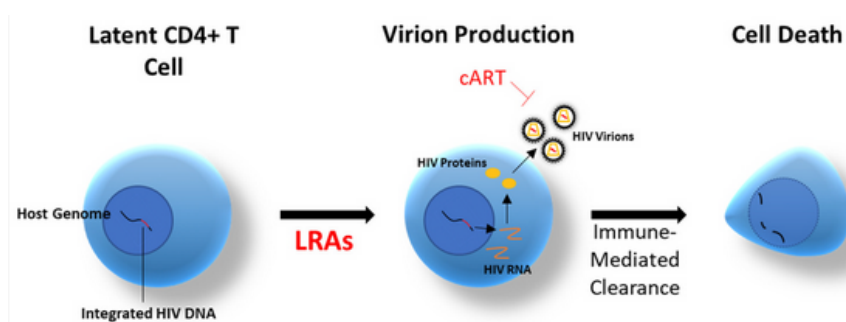


Figura 6. L'estratègia "Shock and Kill" utilitza agents de reversió de latència (LRA) per a l'eliminació immune. Reactivació funcional del VIH-1 per part dels LRA a les cèl·lules T CD4⁺ latents diana que permet que siguin eliminats per efectors immunitaris com els limfòcits T citotòxics o per danys citopàtics induïts pel virus. Imatge extreta de *Weichseldorfer et al.* ¹²⁷.

6.5. Teràpia antiretroviral combinada

A diferència dels controladors espontanis del VIH, un estudi de l'any 2013 va analitzar 14 controladors posteriors al tractament del VIH (PTC) amb remissió virològica a llarg termini durant almenys 24 mesos després de la interrupció de la teràpia antiretroviral combinada (cTAR), la qual van iniciar a les 10 setmanes posteriors a una infecció primària pel VIH¹²⁸. La majoria dels PTC no presentaven al·lels protectors com són el HLA-B*27 o B*57, però sí al·lels associats al risc desfavorables HLA-B*35 i HLA-B*07 ^{128,129}. Una anàlisi posterior va demostrar que l'inici del cTAR aviat en aquests individus presentava una distribució baixa del reservori en les cèl·lules T CD4⁺ en repòs, així com petits reservoris del VIH, elements crítics per al control de la infecció amb èxit fora de la teràpia ¹²⁸. No obstant, després de la interrupció del cTAR, el manteniment del reservori d'ADN del VIH baix era poc probable¹³⁰. És raonable creure que un període més llarg amb cART, com es va veure amb el pacient de Londres, pot controlar eficaçment la replicació del virus i, per tant, mantenir una mida de reservori viral molt baixa fins que es creï un sistema immunitari funcional resistent al VIH mitjançant el trasplantament amb HSC homozigots per la mutació *CCR5Δ32*¹²³.

6.6. El disseny d'una vacuna contra el VIH

A part de les estratègies curatives introduïdes anteriorment, les vacunes terapèutiques s'han dissenyat contínuament, essencialment perquè entrenar el sistema immunitari amb vacunes és

més barat i eficient que qualsevol altre medicament o tractament. Les vies de disseny comuns de vacunes terapèutiques se centren en com activar el sistema immunitari de manera eficaç, millorant la seva identificació i erradicació de les cèl·lules infectades pel VIH.

L'esperança d'una vacuna contra el VIH va sorgir per l'èxit de l'assaig de la vacuna tailandesa¹³¹. El desenvolupament de la vacuna contra el VIH mitjançant anticossos neutralitzants és de gran rellevància, fet que alguns assajos van suggerir que els anticossos capaços de neutralitzar el virus estan presents *in vivo* en alguns no progressors a llarg termini¹³². No obstant, nous estudis que avaluen la capacitat del sèrum per neutralitzar virus autòlegs i heteròlegs, indiquen que els anticossos neutralitzants són rars en persones que mantenen càrregues virals baixes en absència de teràpia^{98,133}. Sorprenentment, els anticossos neutralitzants estan gairebé absents en els controladors d'elit^{52,134}, però, els anticossos contra totes les proteïnes del VIH encara són detectables. Les seqüències N-terminals de la proteïna *env* del VIH gp41, estan molt conservades i s'ha vist que els controladors del VIH tenen petits bucles variables i pocs enllaços de N-glicans en aquesta seqüència, els quals suggereixen una limitació d'unió dels anticossos neutralitzants *in vivo*⁵². En els darrers anys, els experiments de vacuna basats en *Tat* com a immunogen van assolir la fase II d'assaigs clínics¹³⁵, una proteïna essencial que regula la replicació viral i l'activació del reservori latent.

El desenvolupament de vacunes terapèutiques per a una cura funcional del VIH s'ha enfrontat a grans reptes durant els darrers 10 anys amb dificultats per generar anticossos efectius específics del VIH. Tot i que alguns estudis argumenten que la immunitat humoral no és un mecanisme important en el control permanent del VIH en absència de teràpia¹³⁶, l'avenç del desenvolupament d'una cura funcional del VIH sembla més ràpid i eficaç que el d'una cura esterilitzadora del VIH¹²¹. No es pot excloure definitivament que els anticossos podrien haver contribuït al control inicial de la producció de virus en controladors d'elit, però el control persistent del VIH no sembla estar mediat per una resposta humoral robusta. Aquestes observacions són coherents amb el consens immunològic que els alts nivells d'anticossos reflecteixen la replicació sostinguda del virus¹³⁶.

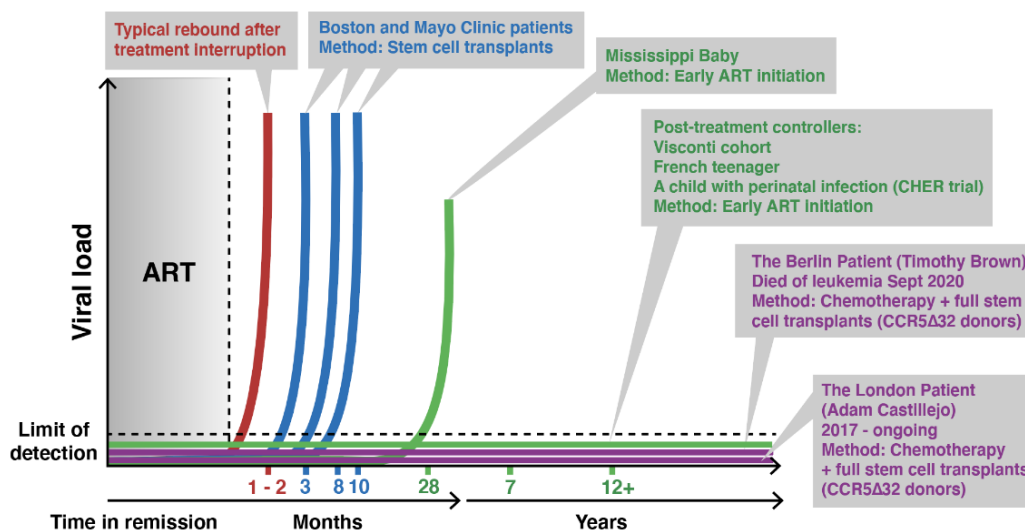


Figura 7. Casos de remissió viral al llarg del temps (fins al 2017). Imatge extreta de Valente, S. ¹³⁷.

7. Teràpia antiretroviral en controladors d'elit: una gran controvèrsia

En l'actualitat encara falten dades clíniques i estudis addicionals per avaluar l'eficàcia del TAR per prevenir la progressió o altres comorbiditats que no defineixen la SIDA en els controladors, continua sent controvertida la pregunta de si aquests individus realment necessiten rebre TAR o no i si aquest s'associa amb un benefici clínic demostrable en aquest entorn. Segons les directrius de tractament dels EUA esmenten que "Hi ha una clara justificació teòrica per prescriure TAR als controladors del VIH, fins i tot en absència de nivells detectables d'ARN del VIH en plasma"¹³⁸. De fet, és important mantenir un control d'aquests individus ja que com hem vist anteriorment, alguns controladors d'elit poden experimentar una disminució de cèl·lules CD4⁺, la pèrdua de control viral o complicacions relacionades amb la infecció pel VIH en algun moment de la seva trajectòria.

El VIH indueix una resposta inflamatòria forta i sostinguda, amb fins a un 80% de les cèl·lules T CD8⁺ en la infecció crònica pel VIH que expressen marcadors de superfície cel·lular associats a l'activació de cèl·lules T. Tot i que el component específic del VIH d'aquesta resposta inflamatòria pot ser beneficiós, gran part de la resposta inflamatòria inespecífica no dirigida al VIH, és perjudicial. Les cèl·lules T CD4⁺ activades serveixen com a objectiu principal del VIH i, per tant, poden accelerar la progressió de la malaltia del VIH simplement millorant la capacitat del virus de replicar-se. Potser el més important és que l'activació crònica de cèl·lules T inespecífiques condueix a la mort de les cèl·lules T CD4⁺, conduint a l'esgotament final del potencial regeneratiu del sistema immunitari ¹³⁹⁻¹⁴¹. El paper central de l'activació de cèl·lules T en la patogènesi de la

malaltia del VIH s'il·lustra pel fet que un petit percentatge (<10%) dels controladors del VIH presenten una pèrdua progressiva de cèl·lules T CD4⁺; aquesta pèrdua es produeix malgrat no tenir una replicació viral detectable i s'associa amb una activació de cèl·lules T CD8⁺ marcadament elevada²³. No obstant, el grau d'activació de les cèl·lules T és menor en els controladors que en els no controladors, però superior al que s'observa en individus no infectats pel VIH i superior al observat en pacients tractats amb TAR ^{23,95}. El mecanisme d'aquesta activació anormalment elevada de cèl·lules T en controladors del VIH és probablement multifactorial i inclou quantitats baixes de replicació del VIH, estimulació crònica i expansió de les respostes de cèl·lules T específiques del VIH i/o la presència d'altres coinfeccions, com per exemple citomegalovirus (CMV). Un estudi recent va postular que el deteriorament de la mucosa gastrointestinal mediat pel VIH provoca la translocació microbiana crònica i l'activació tant del sistema immunitari innat com adaptatiu. Les quantitats de lipopolisacàrids (endotoxina LPS), un important marcador de translocació bacteriana gastrointestinal, també són més altes en els controladors del VIH i es correlacionen amb l'activació de cèl·lules T ²³.

En comparació amb els no controladors, els controladors del VIH tenen graus molt més baixos d'activació de cèl·lules T mentre que, al mateix temps, tenen un nombre molt més elevat de cèl·lules T específiques del VIH ⁹⁵. Aquesta resposta equilibrada en què l'hoste respon adequadament a un antigen prevalent però alhora relativament quiescent pot ser un punt clau en el control virològic ¹⁴². D'acord amb aquesta hipòtesi, les cèl·lules T CD8⁺ específiques del VIH dels controladors expressen grans quantitats de HLA-DR (un presumpte marcador d'activació) i sovint estan molt diferenciades, fins i tot quan la població general de cèl·lules T CD8⁺ no té proves d'activació i/o diferenciació ^{86,95,143}. PD-1, una molècula de la superfície cel·lular que marca les cèl·lules T "esgotades", generalment està més regulada tant en CD8⁺ com en CD4⁺ ¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ de persones infectades pel VIH, però estan molt disminuïdes entre els controladors del VIH ¹⁴⁷.

Donats els efectes nocius d'una resposta inflamatòria persistent crònica amb un predomini de malalties cardiovasculars (CVD)¹⁴⁸, el sistema immunitari humà fa tot el possible per mantenir l'harmonia immunològica. Per aquest motiu, les cèl·lules reguladores T (Treg), un subconjunt de cèl·lules T CD4⁺, supprimeixen l'activació local de les cèl·lules T mitjançant mecanismes directes i indirectes ¹⁴⁹. No obstant, el paper de les cèl·lules Treg en la immunopatogènesi de la malaltia del VIH continua essent contradictori. Alguns han argumentat que aquestes cèl·lules eviten o supprimeixen una resposta immune eficaç i, per tant, són perjudicials, mentre que altres justifiquen que aquestes cèl·lules eviten l'activació immune crònica i, per tant, són beneficioses.

L'únic treball publicat centrat en el paper de les cèl·lules Treg en els no progressors va trobar que una absència relativa d'aquestes cèl·lules al teixit limfoide estava associada amb un control virològic durador ¹⁵⁰, un efecte que aparentment va ser mediat per potents respostes de cèl·lules T específiques del VIH.

A més del TAR, altres agents que posseeixen efectes antiinflamatoris i activitat cardioprotectora poden tenir un paper clau, ja que com s'ha dit anteriorment una de les preocupacions clíniques és l'estat inflamatori crònic i l'activació immune associada amb un risc de malaltia CVD en els controladors d'elit ⁴⁴.

8. Estudi dels mecanismes de control persistent del VIH mitjançant ciències òmiques

L'accés a conjunts de dades òmiques a gran escala ha revolucionat la biologia i ha donat lloc a l'aparició d'enfocaments de sistemes per avançar en la nostra comprensió dels processos biològics. Amb la disminució del temps i el cost per generar aquests conjunts de dades, la integració de dades òmiques ha creat moltes oportunitats en la investigació. Diversos estudis suggereixen que la infecció pel VIH pot afectar vies metabòliques i regular les respostes innates i adaptatives de l'hoste¹⁵¹. La implementació de les ciències òmiques pot ser essencial per a entendre els mecanismes implicats en el control de la infecció i aconseguir una remissió viral a llarg termini o noves estratègies de cura del VIH¹⁵². Es per això que la identificació de petites molècules, des de metabòlits, proteïnes fins a lípids, podria proporcionar coneixements en el mecanisme implicat en el control viral i immunològic persistent del VIH. Per això, el paper de les ciències òmiques és de gran utilitat en l'estudi dels fenotips de controladors d'elit. En les darreres dècades, l'avenç tecnològic ha permès l'estudi a gran escala de molts gens, proteïnes i metabòlits, permetent la creació de la genòmica, la transcriptòmica, la proteòmica i la metabolòmica. Fins ara, ens hem beneficiat d'aquestes ciències per a la creació de biomarcadors que s'associen o prediuen un procés biològic, ja sigui normal o que comporta una malaltia ¹⁵³ **(Figura 8)**.

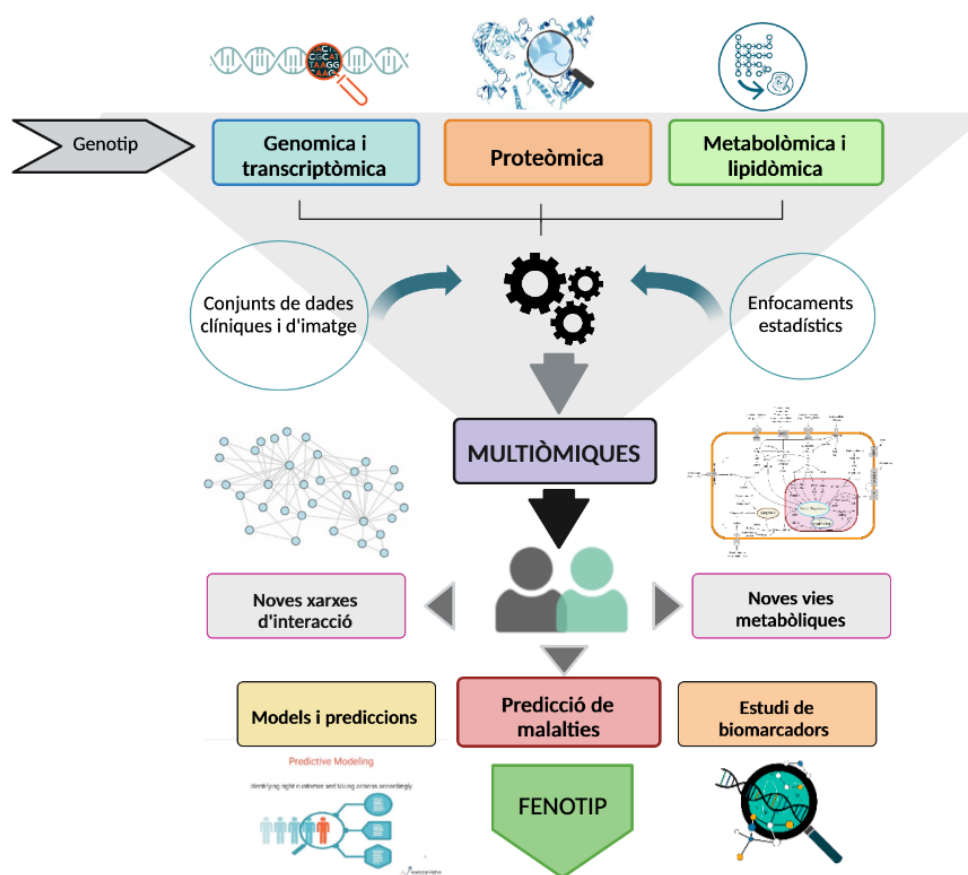


Figura 8. Flux de treball de les ciències òmiques i les seves aplicacions. Flux de treball de tècniques òmiques que mostra conjunts de dades d'entrada, conjunts de dades de sortida i resultats. Utilitzant conjunts de dades òmiques individuals més properes al genotip (genòmica i transcriptòmica) i més properes al fenotip (proteòmica i metabolòmica), a més d'altres plataformes òmiques, els conjunts de dades s'integren mitjançant enfocaments estadístics. Els resultats poden ser vies simples o xarxes complexes i poden incloure molècules conegudes i noves. A més, els resultats poden predir estats de salut o malaltia, proporcionar informació per a intervencions terapèutiques efectives o revelar la regulació espai-temporal de sistemes com l'especificitat de tipus cel·lular, de teixit o d'òrgan. Adaptada i creada amb *BioRender.com*¹⁵⁴.

8.1. Genòmica i transcriptòmica i el seu impacte funcional

La genòmica i la transcriptòmica s'han aplicat a diversos aspectes de la investigació i aplicacions clíniques que van des de la indústria farmacèutica, diagnòstic i terapèutica, aplicacions de teràpia gènica, farmacogenòmica i prevenció de malalties, fins a biologia del desenvolupament, genòmica evolutiva i genòmica comparada¹⁵⁴. El progrés de les tecnologies analítiques genòmiques ha millorat les nostres possibilitats d'obtenir informació sobre l'ADN, l'ARN i els seus canvis dinàmics que es produeixen al llarg del temps, des de la identificació de l'estructura de les proteïnes i els àcids nucleics i els mecanismes d'expressió gènica. L'augment dels avenços de les tecnologies de seqüenciació de nova generació (NGS) i el progrés en l'anàlisi de dades genòmiques han donat lloc a la generació de dades d'alt rendiment per als genomes (polimorfismes de nucleòtids únics (SNP), variants de nombre de còpies (CNV), pèrdua de

variants d'heterozigositat, genòmica reordenaments i variants rares, epigenomes (metilació de l'ADN, modificacions d'histones, accessibilitat de la cromatina, unió del factor de transcripció (TF)) i transcriptomes (expressió gènica, splicing alternatiu, ARN llargs no codificants i ARN petits com els microARN)¹⁵⁵. La transcriptòmica, ha revolucionat aquest concepte biològic central, un terme col·lectiu que descriu tots els ARN produïts per una sola cèl·lula i les seves diferents subcategories per identificar els canvis en l'expressió i el seu impacte funcional¹⁵⁶. Múltiples estudis han intentat establir els mecanismes específics implicats en la pèrdua espontània de control en els CE, des de factors virals associats a la pèrdua de control immunològic i viral fins a factors hoste que augmenten la probabilitat de progressió immunològica^{36,157,158}. En anàlisis del transcriptoma de cèl·lules immunitàries d'individus infectats pel VIH¹⁵⁹ han descrit que la infecció pel VIH provoca canvis en l'expressió dels gens que juguen un paper important en la divisió cel·lular, la transcripció, la traducció i l'assemblatge del virus. Aquests estudis també han identificat gens cel·lulars implicats en la permissivitat i la resistència a la infecció, la replicació viral i la desintegració de les cèl·lules T CD4⁺^{160,161}. De la mateixa manera, també s'han descrit associacions a tot el genoma amb l'estudi de perfils d'expressió específics de microRNA (miRNA), petites molècules d'oligoribonucleòtids no codificants amb una estructura monocatenària de 19-25 nucleòtids creades per les transcripcions d'ARN polimerasa II^{162,163}. Els miRNA tenen un paper vital en el desenvolupament, l'apoptosi i l'oncogènesi interferint amb l'expressió gènica a nivell post-transcripcional¹⁶⁴. La característica més rellevant dels miRNA en la infecció per VIH és que alguns poden modular la seva replicació dirigint-se directament a l'ARN viral o bé a l'ARN missatger dels factors cel·lulars necessaris¹⁶⁵. És per això que pot arribar a influir fortament en el perfil de miRNA plasmàtic descrivint patrons específics que diferencien entre controladors i progressors virals (PV). Curiosament, els nostres resultats van confirmar diferències en l'expressió d'alguns d'aquests miRNA, abans i després de la pèrdua de control viral, amb llocs diana situats a regions d'ARN viral que codifiquen proteïnes accessòries virals, inclús podrien arribar a disminuir directament la replicació del VIH en més d'un 40%¹⁶⁶, suggerint el concepte emergent que el perfil de miRNA plasmàtic en els CE podria actuar com a mecanisme de defensa antiviral afectant directament passos importants durant la infecció pel VIH i també jugant un paper clau en la patogènesi immune del VIH¹.

8.2. La proteòmica en la patogènesi del VIH

En l'escenari d'infecció pel VIH, la proteòmica ha sorgit per identificar proteïnes implicades en la patogènesi del virus en diversos models de malaltia del VIH¹⁶⁷. Un millor comprensió de les interaccions entre el virus i les proteïnes humanes pot servir com a punt de partida per a una

anàlisi funcional posterior¹⁶⁸. La proteòmica implica les aplicacions de tecnologies per a la identificació i quantificació del contingut global de proteïnes presents d'una cèl·lula, teixit o organisme. Els desenvolupaments recents en espectrometria de masses han augmentat dràsticament la sensibilitat alhora que redueixen la quantitat de mostra necessària per a anàlisis d'alt rendiment i ara permeten la detecció de diferències mínimes en l'abundància de proteïnes, la identificació de modificacions posteriors a la traducció i altres aplicacions d'una àmplia gamma de mostres i teixits¹⁶⁹. Complementa les altres tecnologies òmiques com la genòmica i la transcriptòmica per exposar la identitat de les proteïnes d'un organisme i per conèixer l'estructura i les funcions d'una proteïna particular. Les tecnologies basades en la proteòmica s'utilitzen amb diverses capacitats per a diferents entorns de recerca, com ara la detecció de diversos marcadors de diagnòstic, candidats a la producció de vacunes, la comprensió dels mecanismes de patogenicitat, l'alteració dels patrons d'expressió en resposta a diferents senyals i la interpretació de les vies de proteïnes funcionals en diferents malalties¹⁷⁰.

El perfil proteòmic plasmàtic associat a la progressió virològica es va descriure en una cohort de controladors d'elit. En concret es va caracteritzar una signatura proteòmica principalment amb proteïnes implicades en les vies proinflamatòries en els individus que anaven a perdre el control natural del VIH ¹⁵⁸ (controladors transitoris), suggerint que aquestes proteïnes podrien ser considerades biomarcadors potencials per detectar ràpidament pèrdues futures de control natural. Aquesta és la primera anàlisi extensa del perfil proteòmic plasmàtic en CE amb diferent evolució de càrrega viral, que permet diferenciar els fenotips de controladors d'elit. Entre les proteïnes major expressades en els controladors transitoris es pot destacar aquelles implicades en la patogènesi del VIH-1, en l'assemblatge viral i la transmissió cèl·lula a cèl·lula^{158,167,168}.

8.3. Metabolòmica i lipidòmica: biomarcadors en l'immunometabolisme

Els metabòlits solen ser productes finals de complexes cascades bioquímiques que poden vincular el genoma, el transcriptoma i el proteoma amb el fenotip, proporcionant una eina clau important per al descobriment de la base genètica de la variació metabòlica. La metabolòmica es pot utilitzar per determinar quantitats relatives i absolutes de sucres, lípids, aminoàcids, àcids orgànics, nucleòtids, esteroides, fàrmacs i components ambientals d'una àmplia gamma de tipus de mostres¹⁵⁴. L'anàlisi del metaboloma (metabolòmica), la col·lecció d'entitats químiques de molècules petites implicades en el metabolisme, s'ha estudiat tradicionalment amb l'objectiu d'identificar biomarcadors en el diagnòstic i predicció de malalties. Tanmateix, la metabolòmica s'ha redefinit des d'una simple eina d'identificació de biomarcadors fins a una tecnologia per al descobriment de motors actius dels processos biològics¹⁷¹. Ara està clar que el metaboloma

afecta la fisiologia cel·lular mitjançant la modulació d'altres nivells òmics, inclosos el genoma, l'epigenoma, el transcriptoma i el proteoma. L'estudi de l'immunometabolisme en els controladors d'elit va descriure fortes associacions entre metabòlits, nivells de lípids i paràmetres importants de la funció immune associats amb el control espontani del VIH¹⁵⁷. Algunes vies metabòliques importants com són la glucòlisi, el cicle del TCA, el metabolisme dels àcids grassos (FAO) i el metabolisme dels aminoàcids (glutaminòlisi) es troben relacionades amb el control viral i immunològic persistent del VIH¹⁷². Estudis anteriors han demostrat que totes aquestes vies estan dirigides durant la infecció viral, caracteritzada per una alta demanda d'energia¹⁷³, una disminució dels nivells de metabòlits circulants com la glucosa i un augment del perfil dels intermedis glicolítics (glicerol 3P, piruvat, etc.) en cèl·lules T CD4⁺ infectades pel VIH¹⁷⁴.

Els lípids són una classe important de biomolècules que estan implicades en molts processos cel·lulars vitals, des de components principals de les membranes biològiques, l'emmagatzematge de l'energia excedent per al seu posterior consum, fins a la seva implicació en processos de senyalització extra i intracel·lulars, on transdueixen senyals i amplifiquen les cascades reguladores¹⁷⁵. És per això que dins de la metabolòmica neix la lipidòmica, la ciència de la determinació a gran escala d'espècies de lípids individuals. Resultats actuals en una cohort de controladors d'elit a llarg termini (LTEC) mostren un perfil lipidòmic poc expressat en el fenotip de controladors extrems (més de 10 anys de control natural) que suggereix una important associació entre l'augment de les concentracions relatives d'espècies lipídiques i la pèrdua espontània de control viral i/o immunològic². De fet, el processament i el transport dels lípids es veuen afectats pels processos inflamatoris, i moltes espècies de lípids contribueixen a la inflamació i l'activació immune i són essencials durant la diferenciació de cèl·lules T i les respostes immunitàries de les cèl·lules T CD8⁺. No obstant, la relació entre el perfil lipidòmic i l'estat inflamatori és complexa¹⁷⁶. Entre les concentracions plasmàtiques relatives augmentades d'espècies de lípids que es trobaven en el grup de controladors d'elit a llarg termini que perdien el control durant el seu seguiment, es van trobar triglicèrids (TG), fosfatidilcolines (PC) i èsters de colesterol (EC). Cal destacar que estudis anteriors suggereixen un augment de les concentracions de TG durant la infecció pel VIH^{177,178}, mentre que la fosfatidilcolina activa indirectament la cascada de senyalització de TNF- α ¹⁷⁹ i actua com a contribuent proinflamatori a la persistència del VIH. Aquests resultats argumenten que un augment de la concentració relativa del perfil lipídic en el grup de pèrdua de LTEC podria estar associat a un entorn inflamatori sostingut que al seu torn seria molt beneficiós per a la replicació del VIH.

A més s'ha descrit que el TAR s'associa amb canvis en la distribució del greix (és a dir, lipodistròfia i dislipèmia) i anomalies metabòliques a causa dels efectes secundaris ¹⁸⁰, relacionades amb la síndrome metabòlica. Aquests estudis es centren en els nivells de lípids en sang convencionals, com són els triglicèrids i el colesterol total. En particular, la infecció pel VIH ha estat descrit recentment associat amb un risc 1,5 vegades més gran de síndrome metabòlica en comparació amb el població general ¹⁸¹. No obstant, les avaluacions de lípids convencionals realitzades de forma rutinària a les clíniques poden no avaluar adequadament les perturbacions en els perfils lipídics generals o informar de forma poc suficient sobre el risc cardiovascular en persones VIH⁺ ¹⁸². Les alteracions en la composició i la mida de les partícules lipídiques tendeixen a correlacionar-se més fortament amb el risc de malalties cardiovasculars. Les partícules HDL i LDL són de mida heterogènia; La lipoproteïna HDL té un paper cardioprotector ¹⁸³, mentre que les partícules petites i denses de LDL s'associen amb un augment de la presentació clínica i subclínica de CVD ^{184,185}. En un estudi que examinava persones VIH⁺ tractades amb TAR amb panells de lípids tradicionals benignes, aquestes persones en realitat tenien perfils de lípids proaterogènics amb nombres elevats de partícules LDL petites i nivells baixos de partícules grans de HDL i una capacitat d'efluència de colesterol deteriorada ¹⁸⁶.

Així, aquestes proteïnes, metabòlits i/o espècies lipídiques descrites podrien ser considerats biomarcadors potencials per detectar ràpidament pèrdues futures de control natural així com per descobrir possibles dianes de fàrmacs als CE per aconseguir un control persistent. No obstant, s'ha de tenir en compte heterogeneïtat substancial en aquest conjunt d'individus, pel que fa als resultats virològics, immunològics i clínics. Per tant, l'aplicació del coneixement sobre les òmiques a la clínica es podrà utilitzar per fer un diagnòstic, pronòstic i predicció del risc de la malaltia, on el descobriment de nous biomarcadors en la infecció per VIH ens permeten la detecció precisa de nombrosos canvis metabòlics en mostres biològiques^{187,188}. Aquesta informació podria ajudar a definir una població de CE amb més probabilitats de beneficiar-se de la intervenció a mesura que aprenem més sobre els determinants del control virològic, la defensa immune i les característiques de la curació funcional o fins i tot l'erradicació del VIH¹⁸⁹.

III. HIPÒTESI I OBJECTIUS

III. HIPÒTESI I OBJEUS

Els pacients infectats pel VIH mostren taxes variables de progressió de la malaltia i control viral. Mentre que la majoria dels individus infectats pel VIH mostren una replicació viral persistent amb la conseqüent disminució de cèl·lules T CD4⁺, una minoria de pacients manté un control viral espontani i un sistema immunitari estable durant anys. Aquest subconjunt de pacients representa al voltant de l'1% de tots els pacients infectats pel VIH i se'ls coneix com a controladors d'elit (CE). La naturalesa detallada dels mecanismes associats amb el control natural o els que dicten si un individu esdevé un CE o un pacient "progressor" de la malaltia segueix sent en gran part desconegut. Per aquest motiu, en la present proposta es planteja que l'estudi d'individus de diferents fenotips de controladors d'elit, com a model del control natural persistent de la infecció pel VIH, ens proporciona una visió inestimable de la infecció i ens ajuda a descobrir vies específiques implicades en control viral. Per a dur a terme el nostre objectiu s'utilitza un enfocament òmic en el descobriment de biomarcadors potencials i la caracterització de dianes immunoterapèutiques susceptibles per tal de desenvolupar la cura funcional del VIH esperada i desitjada a llarg termini.

Objectius:

1. Establir biomarcadors predictius en el control viral i immunològic de la infecció per VIH mitjançant la utilització de les ciències òmiques.
2. Identificar el perfil plasmàtic transcriptòmic associat a la progressió virològica que condueix a la pèrdua viral espontània en controladors d'elit transitoris.
3. Caracteritzar el perfil metabolòmic i lipídòmic subjacent al fenotip de controlador d'elit a llarg termini per entendre els mecanismes que funcionen en el control viral i/o immunològic persistent.
4. Augmentar el nostre coneixement actual de les vies mecanicistes implicades en el control viral i/o immunològic en els controladors d'elit.

Les publicacions resultats de les investigacions i experiments realitzats sobre la caracterització òmica dels diferents fenotips de controladors d'elit seran la base que constituiran la present tesi doctoral:

- ***“Differential miRNA plasma profiles associated with the spontaneous loss of HIV-1 control: miR-199a-3p and its potential role as a biomarker for quick screening of elite controllers”***. *Clinical and Translational Medicine*. Juliol 2021;11(7):e474. doi: 10.1002/ctm2.474. PMID: 34323411. Q1/D1. Factor d'impacte (2020): 11.49.
- ***“Elevated α -ketoglutaric acid concentrations and a lipid-balanced signature are the key factors in long-term HIV control”***. *Frontiers in Immunology*. Abril 2022;13:822272.doi: 10.3389/fimmu.2022.822272. eCollection 2022. PMID: 35514981. Q1/D1. Factor d'impacte (2021): 7.97.

IV. MATERIALS I MÈTODES

IV. MATERIALS I MÈTODES

1. Disseny de l'estudi i participants

Les dades clíniques s'obtenen de la cohort ECRIS integrada a la cohort CoRIS i les mostres de plasma són proporcionades pel Biobanc RIS. Els criteris d'inclusió per a la cohort ECRIS són pacients infectats pel VIH amb càrrega viral (CV) inferior a 50 còpies d'ARN del VIH-1/ml en absència de tractament antiretroviral durant almenys 12 mesos de seguiment. La pèrdua de control viral es descriu com a dues mesures consecutives de la càrrega d'ARN del VIH en plasma per sobre del límit de detecció inferior i la pèrdua de control immunològic com una pendent negativa estadísticament significativa del recompte de cèl·lules T CD4⁺ durant el període de seguiment.

En el primer estudi s'han inclòs un total de 18 CE incloent 12 individus que van experimentar una pèrdua del control víric espontània del VIH-1 (2 mesures de CV per sobre del límit de detecció en 12 mesos) classificats com a controladors transitoris (CT) i 6 CE que van mantenir el control viral de forma persistent durant el mateix període de seguiment i que es va anomenar controladors persistents (CP). Per als CT, es van avaluar les mesures en dos moments de seguiment diferents, una determinació abans de la pèrdua del control viral com a condició prèvia a la pèrdua (una mesura durant els 24 mesos anteriors de pèrdua del control viral) i una altra mesura en el seguiment més proper punt de temps després de la pèrdua del control viral, condició posterior a la pèrdua (una mesura al llarg dels 12 mesos de seguiment després del rebot viral). En el grup de CP només es va avaluar una mesura durant el seguiment i es va utilitzar com a grup de control per comparar amb els punts de temps anteriors i posteriors a la pèrdua de control viral dels CT.

En el segon estudi un total de 42 CE es van seleccionar retrospectivament i es van classificar en diferents fenotips de CE, segons la seva capacitat per mantenir el control viral e immunològic a llarg termini. D'aquests 42 CE, 9 pacients que van experimentar una pèrdua espontània del control viral del VIH-1 en menys de 5 anys de seguiment es van classificar com a no-controladors d'elit a llarg termini (no-LTEC); 33 pacients que mantenien el control viral i immunològic durant almenys 5 anys es van definir com a controladors d'elit a llarg termini (LTEC). Entre els grups LTEC, 13 individus es van classificar com a LTEC-extreme, definits com aquells individus que mantenen el control viral e immunològic durant tot el període de seguiment i durant més de 10

anys. També es va incloure un grup de 20 LTEC que van perdre el control viral e immunològic del VIH durant el seguiment, definits com a LTEC-losing.

2. Protocol ètic

Tots els protocols d'investigació s'han aprovat i realitzat segons les recomanacions del Comitè Ètic d'Investigació Clínica seguint les normes de Bones Pràctiques Clíniques de l'Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (CEIm IISPV). El CEIM IISPV és un comitè independent, format per professionals sanitaris i no sanitaris, que vetlla pel correcte compliment dels principis ètics que regeixen els assajos clínics i els projectes d'investigació que es porten a terme al nostre territori, concretament pel que fa a la metodologia, l'ètica i les lleis. Tots els participants van donar el seu consentiment informat per escrit d'acord amb la Declaració d'Hèlsinki.

3. Perfil d'expressió de miRNA mitjançant TaqMan Advanced miRNA Human Plasma Cards (TLDA)

Els assaigs de microRNA (miRNA) són eines innovadores per a la investigació, des de l'aïllament fins a la detecció, la creació de perfils, la quantificació, la validació i l'anàlisi funcional. Es va partir d'una quantitat d'entre 1-10ng d'ARN de cada mostra de plasma dels pacients. Primer es va transcriure inversament l'ARN mitjançant un kit de transcripció inversa universal (TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit- Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific's) per preparar la plantilla d'ADN complementari (ADNc). Els perfils d'expressió de miRNA es van obtenir mitjançant el kit TaqMan™ Advanced miRNA Human Serum/Plasma Card v22 (A34717, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific's), que consta de plaques estàndard de 384 pous (hsa-miR), que contenen fins a 192 dianes de miRNA úniques presents al sèrum/plasma, inclosos controls de miRNA endògens i exògens per a la normalització dels resultats de les dades.

4. Prova de Liposcale: mesures del perfil lipídic i de lipoproteïnes

La prova de Liposcale es va realitzar al Biosfer Teslab (Reus, Espanya) per a l'anàlisi de lipoproteïnes. Tots els espectres 1-HNMR es van registrar a 310 K en un espectròmetre Bruker Avance III 600 que funcionava a una freqüència de protons de 600 · 20 MHz. Es van caracteritzar les concentracions de lípids com són els triglicèrids i el colesterol, les mides de lipoproteïnes i nombre de partícules per a lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL) (38,6–81,9 nm),

lipoproteïnes de baixa densitat (LDL) (18,9–26,5 nm) i lipoproteïnes d'alta densitat (HDL) (7,8–11,5 nm), així com el nombre de partícules de nou subclasses (mida gran, mitjana i petita). El conjunt total de 26 variables es va mesurar en espectres 2D a partir de l'espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear (RMN) ordenada per difusió (DOSY) mitjançant la prova de Liposcale. Les concentracions de colesterol i triglicèrids de les principals fraccions de lipoproteïnes es van predir mitjançant models de regressió de mínims quadrats parcials (PLS). Les ressonàncies de protons metil dels lípids de les partícules de lipoproteïnes es van descompondre en nou funcions lorentzianes que representaven nou subclasses de lipoproteïnes i es va derivar la mida mitjana de partícules de cada fracció principal fent la mitjana de l'àrea de RMN de cada fracció per la seva mida associada. Finalment, es va calcular el nombre de partícules de cada fracció principal de lipoproteïna dividint el volum de lípids pel volum de partícules d'una classe determinada i es van utilitzar les àrees relatives dels components de la lipoproteïna utilitzats per descompondre els espectres de RMN per derivar el nombre de partícules de les nou lipoproteïnes. subclasses.

5. Determinació del perfil metabolòmic (mètode analític)

L'anàlisi metabolòmic realitzat al Centre de Ciències Òmiques (COS) (Reus, Espanya), comença amb la precipitació de les proteïnes més abundants afegint vuit volums de metanol: aigua (8:2) que conté una barreja estàndard interna (àcid succínic-d4, àcid mirístic-d27, glicerol-13C3 i D-glucosa-13C6) al plasma. Les mostres es van barrejar i es van incubar a 4°C durant 10 min., es van centrifugar a 21.000 g i el sobrenedant es va evaporar a sec abans de la derivatització del compost (clorhidrat de metoxiamina i N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida + 1% clorur de trimetilsilil (MSTFA + 1% TMCS)). Les mostres es van analitzar amb un 7200 GC-qTOF d'Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EUA). La separació cromatogràfica es va basar en el mètode Fiehn¹⁹⁰, utilitzant una columna capil·lar de pel·lícula J&W Scientific HP5-MS (30 mx 0,25 mm id, 0,25 µm) i heli com a gas portador mitjançant un programa de forn de 60 a 325°C. La ionització es va fer per impacte electrònic (EI), amb energia electrònica de 70eV i funcionava en mode d'exploració completa, registrant dades en un rang entre 35 i 700 m/z a una velocitat d'exploració de 5 spec/s. Després de la identificació directa (amb estàndards purs) o putativa (amb biblioteca) de metabòlits, aquests es van semiquantificar en termes de relació de resposta estàndard interna. Per a aquesta quantificació relativa, l'àrea de fragments específics de cada metabòlit es va dividir per l'àrea del seu estàndard intern específic per proporcionar una concentració relativa de metabòlits fiable, precisa i reproduïble.

6. Determinació del perfil lipídomic (mètode analític)

La caracterització del perfil lipídomic, també realitzat al Centre de Ciències Òmiques (COS) (Reus, Espanya), és un subconjunt de la metabolòmica considerada com una disciplina diferent a causa de la singularitat i l'especificitat funcional dels lípids en relació amb altres metabòlits. Es van identificar un total de 114 lípids en mostres de plasma. El nom de cada compost s'abreuja de la següent manera: ChE per a l'èster de colesterol, DG per diacilglicerol, LPC per a lisofosfolina, PC per fosfatidilcolina, SM per esfingomielina i TG per triacilglicerol. El primer nombre indica els àtoms de carboni acil i el segon indica el nombre d'instauracions.

Per a l'extracció de lípids hidrofòbics, es va realitzar l'extracció líquid-líquid amb cloroform: metanol (2:1) basat en el procediment Folch afegint quatre volums de cloroform: metanol (2:1) que contenia una barreja estàndard interna (Lipidomic SPLASH® Avanti Polar). Lípids, Birmingham, AL, EUA) amb 15: 0-18: 1 (d7) PC, 18: 1 (d7) LPC, 18: 1 (d7), ChE, 15: 0-18: 1 (d7) DG , 15: 0-18: 1 (d7) -15: 0 TG i 18: 1 (d9) SM, entre altres espècies de lípids) al plasma. A continuació, les mostres es van barrejar i es van incubar a -20°C durant 30 min. Després, es va afegir aigua amb NaCl (0.8%) i es va centrifugar la mescla a 15.000 rpm. La fase inferior es va recuperar, es va evaporar fins a sequedat i es va reconstituir amb metanol: metil-terc-butil èter (9:1) i es va analitzar per cromatografia líquida d'ultra alt rendiment (UHPLC 1290 Infinity) acoblat a un espectròmetre de masses de 6550 qTOF (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) en mode d'ionització electrospray positiva. La cromatografia consisteix en l'elució amb una fase mòbil ternària que conté aigua, metanol i 2-propanol amb formiat d'amoni 10 mM i àcid fòrmic al 0.1%. La fase estacionària va ser una columna C18 (Kinetex EVO C18 Column, 2.6 µm, 2.1 mm x 100 mm) que permet l'elució seqüencial dels lípids més hidrofòbics com els lisofosfolípids, esfingomielines, fosfolípids, diacilglicerols, triacilglicerols i èsters de colesterol, entre d'altres.

7. Anàlisi estadística

Les dades categòriques es van comparar mitjançant una prova de chi quadrat; mentre que les dades contínues es van comparar mitjançant la prova U de Mann-Whitney no paramètrica. Les correlacions entre variables es van avaluar mitjançant el test de Spearman, mentre que les diferències entre mostres aparellades es van determinar mitjançant la prova de Wilcoxon no paramètrica.

Les matrius Taqman de baixa densitat (TLDA) es van executar en el sistema de PCR en temps real ràpid 7900HT, els senyals resultants es van llegir amb el programari SDS 2.3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) i la normalització i interpretació de dades es va fer mitjançant el mètode $\Delta\Delta Ct$ (llindar de cicle: el nombre de cicles necessaris perquè el senyal fluorescent travessi el llindar o cycle threshold). La prova de correcció de Benjamin-Hochberg es va aplicar com a taxa estimada de descobriment falsos (FDR del 5%). Els valors de Ct brut es van obtenir dels valors de l'expressió de cada miRNA mitjançant el llindar automàtic de totes les dades processades juntament amb el programari Expression Suite v1.3 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). Aquests miRNAs amb valors $Ct > 37$ i no amplificats es van ometre de l'anàlisi. Per a cada mostra, es va realitzar una normalització mitjana global calculant els valors de ΔCt per a cada miRNA ($\Delta Ct = Ct$ de miRNA de l'experiment – mitjana de Ct del miRNA endogen en tots els miRNAs avaluats). A continuació, es va calcular el $\Delta\Delta Ct$ (mitjana de ΔCt miRNA d'estudi – mitjana de ΔCt dels miRNA controls).

Les mostres es van comparar mitjançant els seus perfils d'expressió relatius de miRNA entre individus controladors persistents i transitoris ($2^{-\Delta Ct}$). L'expressió de \log_2 de miRNA expressats de manera diferencial entre individus es va calcular com a $2^{-\Delta\Delta Ct}$. L'escala logarítmica d'1 fins a infinit indicaria una regulació a l'alça (upregulation), mentre que una escala de 0-1 representaria una regulació a la baixa (downregulation). Es va realitzar un Heatmap d'agrupació jeràrquica comparant els dos grups segons els seus perfils d'expressió de miRNA. El clúster jeràrquic de distància mètrica euclidiana va representar l'expressió relativa de miRNAs d'alta expressió en tons verds i miRNAs de baixa expressió en tons vermells. La precisió del diagnòstic per predir individus que pertanyen a cada grup es va avaluar mitjançant regressió logística i anàlisi de corbes de característiques operatives del receptor (ROC curve). Tanmateix, es va realitzar un Heatmap de l'agrupació jeràrquica que compara fenotips LTEC, per cada concentració d'espècies de lípids quantificada. El clúster jeràrquic euclidià de distància mètrica representava pacients en línies verticals i famílies de lípids candidats en línies horitzontals. L'escala del blau (baixa concentració) al vermell (alta concentració) representa l'abundància normalitzada en unitats arbitràries. La precisió del diagnòstic per predir individus que pertanyen a diferents fenotips LTEC es va avaluar mitjançant regressió logística i anàlisi de corbes ROC.

Per a l'anàlisi de dades de metabolòmica i lipidòmica, es va aplicar la transformació logarítmica de tots els metabòlits quantificats per normalitzar les distribucions de concentració. L'anàlisi quantitatiu d'enriquiment (QEA) i anàlisi de les vies metabòliques es van realitzar mitjançant el "pipeline analític" basat en la web MetaboAnalyst 5.0 i la normalització logarítmica per a l'anàlisi uni i multivariant, selecció de característiques d'alta dimensió, agrupació i classificació

supervisada, anàlisi d'enriquiment funcional i de vies metabòliques. A continuació, es van analitzar les dades normalitzades mitjançant la base de dades de gens i genomes de l'enciclopèdia de Kyoto (KEGG).

El programari estadístic utilitzat va ser SPSS Software v22 i XLSTAT 2020.5.1.1064. Les representacions de gràfics es van realitzar mitjançant el programari GraphPad Prism 5.0 i XLSTAT. Les representacions de la xarxa d'interacció miRNAs es van generar mitjançant la base de dades d'anàlisi visual miRNet, servidor web versió 2.0. Les il·lustracions es van crear mitjançant el servidor web BioRender i el servidor web analític MetaboAnalyst 5.0, tal com s'indica a les llegendes de les figures. Els resultats es van considerar estadísticament significatius a $P < 0.05$.

V. RESULTATS

V. RESULTATS

TREBALL 1: El perfil plasmàtic de miRNA està associat a la pèrdua espontània de control del VIH: el paper del miR-199a-3p com a potent biomarcador per a un cribratge ràpid en els controladors d'elit.

Differential miRNA plasma profiles associated with the spontaneous loss of HIV-1 control: miR-199a-3p and its potential role as a biomarker for quick screening of elite controllers

Jenifer Masip, María del Carmen Gasca-Capote, María Reyes Jimenez-Leon, Joaquim Peraire, Alberto Perez-Gomez, Verónica Alba, Ana-Irene Malo, Lorna Leal, Carmen Rodríguez Martín, Norma Rallón, Consuelo Viladés, Montserrat Olona, Francesc Vidal, Ezequiel Ruiz-Mateos, Anna Rull and ECRIS integrated in the Spanish AIDS Research Network.

Antecedents: Múltiples estudis han intentat establir els mecanismes específics implicats en la pèrdua espontània de control natural en els controladors d'elit (CE), des de factors virals associats a la pèrdua de control immunològic i viral, fins a factors de l'hoste que augmenten la probabilitat de progressió immunològica.

Objectiu: El nostre objectiu era analitzar el patró d'expressió de microRNA (miRNA) en controladors d'elit que experimenten la pèrdua espontània del control del VIH-1 (CT) en comparació amb aquells controladors que mantenen el control viral durant tot el seguiment (CP), per tal d'identificar els possibles mecanismes darrere d'aquesta pèrdua espontània del control viral e immunològic a nivell de transcripció gènica.

Materials i mètodes: L'estudi inclou mostres de plasma de 18 individus CE, incloent 12 CE que van experimentar una pèrdua del control virològic espontani (2 mesures de càrrega viral per sobre del límit de detecció en 12 mesos) (controlador transitori, CT), i un altre grup de 6 CE que va mantenir persistentment el control virològic durant el mateix temps de seguiment (controlador persistent, CP). Els perfils d'expressió relativa de miRNA es van obtenir mitjançant matrius TaqMan™ de baixa densitat (TLDA) amb plaques de 188 miRNAs únics per a cada mostra de plasma.

Resultats: Els CT van mostrar un perfil de miRNA plasmàtic fortament expressat, concretament els miR-27a-3p, miR-376a-3p i miR-199a-3p amb un fold change (FC>4.0) tant abans com després de la pèrdua del control viral. Curiosament, l'expressió del miR-199a-3p es va mantenir significativament augmentada després de la pèrdua de control viral (FC=5), mostrant un percentatge òptim de separació i una capacitat per diferenciar els dos grups de CE en ambdues

condicions (àrea de la corba o AUC>0.89). De fet, la majoria dels miRNAs més expressats en els CT es troben associats amb el metabolisme dels lípids i les lipoproteïnes, com per exemple els miRNA específics del fetge miR-199a-3p, miR-376a-3p i miR-27a-3p associats amb el metabolisme de les LDL i HDL condicions prèvies a la pèrdua.

Conclusions: El nostre estudi va determinar un perfil d'expressió de miRNA específic associat a la progressió virològica dels CE, caracteritzat per un patró de miRNA específic en CT que es difereix dels CP abans de la pèrdua de control espontani, suggerint l'associació amb la progressió virològica. Per tant, es demostra un patró de miRNA característic dels CP que es podria utilitzar com a biomarcador de cribratge per a la detecció ràpida de la progressió virològica i immunològica.

LETTER TO EDITOR

Differential miRNA plasma profiles associated with the spontaneous loss of HIV-1 control: miR-199a-3p and its potential role as a biomarker for quick screening of elite controllers

To the Editor:

People living with HIV (PLWH) who are able to maintain suppressed viral load (VL) for years in the absence of antiretroviral therapy (ART) are known as elite controllers (ECs). ECs represent a heterogeneous population in terms of virological, immunological, and clinical outcomes, and approximately 25% of ECs lose viral control overtime. The study of the mechanisms leading to the loss of viral control in ECs is crucial for the identification of differential markers for the design of novel eradication and immunotherapeutic strategies.

Previously, we identified virological and immunological factors involved in the spontaneous loss of viral control,¹ and we also demonstrated that proteomics and metabolomics are powerful tools to identify potential biomarkers and therapeutic targets in ECs.^{2,3} Additionally, genome-wide associations and transcriptome analyses have also been described for ECs and compared to other phenotypes of PLWH,^{4,5} in particular the study of specific microRNA (miRNA) expression profiles.⁵ miRNAs play vital roles in development, apoptosis, and oncogenesis by interfering with gene expression at the post-transcriptional level.⁶ In HIV/AIDS scenario, the most relevant feature is that some miRNAs can modulate HIV replication by directly targeting HIV RNA or targeting messenger RNA (mRNA) of cell factors necessary for HIV replication.⁷

Our study conducted in 18 ECs (Figure S1, Table S1), 12 individuals who experienced a loss of spontaneous viral HIV-1 control (transient controllers, TCs) and six ECs who persistently maintained viral control during the same follow-up period (persistent controllers, PCs), showed an upregulated plasma miRNA profile in TCs before and after the loss of viral control.

First, 23 miRNAs were found differentially expressed in TCs compared to PCs at the preloss time point (Fig-

ure 1A, Table S2). From the 23 miRNAs, 22 miRNAs were positively correlated with viral load (VL), seven miRNAs were positively correlated with CD4⁺ T-cell counts, and 11 miRNAs were positively correlated with CD8⁺ T-cell counts (Table S3). Interestingly, the spontaneous loss of viral control in ECs can be defined by the expression of hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-376a-3p, and hsa-miR-199a-3p (Figure 1B), as confirmed by the diagnostic accuracy determined by the ROC analysis (Figure 1C). Notably, hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-376a-3p, and hsa-miR-199a are tightly connected and related to lipid metabolism (Figure 1D). Then, we also evaluated the plasma miRNA profile in TCs under the postloss condition and we found 38 miRNAs differentially expressed among groups, suggesting that viremia strongly influences the plasma miRNA profile of ECs (Figure 2A, Table S4). And again, these significantly expressed miRNAs among groups were also related to relevant genes linked to lipid pathways (Figure 2B), and some of them positively correlated with VL, CD4⁺ T-cell counts and CD8⁺ T-cell counts (Table S5). Moreover, of the 23 miRNAs significantly differentially expressed under the preloss condition and the 38 miRNAs significantly differentially expressed under the postloss condition, only the upregulation of 19 miRNAs overlapped (Figure 3A). Noteworthy, the expression of hsa-miR-199a-3p showed an optimal percentage of separation and an ability to differentiate between both groups of ECs before and after the loss of viral control (Figure 3B). Accordingly, the upregulation of hsa-miR-199a-3p could be related to lipid dysregulation in TCs, which in turn may potentiate the activation of a cytokine deregulation¹ and in last term bias the virological control in TCs.

Thus, our results confirmed differences in the expression of some miRNAs with target sites located in viral RNA regions encoding viral accessory proteins, suggesting the

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2021 The Authors. *Clinical and Translational Medicine* published by John Wiley & Sons Australia, Ltd on behalf of Shanghai Institute of Clinical Bioinformatics

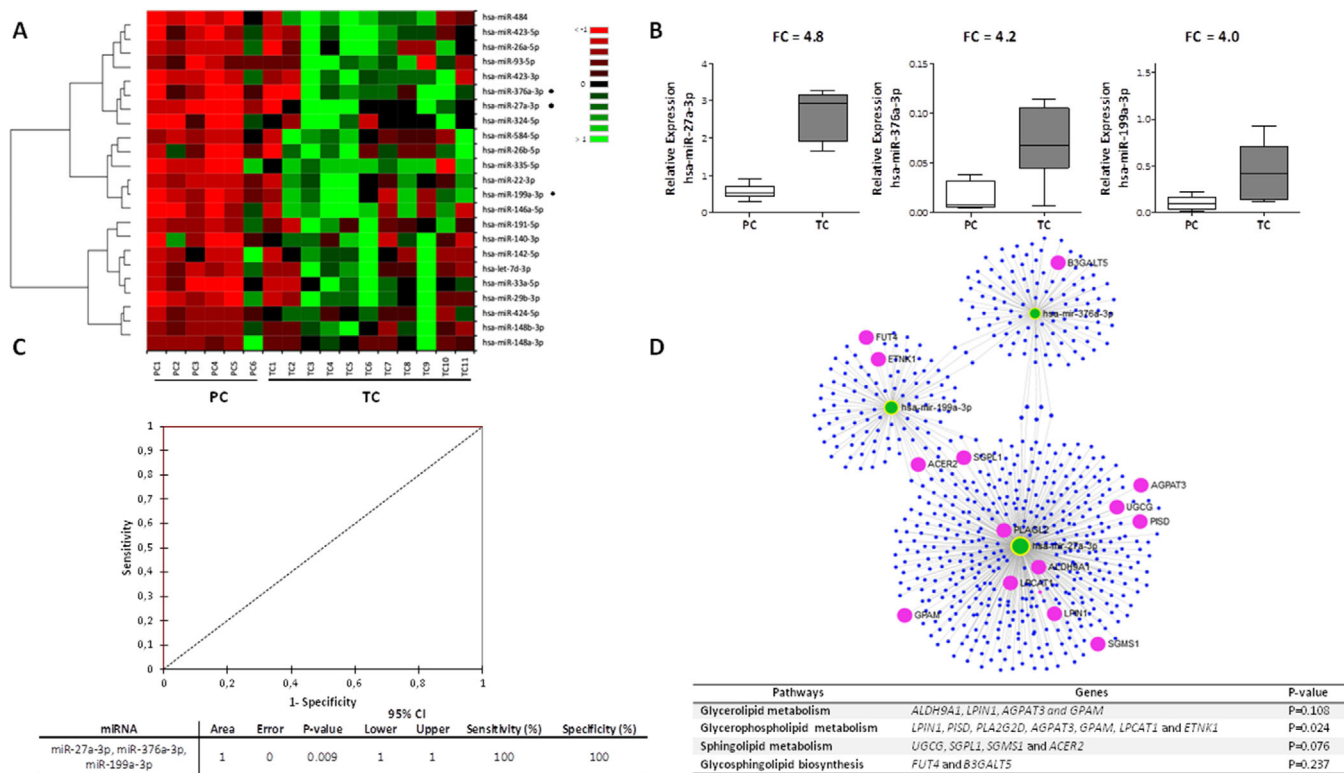


FIGURE 1 miRNA profile distinguishes TCs and PCs under the preloss condition. (A) Hierarchical clustering heatmap of a set of the 23 significantly expressed miRNAs; hierarchical combined tree shows the clusterization of miRNAs. For PCs, only one measurement was assessed during the follow-up and used as the control group for comparison to preloss and postloss time points in TCs. For TCs ($n = 11$), one patient was excluded for lack of expression data values in the preloss condition. Indicated with black dots, next to the miRNAs list, the highly upregulated miRNAs ($FC > 4$). Columns represent each patient, while rows correspond to significant miRNAs. (B) Plasma miRNA profile in PLWH-ECs. hsa-miR-27a-3, hsa-miR-376a-3p, and hsa-miR-199a-3p were the most highly upregulated miRNAs in TCs before the loss of viral control compared to PCs. Statistical analysis was carried out by a nonparametric Mann-Whitney t -test. Data are represented as box and whiskers (min to max values). (C) Receiver operating characteristic curves (ROC curves) from the combination of hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-199a-3p, and hsa-miR-376a-3p ($FC > 4$) in TCs under the preloss condition ($AUC = 1$). (D) Network analysis display of the miRTarBase v8.0 database showing the association of the significantly upregulated miRNAs and their target genes in TCs compared to PCs before the loss of viral control. Cluster hubs shown in green circles indicate miRNAs, whereas blue circles depict their target genes (in purple circles the highlighted genes involved in the lipid metabolism as commented in the text). Bottom table displays some of the genes involved with these miRNAs that link hsa-miR-27a-3p and hsa-miR-199a-3p

emerging concept that upregulated host-derived miRNAs in TCs might act as antiviral defence mechanism directly affecting important steps during HIV infection and also playing a key role in HIV immune pathogenesis. Notably, hsa-miR-423-3p targets the *gag* gene, hsa-miR-29a/29b and hsa-miR-326 target the *nef* gene, and hsa-miR-324-5p targets the *vif* gene^{6,8} (Figure 4).

One mechanism associated to the inhibitory effect of HIV replication could be the interaction of *nef* with the RISC complex, which leads to the inhibition of the translation of viral proteins and viral replication. On the other hand, Nef-containing exosomes, taken up by macrophages, have been suggested to impair lipid cholesterol efflux, causing intracellular cholesterol accumulation, which consequently affects the risk of cardiovascular diseases in PLWH.^{9,10} Several miRNAs can

regulate different steps of HDL-C metabolism, and recent studies have promoted the importance of miRNAs in controlling LDL metabolism and in the regulation of genes involved in very low-density lipoprotein (VLDL) secretion. Our results are in accord with these data since the LDL metabolism resulted to be increased in TCs under the post-loss condition (Figure S2 and Figure S3).² Additionally, some of the most representative host-derived miRNAs associated with the spontaneous loss of viral control overtime are liver-specific miRNAs, being implicated in fatty acid and cholesterol biosynthesis. Thus, our results suggest that disturbance in lipoprotein levels, mostly induced by upregulation of some liver-specific miRNAs, may be highly associated with the immunological factors behind the loss of viral control in TCs. It is known that HIV infection is characterized by a high energy demand

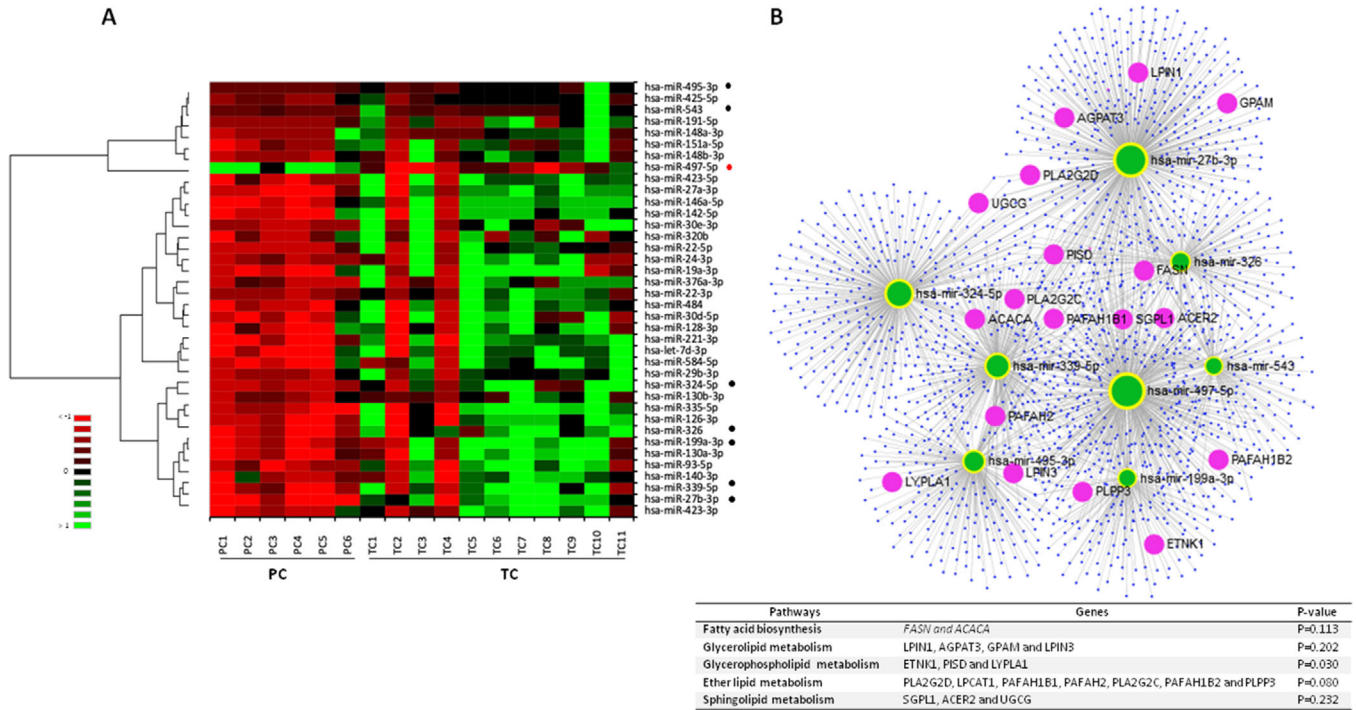


FIGURE 2 miRNA profile distinguishes TCs and PCs under the postloss condition. (A) Hierarchical clustering heatmap of the set of 38 significantly expressed miRNAs; hierarchical combined tree shows the clusterization of the miRNAs. For PCs, only one measurement was assessed during the follow-up and used as the control group for comparison to preloss and postloss time points in TCs. For TCs ($n = 11$), one patient was excluded for lack of expression data values in the preloss condition. Indicated with black dots, next to the miRNAs list, the highly upregulated miRNAs and in red dots the downexpressed miRNA in TCs under the postloss condition. Columns represent each patient, while rows correspond to significant miRNAs. (B) Network display of the miTarBase v8.0 database showing the association of the significantly upregulated miRNAs and their target genes in TCs compared to PCs after the loss of viral control. Cluster hubs shown in green circles indicate miRNAs, whereas blue circles depict their target genes (in purple circles are the highlighted genes involved in the lipid metabolism as commented in the text). Bottom table displays some of KEGG pathways related with these seven most highly upregulated miRNAs under the postloss condition

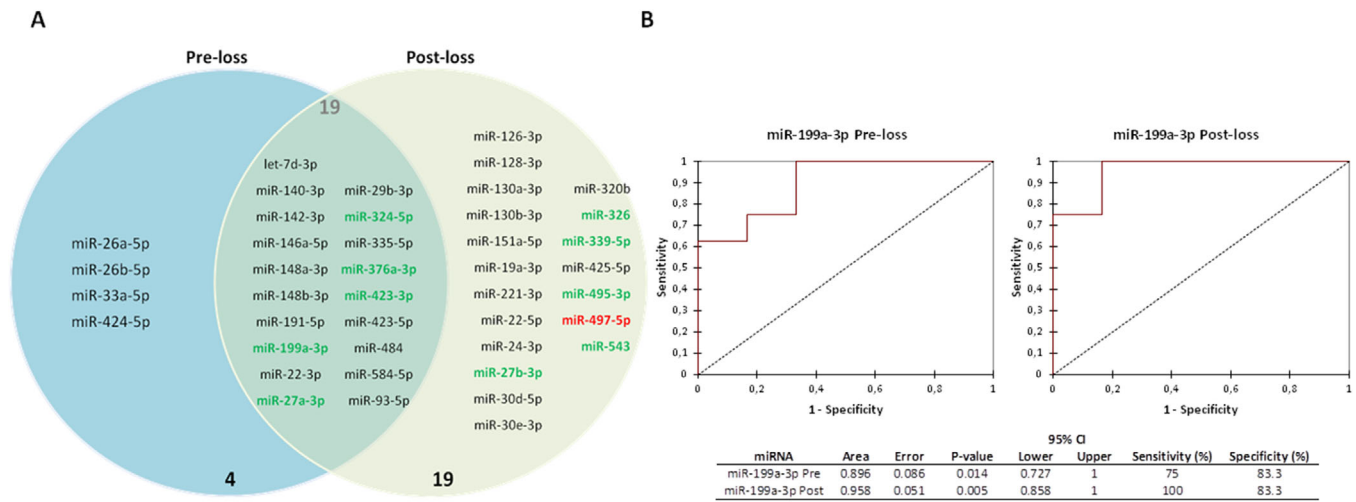


FIGURE 3 miRNA profile in TCs under the preloss condition differs from the postloss condition. (A) Venn's diagram representation showing the overlapping of the significantly expressed miRNAs in TCs, from both conditions, compared to PCs. In green are the highly expressed miRNAs; in red the downregulated miRNAs. (B) Logistic regression and receiver operating characteristic curves (ROC curves) from preloss and postloss relative expression elucidated hsa-miR-199a-3p as the most reliable potential biomarker for the prediction of the spontaneous loss of viral control in ECs

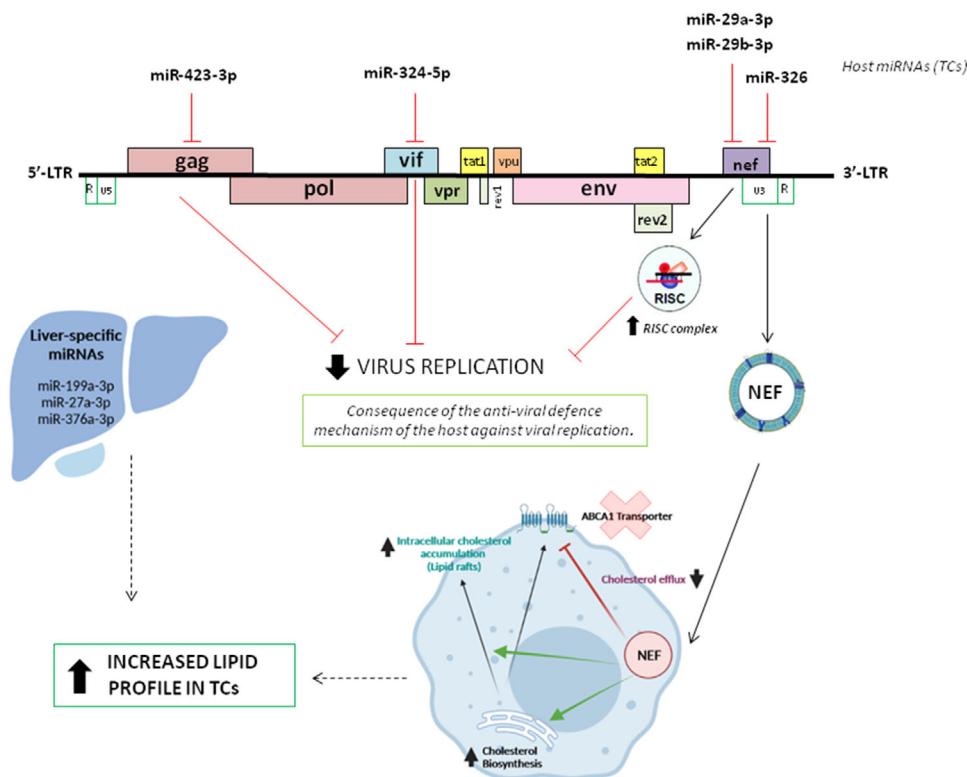


FIGURE 4 Proposed mechanisms of effect of the differential miRNA profile associated with the spontaneous loss of HIV-1 control. Host miRNAs that have been experimentally shown to regulate HIV expression are illustrated with the target sites located in viral RNA regions encoding important viral accessory proteins. The inhibitory effect of HIV replication by hsa-miR-423-3p (*gag* gene), hsa-miR-324-5p (*vif* gene), hsa-miR-29a/29b miRNA, and hsa-miR-326 (both target the *nef* gene) could be a mechanism against the virus after losing viral control in TCs. Of note, hsa-miR-29a/b can bind directly to the HIV-1 mRNA (*nef* gene) increasing its association with proteins in the RISC complex, which leads to the inhibition of the translation of viral proteins and viral replication. Moreover, during HIV infection, the viral accessory protein Nef (via exosomes) impairs activity of cholesterol transporter ABCA1, inhibiting cholesterol efflux and also increases the biosynthesis and accumulation of cholesterol from macrophages. On the other hand, the liver-specific miRNAs hsa-miR-miR-199a-3p, hsa-miR-miR-27a-3p, and hsa-miR-376a-3p were strongly related to lipid and lipoprotein metabolism (Figure 1D). Concretely, hsa-miR-27 is one of the key regulators of the expression of ABCA1 and LDL receptor, whereas hsa-miR-199a-3p is implicated in fatty acid and cholesterol biosynthesis. These results could be associated to the increased lipid profile in TCs after the loss of viral control. In red are represented the inhibited actions and in black are represented the indirect actions

to reprogram the cells to aerobic glycolytic pathways that consequently may increase anabolic metabolism.² So, the increased lipid profile in TCs before the loss of viral control could be a consequence of the antiviral defence mechanism of the host against viral replication.

The main limitation of this work is the small sample size. However, it must be highlighted that these patients are rare, and it is difficult to have a follow-up with sequentially stored samples. Despite the relatively low number of patients, we were able to have a tight follow-up of TCs with samples before and after the loss of virological control. Validation studies are needed to establish the proposed miRNAs as biomarkers for the loss of viral control in ECs.

In conclusion, our study reveals a specific host-derived miRNA pattern in ECs that may be used as a biomarker for quick screening of the virological and immunological progression in ECs, and we confirmed that viremia induces

increased LDL metabolism in TCs. Notably, the expression of liver-specific hsa-miR-199a-3p showed an optimal percentage of separation and an ability to differentiate between both groups of ECs before and after the loss of viral control.

ACKNOWLEDGMENTS

This study would not have been possible without the collaboration of all the patients and medical and nursing staff who took part in the project. These results were partially presented during the Virtual Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI, 2021, Abstract number 2037). We also acknowledge the Biobanc IISPV (B.0000853 + B.0000854) integrated into the Biobanks and Biomodels Platform (PT20/00197) for its collaboration and CERCA Programme (Generalitat de Catalunya), ECRIS integrated in the Spanish AIDS Research Network (Annex

S1), and BiosferTeslab, a spin-off company of the Rovira i Virgili University (URV) and the Pere Virgili Health Research Institute (IISPV). We also thank the comments and criticisms of the anonymous reviewers that greatly helped to improve the manuscript. Francesc Vidal is supported by grants from the Programa de Intensificació de Investigadors (INT20/00031)-ISCIII. Ezequiel Ruiz-Mateos was supported by Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). María del Carmen Gasca-Capote and María Reyes Jimenez-Leon were supported by ISCIII-FEDER, PFIS programme, FI19/00083 and FI17/00186, respectively. Anna Rull is supported by IISPV through the project “2019/IISPV/05” (Boosting Young Talent), by GeSIDA through the “III Premio para Jóvenes Investigadores 2019,” and by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) under grant agreement “CP19/00146” through the Miguel Servet Program. Jenifer Masip is supported by the Universitat Rovira i Virgili under grant agreement “2019PMF-PIPF-18” through the call “Martí Franquès Research Fellowship Programme.” Norma Rallón is a Miguel Servet II investigator supported by a grant from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) “CPII19/00025.”

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

All research protocols were approved and carried out according to the recommendations of the Ethical Committee for Clinical Research following the rules of Good Clinical Practice from the Institut d’Investigació Sanitària Pere Virgili (CEIm IISPV). The CEIm IISPV is an independent committee, made up of health and non-health professionals, which supervises the correct compliance of the ethical principles governing clinical trials and research projects that are carried out in our region, specifically in terms of methodology, ethics, and laws. All participants gave written informed consent in agreement with the Declaration of Helsinki.

FUNDING INFORMATION

Fondo de Investigación Sanitaria-ISCIII-FEDER: PI13/0796, PI16/00503, PI16/0684, PI18/1532, PI19/01127, PI19/01337, PI20/00326, RD16/0025/0006, RD16/0025/0020, INT20/00031, FI19/00083, FI17/00186, CP19/00146, CPII19/00025. European Regional Development Fund/European Social Fund; Programa de Suport als Grups de Recerca AGAUR, Grant Number: 2017SGR948; Gilead Fellowship Program, Grant Number: GLD14/293; SPANISH AIDS Research Network, Grant Numbers: RD16/0025/0006, RD16/0025/0020 (ISCIII-FEDER, Spain). Programa de Intensificació de Investigadors, Grant Number: INT20/00031; Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC); ISCIII-FEDER, PFIS programme, Grant Numbers: FI19/00083, FI17/00186;



IISPV: 2019/IISPV/05 (Boosting Young Talent); GeSIDA “III Premio para Jóvenes Investigadores 2019”; Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Grant Number: CP19/00146; Universitat Rovira i Virgili, Grant Number: 2019PMF-PIPF-18; Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Grant Number: CPII19/00025

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors reviewed and approved the submitted version of the manuscript. Experimental design: Jenifer Masip, Carmen Gasca-Capote, Ezequiel Ruiz-Mateos, and Anna Rull. Intellectual guidance: Consuelo Viladés, Joaquim Peraire, Francesc Vidal, Anna Rull, and Ezequiel Ruiz-Mateos. Recruitment of participants: Jenifer Masip, Ana-Irene Malo, Lorna Leal, Carmen Rodríguez Martín, Norma Rallón, Consuelo Viladés, Joaquim Peraire, Montserrat Olona, and Francesc Vidal. Sample procurement: Jenifer Masip and Verónica Alba. Data collection: Ezequiel Ruiz-Mateos, Ana-Irene Malo, Lorna Leal, Carmen Rodríguez Martín, Norma Rallón, Consuelo Viladés, Joaquim Peraire, and Montserrat Olona. Data analysis and interpretation: Jenifer Masip, María del Carmen Gasca-Capote, María Reyes Jimenez-Leon, Alberto Perez-Gomez, Ezequiel Ruiz-Mateos, and Anna Rull. Manuscript preparation: Jenifer Masip, María del Carmen Gasca-Capote, Ezequiel Ruiz-Mateos, and Anna Rull. Study design, data analysis, and article development: Jenifer Masip, Anna Rull, Ezequiel Ruiz-Mateos, and Francesc Vidal. Reviewed and edited the manuscript: Francesc Vidal, Anna Rull, and Ezequiel Ruiz-Mateos.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Jenifer Masip^{1,2,3}
 Carmen Gasca-Capote⁴
 María Reyes Jimenez-Leon⁴
 Joaquim Peraire^{1,2,3}
 Alberto Perez-Gomez⁴ 
 Verónica Alba^{1,2,3}
 Ana-Irene Malo⁵
 Lorna Leal⁶
 Carmen Rodríguez Martín⁷
 Norma Rallón^{8,9}
 Consuelo Viladés^{1,2,3}
 Montserrat Olona^{1,2,3}
 Francesc Vidal^{1,2,3} 
 Ezequiel Ruiz-Mateos⁴
 Anna Rull^{1,2,3}

ECRIS integrated in the Spanish AIDS Research Network (Annex S1)

¹ *Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain*

² *Institut Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV),
Tarragona, Spain*

³ *Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII,
Tarragona, Spain*

⁴ *Clinic Unit of Infectious Diseases, Microbiology and
Preventive Medicine, Institute of Biomedicine of Seville,
IBiS, Virgen del Rocío University Hospital/CSIC/University
of Seville, Seville, Spain*

⁵ *Vascular Medicine and Metabolism Unit, Research Unit
on Lipids and Atherosclerosis, Sant Joan University
Hospital, Universitat Rovira i Virgili, IISPV, Reus, Spain*

⁶ *Infectious Diseases Department - HIV Unit, Hospital
Clínic Barcelona, IDIBAPS, University of Barcelona,
Barcelona, Spain*

⁷ *Centro Sanitario Sandoval, Hospital Clínico San Carlos,
Instituto de Investigación Sanitaria San Carlos (IdISSC),
Madrid, Spain*

⁸ *HIV and Viral Hepatitis Research Laboratory, Instituto de
Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz,
Universidad Autónoma de Madrid (IIS-FJD, UAM),
Madrid, Spain*

⁹ *Hospital Universitario Rey Juan Carlos, Móstoles,
Madrid, Spain*

Correspondence

Francesc Vidal Marsal, Department of Internal Medicine
and Infectious Diseases, Hospital Universitari de
Tarragona Joan XXIII, IISPV, Universitat Rovira i Virgili,
c/Mallafre Guasch, 4, Tarragona, Spain 43007.
Email: fvidalmarsal.hj23.ics@gencat.cat

Jenifer Masip and Carmen Gasca-Capote contributed
equally to this paper and are primary co-authors.

Ezequiel Ruiz-Mateos and Anna Rull contributed equally
to this paper and are senior co-authors.

These results were partially presented during the Virtual
Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections
(CROI 2021, abstract number 2037).

ORCID

Alberto Perez-Gomez  <https://orcid.org/0000-0002-3644-2914>

Francesc Vidal  <https://orcid.org/0000-0002-6692-6186>

REFERENCES

1. Pernas M, Tarancón-Diez L, Rodríguez-Gallego E, et al. Factors leading to the loss of natural elite control of HIV-1 infection. *J Virol*. 2018;92(5):e01805-e01817.
2. Tarancón-Diez L, Rodríguez-Gallego E, Rull A, et al. Immunometabolism is a key factor for the persistent spontaneous elite control of HIV-1 infection. *EBioMedicine*. 2019;42:86-96.
3. Rodríguez-Gallego E, Tarancón-Diez L, García F, et al. Proteomic profile associated with loss of spontaneous human immunodeficiency virus type 1 elite control. *J Infect Dis*. 2019;219(6):867-876.
4. Egaña-Gorroño L, Escribà T, Boulanger N, et al. Differential MicroRNA expression profile between stimulated PBMCs from HIV-1 infected elite controllers and viremic progressors. *PLoS One*. 2014;9(9):e106360.
5. Rotger M, Dang KK, Fellay J, et al. Genome-wide mRNA expression correlates of viral control in CD4+ T-cells from HIV-1-infected individuals. *PLoS Pathog*. 2010;6(2):e1000781.
6. Hariharan M, Scaria V, Pillai B, Brahmachari SK. Targets for human encoded microRNAs in HIV genes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;337(4):1214-1218.
7. Klase Z, Houzet L, Jeang KT. MicroRNAs and HIV-1: complex interactions. *J Biol Chem*. 2012;287(49):40884-40890.
8. Ahluwalia JK, Khan SZ, Soni K, et al. Human cellular microRNA hsa-miR-29a interferes with viral nef protein expression and HIV-1 replication. *Retrovirology*. 2008;5:117.
9. Aryal B, Singh AK, Rotllan N, Price N, Fernández-Hernando C. MicroRNAs and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2017;28(3):273-280.
10. Mujawar Z, Rose H, Morrow MP, et al. Human immunodeficiency virus impairs reverse cholesterol transport from macrophages. *PLoS Biol*. 2006;4(11):1970-1983.

SUPPORTING INFORMATION

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

Supporting information

Differential miRNA plasma profiles associated with the spontaneous loss of HIV-1 control: miR-199a-3p and its potential role as a biomarker for quick screening of elite controllers

Letter-to-Editor with previous submission number CTM2-2021-04-0689

Running title: miR-199a-3p distinguishes ECs phenotypic profiles

Jenifer Masip^{1,2,3#}, María del Carmen Gasca-Capote^{4#}, María Reyes Jimenez-Leon⁴, Joaquim Peraire^{1,2,3}, Alberto Perez-Gomez⁴, Verónica Alba^{1,2,3}, Ana-Irene Malo⁵, Lorna Leal⁶, Carmen Rodríguez Martín⁷, Norma Rallón⁸, Consuelo Viladés^{1,2,3}, Montserrat Olona^{1,2,3}, Francesc Vidal^{1,2,3}, Ezequiel Ruiz-Mateos^{4*}, Anna Rull^{1,2,3*} ECRIS integrated in the Spanish AIDS Research Network (Annex S1).

¹Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain

²Institut Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), Tarragona, Spain

³Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Tarragona, Spain

⁴Clinic Unit of Infectious Diseases, Microbiology and Preventive Medicine, Institute of Biomedicine of Seville, IBiS, Virgen del Rocío University Hospital/CSIC/University of Seville, Seville, Spain.

⁵Vascular Medicine and Metabolism Unit, Research Unit on Lipids and Atherosclerosis, Sant Joan University Hospital, Universitat Rovira i Virgili, IISPV, Reus, Spain.

⁶Infectious Diseases Department – HIV Unit, Hospital Clínic Barcelona, IDIBAPS, University of Barcelona, Spain.

⁷Centro Sanitario Sandoval, Hospital Clínico San Carlos, Instituto de Investigación Sanitaria San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain.

⁸HIV and Viral Hepatitis Research Laboratory, Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma de Madrid (IIS-FJD, UAM), Madrid, Spain. Hospital Universitario Rey Juan Carlos, Móstoles, Spain.

These authors contributed equally to this paper and should be considered as primary co-authors.

* These authors contributed equally to this paper, and should both be considered as senior co-authors.

Correspondence:

Francesc Vidal Marsal

Department of Internal Medicine and Infectious Diseases,
Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, IISPV, Universitat Rovira i Virgili
c/Mallafré Guasch, 4; Tarragona, Spain 43007
Phone: +34977295800 ext. 1963; FAX: +34977295833
fvidalmarsal.hj23.ics@gencat.cat

People living with HIV (PLWH) who are able to maintain suppressed viral load (VL) for years in the absence of antiretroviral therapy (ART) are known as elite controllers (ECs). However, ECs constitute a heterogeneous subset of PLWH in terms of virological, immunological and clinical outcomes. Some ECs attain very low CD4⁺ T cell counts, a minority of ECs show clinical progression to AIDS-associated pathologies, and a group more frequently develops non-AIDS-defining events (nADEs) associated with high levels of persistent inflammation markers^{1,2}. Regarding viral progression, some individuals control the virus for a long time (persistent elite controllers, PCs), while others, approximately 25% of ECs, lose their viral control over time, a subset of EC known as transient controllers (TC)³.

Multiple studies have attempted to establish the specific mechanisms involved in the spontaneous loss of control in ECs, from virus factors associated with losing immunological and viral control to host factors that increase the probability of immunological progression⁴⁻⁶, suggesting that pathogenic mechanisms related to HIV infection are still active in some ECs.

miRNAs have been discovered in many fields because of their interest in the identification of specific profiles associated with viral infections⁷⁻⁹. miRNAs, among the most important types of RNAs that can target multiple gene transcripts, are small noncoding oligoribonucleotide molecules with a single-stranded structure of 19–25 nt created by RNA polymerase II (Pol II) transcripts^{10,11}. Specific miRNA patterns between ECs and viral progressors (VPs)⁷ and long-term non-progressors (LTNPs) have been reported, elucidating the potential roles of miRNAs and their importance in viral replication and disease progression¹². Interestingly, some evidence also suggests that HIV infection may affect lipid metabolism. Differences in miRNAs released into the bloodstream between HIV-positive and HIV-negative groups revealed miRNA profiling associated with the development of neurocognitive disorders, atherosclerosis and metabolic dysfunction^{13,14}.

Thus, the aim of this study was to identify the mechanism that may lead to a spontaneous loss of viral control at the gene transcription level. In our previous studies, we observed changes in proteins and metabolites in ECs even before they lost viral control. We suggest that the miRNA pattern may distinguish TCs from PCs before the spontaneous loss of viral control and that the expression pattern may be related to immunological and clinical outcomes.

MATERIALS AND METHODS

Patients and study design

ECs were defined as individuals with undetectable VL (viral load) (<50 HIV-1-RNA copies/ml) in the absence of ART for at least 12 months of follow-up. A total of 18 ECs were included in the study based on frozen plasma samples available in the Spanish HIV HGM BioBank belonging to the AIDS Research Network and with data registered in the RIS cohort of HIV Controllers Study Group (ECRIS) based on the study design⁴ (Figure S1A). From the 18 ECs analysed, 12 individuals who experienced a loss of spontaneous viral HIV-1 control (2 measurements of VL above the detection limit in 12 months) were classified as transient controllers (TCs), and another group of 6 ECs who persistently maintained viral control during the same follow-up period were called persistent controllers (PCs). The Biobanc IISPV (B.0000853 + B.0000854)

integrated into the Biobanks and Biomodels Platform (PT20/00197) has supported the present study.

For TCs, measurements in two different follow-up time points were assessed, one determination before the loss of viral control as the pre-loss condition (one measurement during the previous 24 months of losing viral control) and another measurement in the closest follow up time point after the loss of viral control, post-loss condition (one measurement along the 12 months of follow-up after the viral rebound). For PCs, only one measurement was assessed during the follow-up and used as the control group for comparison to the pre-loss and post-loss time points in TCs (Figure S1B), after checking that no changes were found during the follow-up.

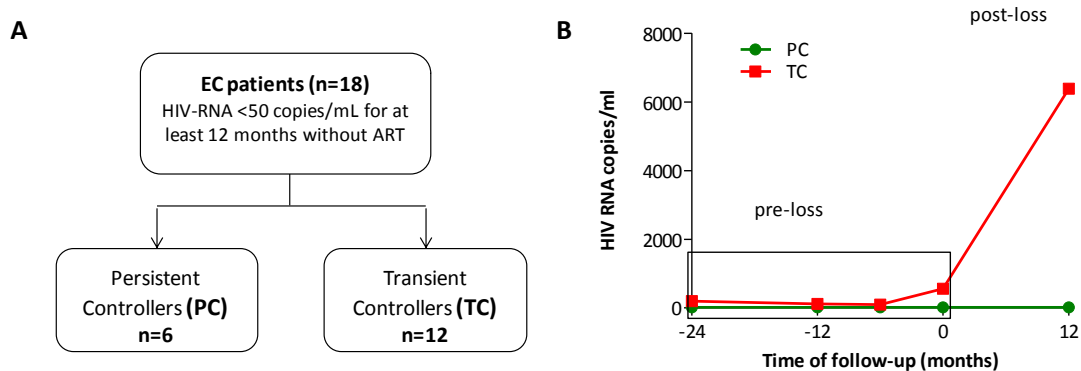


Figure S1. Flow chart and schematic representation illustrating subject cohort enrolment and study design. A) A total of 18 HIV-ECs with VL determinations below the detection limit (<50 HIV-1-RNA copies/ml) in the absence of ART for at least 12 months were included in the study and classified into two groups according to their viral control in transient controllers (TCs, n=12) and persistent controllers (PCs, n=6). **B)** Follow-up time points, for TCs two determinations were assessed, one determination before the loss of viral control (“pre-loss”, from T-24 to T-0) and another one after the loss of viral control (“post-loss”, from T0 to T+12) compared to one determination in PCs.

RNA isolation and quantification

Total RNA was isolated from frozen plasma samples according to the manufacturer’s instructions using the MagMAX mirVana total RNA isolation kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific’s). RNA concentration was calculated using the μ Drop plate (Thermo Fisher) and a Varioskan LUX Multimode Microplate Reader with the SkanIt Software. The absorbance was read at 260nm and 280nm (260nm/280nm RNA/protein). The RNA concentration (μ g/ μ L) in each sample was calculated as $\text{Abs } 260\text{nm} \times \text{dilution factor } (500) \times 40$.

miRNA expression profiling using Taqman low-density arrays (TLDA)

RNA (1-10ng) of the sample isolation procedure was reverse transcribed in a universal reverse transcription (RT) chemistry using TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific’s) to prepare the cDNA template. miRNA expression profiles were obtained using TaqMan™ Advanced miRNA Human Serum/Plasma Card v22 (A34717, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific’s), containing 384-well microfluidic card format (hsa-miR). Subsequently, 220 μ L of cDNA (miR-Amp reaction product) was diluted and assayed (1:10) in RNase-free water and 440 μ L of TaqMan Fast Advanced Master Mix (2X) per card. One card for profiling of up to 188 unique miRNAs in one serum/plasma sample,

including endogenous and exogenous miRNA controls for normalization of data results. Real-time PCR reactions were performed using the 7900HT Fast Real-time PCR system. Thermal-cycling conditions according to the protocol were enzyme activation at 92°C for 10 minutes by 1 cycle, denature phase at 95°C for 1 second and anneal/extend at 60°C by 40 cycles.

Liposcale test: NMR lipoprotein measurements

The Liposcale Test was performed in the Biosfer Teslab (Reus, Spain) for lipoprotein analysis¹⁵. All 1HNMR spectra were recorded at 310 K on a Bruker Avance III 600 spectrometer operating at a proton frequency of 600.20 MHz. Lipid concentrations (i.e., triglycerides and cholesterol), lipoprotein sizes and particle numbers for very-low-density lipoprotein (VLDL) (38.6–81.9 nm), low-density lipoprotein (LDL) (18.9–26.5 nm) and high-density lipoprotein (HDL) (7.8–11.5 nm) classes, as well as the particle numbers of nine subclasses, namely, large, medium, and small VLDL, LDL and HDL (a total set of 26 variables), were measured in 2D spectra from diffusion-ordered NMR spectroscopy (DOSY) experiments using the Liposcale test¹⁵. Briefly, the cholesterol and triglyceride concentrations of the main lipoprotein fractions were predicted using partial least squares (PLS) regression models. Then, the methyl proton resonances of the lipids in lipoprotein particles were decomposed into nine Lorentzian functions representing nine lipoprotein subclasses and the mean particle size of every main fraction was derived by averaging the NMR area of each fraction by its associated size. Finally, we calculated the particle numbers of each lipoprotein main fraction by dividing the lipid volume by the particle volume of a given class and we used the relative areas of the lipoprotein components used to decompose the NMR spectra to derive the particle numbers of the nine lipoprotein subclasses.

Statistical analysis

Categorical data were compared through a chi-squared test; whereas continuous data were compared using the non-parametric Mann-Whitney U test. Correlations between variables were assessed using the Spearman test. Differences between paired samples were determined using the non-parametric Wilcoxon test.

Taqman low-density arrays (TLDA) were run in the 7900HT Fast Real-time PCR system and the signals were read with SDS 2.3 Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and data normalization and interpretation were done by the $\Delta\Delta Ct$ method. Raw Ct (cycle threshold: the number of cycles required for the fluorescent signal to cross the threshold) values of the expression of each miRNA were obtained using automatic thresholding of all the processed data together with the Expression Suite Software v1.3 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific's). These miRNAs with Ct values >37 and not amplified were omitted from the analysis. For each sample, global mean normalization was performed calculating the ΔCt values for each miRNA ($\Delta Ct = Ct \text{ experiment miRNA} - \text{mean Ct endogen miRNA in all assessed miRNAs}$). Then, $\Delta\Delta Ct$ was calculated ($\Delta Ct \text{ mean target miRNA} - \Delta Ct \text{ mean controls miRNAs}$). Benjamin-Hochberg correction test was applied as an estimated false discovery rate (FDR of 5%). Samples were compared by their miRNA relative expression profiles between PCs and TCs ($2^{-\Delta Ct}$). Fold change (\log_2) expression of differentially expressed miRNAs in PCs and TCs were calculated as $2^{-\Delta\Delta Ct}$. A fold change scale of 1-infinity would indicate an upregulation, whereas a scale of 0-1 would represent a downregulation. Heatmap of hierarchical clustering comparing TCs and PCs, by their miRNA expression profiles was performed. The Euclidean distance-metric hierarchical cluster represented the relative expression of upregulated miRNAs in green tones

and downexpressed miRNAs in red tones. The diagnostic accuracy for predicting individuals belonging to TCs or PCs group was evaluated by logistic regression and receiver operating characteristic (ROC) curve analysis.

The statistical software used was the SPSS Software v22 and XLSTAT 2020.5.1.1064. Representations of graphs were performed using GraphPad Prism 5.0 software, XLSTAT and BioRender Online Software. miRNAs interaction network representations were generated using the miRNet visual analytics database, version 2.0 web server ¹⁶. The results were considered statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

To our knowledge, this is the first study to evaluate circulating miRNA predictive markers and disease progression between these phenotypical groups of ECs. Our results showed a consistent difference in plasma miRNA expression between the PCs and TCs before the loss of viral control. These differences in the miRNA expression patterns persisted after the loss of control, showing that there is an association between the miRNA profile and viraemia. Interestingly, we discovered that most of these differentially expressed miRNAs are involved in lipid metabolism. This finding confirms our previous results that revealed a strong correlation between circulating metabolites and lipid concentrations with immunological parameters¹⁷, offering new insight into metabolic pathways associated with spontaneous loss of viral control.

Characteristics of the study participants

The clinical and demographic characteristics of persistent controllers (PCs) and transient controllers (TCs) before the loss of viral control under the pre-loss condition are summarized in Table S1. No differences were observed in age, sex, transmission route, HCV coinfection, or CD4⁺ and CD8⁺ T-cell counts in the TCs compared to the PCs.

Table S1. Baseline characteristics of the study participants.

Clinical characteristics	PCs (n=6)	TCs (n=12)	P-value
Age (years)	47 [46-51]	44 [38-57]	0.335
Male	2 (33.3)	6 (50.0)	0.616
Risk factor			0.277
Heterosexual	2 (33.3)	5 (41.7)	
Homo/Bisexual		2 (16.7)	
Intravenous drug abuse	4 (66.7)	3 (25.0)	
Other/Unknown		2 (16.7)	
CD4 ⁺ T-cell count (cells/ μ L)	424 [382-674]	712 [418-913]	0.213
CD8 ⁺ T-cell count (cells/ μ L)	350 [256-770]	764 [636-1200]	0.090
CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T cell ratio	1.45 [0.74-1.99]	0.93 [0.66-1.07]	0.320
HCV co-infection (Positive)	3 (50.0)	5 (41.7)	0.563

Data from TCs corresponds to one measurement in the period of two years before the loss of virological control ($-T_{24}$ to $-T_0$), compared to PCs. Data are presented as n (%) or median [interquartile range]. Categorical data were compared through a χ^2 test, whereas continuous data were compared using the non-parametric Mann-Whitney test. PCs, persistent controllers; TCs, transient controllers.

Circulating miR-27a-3p, miR-376a-3p and miRNA-199a-3p as predictive markers of the loss of viral control in ECs

TCs showed an upregulated miRNA profile before the loss of viral control, compared to PCs. Differential miRNA expression between TC and PC groups was measured using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (fold-change (FC) relative to that of the PCs). From the 188 miRNAs analysed in this study, we found 23 miRNAs differentially expressed in TCs compared to PCs at the pre-loss time point ($P < 0.05$) (Figure 1, Table S2). The most highly expressed miRNAs ($FC > 4.0$) were hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-376a-3p and hsa-miR-199a-3p, which exhibited 4.8-, 4.2- and 4.0-fold increased expression, respectively, in the TCs (Figure 1B).

Table S2. Significantly expressed miRNAs in TCs compared to PCs under the pre-loss condition.

miRNA	Relative Expression PCs	Relative Expression TCs	P-value	Fold Change
hsa-miR-27a-3p	0.54	2.57	0.002	4.8
hsa-miR-376a-3p	0.01	0.05	0.009	4.2
hsa-miR-199a-3p	0.08	0.34	0.013	4.0
hsa-miR-423-3p	0.03	0.09	0.018	3.3
hsa-miR-146a-5p	0.12	0.38	0.026	3.1
hsa-miR-584-5p	0.11	0.34	0.016	3.1
hsa-miR-148b-3p	0.03	0.08	0.020	3.0
hsa-miR-191-5p	0.02	0.07	0.020	2.8
hsa-miR-335-5p	0.18	0.51	0.017	2.8
hsa-miR-22-3p	0.62	1.69	0.002	2.7
hsa-miR-142-5p	0.13	0.34	0.036	2.6
hsa-miR-324-5p	0.01	0.02	0.045	2.6
hsa-let-7d-3p	0.09	0.22	0.038	2.5
hsa-miR-424-5p	0.05	0.13	0.005	2.5
hsa-miR-484	0.12	0.31	0.003	2.5
hsa-miR-33a-5p	0.02	0.04	0.040	2.3
hsa-miR-148a-3p	0.05	0.11	0.020	2.2
hsa-miR-26b-5p	0.25	0.52	0.006	2.1
hsa-miR-423-5p	0.21	0.43	0.013	2.0
hsa-miR-140-3p	0.02	0.04	0.037	1.9
hsa-miR-29b-3p	0.04	0.08	0.020	1.9
hsa-miR-26a-5p	0.10	0.17	0.042	1.7
hsa-miR-93-5p	0.06	0.10	0.037	1.7

Data values of the significantly expressed miRNAs (relative expression) of PCs and TCs under the pre-loss condition are represented by the fold change number (highest to lowest FC). In bold are represented the significantly upregulated miRNAs ($FC > 4$).

To test whether these three miRNAs can distinguish TCs from PCs, logistic regression and receiver operating characteristic (ROC) curve analysis were carried out. Thus, we used a logistic regression model that combined 3 significant miRNAs (hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-376a-3p and hsa-miR-199a-3p), which displayed an area under the curve (AUC) with a value of 1 ($SE=100$, $P < 0.05$) (Figure 1C).

Finally, we evaluated which metabolic pathways were affected by the interaction of these three significantly expressed miRNAs in TCs. Thus, some of the most relevant functions of hsa-miR-27a-3p involve lipid metabolism ($P=0.129$), adipocyte differentiation ($P=0.114$), cholesterol metabolism (hydrolysis, influx and esterification) ($P < 0.001$) and cholesterol efflux

($P=0.043$), whereas hsa-miR-376a-3p is associated with glycosphingolipid biosynthesis (*B3GALT5*, $P=0.072$). The liver miRNA hsa-miR-199a-3p is interestingly associated with HIV lipodystrophy ($P=0.047$).

Considering that an upregulated miRNA plasma profile is associated with spontaneous loss of viral control in ECs, we analysed the relationship between these specific pre-loss miRNA patterns and clinical parameters (Table S1). The analysis was performed considering the entire patient cohort ($n=18$) using the relative expression value of each differentially expressed miRNA as calculated by the $2^{-\Delta C_t}$ method. All 23 miRNAs differentially expressed in TCs under the pre-loss condition were positively correlated with VL except for miR-26b-5p (Table S3). Additionally, 7 miRNAs (miR-146a-5p, miR-199a-3p, miR-22-3p, miR-26a-5p, miR-324-5p, miR-423-3p and miR-93-5p) were positively correlated with CD4⁺ T-cell counts, and 11 miRNAs (miR-142-5p, miR-146a-5p, miR-148a-3p, miR-148b-3p, miR-199a-3p, miR-26b-5p, miR-29b-3p, miR-335-5p, miR-424-5p, miR-484 and miR-584-5p) were positively correlated with CD8⁺ T-cell counts (Table S3). Additionally, miRNA hsa-miR-424-5p was negatively associated with the CD4/CD8 ratio ($P=0.007$, $\rho=-0.704$). No association was found between the selected miRNAs and sex or risk factors. Interestingly, hsa-miR-199a-3p, which was expressed at a 4.0-fold higher level in TCs than in PCs before the loss of viral control, was positively correlated with VL, CD4⁺ and CD8⁺ T-cell counts under the pre-loss condition ($P=0.002$, $\rho=0.779$, $P=0.015$ $\rho=0.654$ and $P=0.042$ $\rho=0.620$, respectively).

Table S3. Pre-loss miRNA profile correlates with plasma viraemia rebound, CD4⁺ and CD8⁺ T cells.

miRNA	log VL (copies/ml)		CD4 ⁺ counts		CD8 ⁺ counts	
	P-value	ρ	P-value	ρ	P-value	ρ
hsa-let-7d-3p	0.000	0.784	0.513	0.176	0.081	0.482
hsa-miR-140-3p	0.016	0.590	0.704	0.103	0.111	0.444
hsa-miR-142-5p	0.000	0.880	0.122	0.433	0.046	0.561
hsa-miR-146a-5p	0.008	0.654	0.009	0.649	0.006	0.718
hsa-miR-148a-3p	0.008	0.637	0.542	0.165	0.010	0.662
hsa-miR-148b-3p	0.001	0.729	0.196	0.341	0.046	0.541
hsa-miR-191-5p	0.005	0.661	0.090	0.437	0.337	0.278
hsa-miR-199a-3p	0.002	0.779	0.015	0.654	0.042	0.620
hsa-miR-22-3p	0.000	0.879	0.031	0.599	0.105	0.515
hsa-miR-26a-5p	0.001	0.745	0.046	0.521	0.156	0.400
hsa-miR-26b-5p	0.066	0.525	0.144	0.429	0.043	0.592
hsa-miR-27a-3p	0.001	0.811	0.217	0.385	0.109	0.510
hsa-miR-29b-3p	0.000	0.794	0.289	0.282	0.056	0.521
hsa-miR-324-5p	0.035	0.611	0.022	0.650	0.121	0.473
hsa-miR-335-5p	0.010	0.767	0.511	0.236	0.035	0.703
hsa-miR-33a-5p	0.018	0.621	0.366	0.262	0.477	0.228
hsa-miR-376a-3p	0.014	0.619	0.206	0.346	0.373	0.270
hsa-miR-423-3p	0.001	0.772	0.010	0.662	0.068	0.502
hsa-miR-423-5p	0.000	0.817	0.098	0.459	0.087	0.492
hsa-miR-424-5p	0.029	0.562	0.732	-0.096	0.006	0.718
hsa-miR-484	0.000	0.863	0.213	0.329	0.016	0.627
hsa-miR-584-5p	0.031	0.558	0.248	0.318	0.009	0.669
hsa-miR-93-5p	0.001	0.751	0.034	0.532	0.277	0.312

P and ρ values of the Spearman correlation between significantly expressed miRNAs, VL (copies/mL), CD4⁺ and CD8⁺ T cell counts in TCs under the pre-loss condition. In bold are represented the significant correlations.

Hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-376a-3p and hsa-miR-199a-3p were the most highly expressed miRNAs in TCs compared to those expressed in the PCs under the pre-loss condition. Furthermore, the spontaneous loss of viral control in ECs can be defined at several levels concerning these miRNAs, as shown by the diagnostic accuracy determined by the ROC analysis. A previous study has reported differences between HIV-infected patients showing disease progression (viraemic progressors, VP) and ECs, anticipating that specific miRNA profile could influence the different progression of HIV disease. Of interest, the study identified the upregulation of hsa-miR-27a, -27b and 29b levels in ECs (FC>2.1) and concluded that the miRNA profile of ECs is similar to healthy individuals and differs from VP⁷. As we previously stated, some miRNAs play important roles in the regulation of biological processes, for example, the overexpression of hsa-miR-27a can decrease the phosphorylation of Akt and ERK, and this antiviral activity can inhibit enterovirus 71 (EV71) replication¹⁸. Other studies have reported the proinflammatory activity of hsa-miR-27a; when this miRNA is overexpressed, the expression of proinflammatory cytokines is increased via TLR2/4-activated macrophages¹⁹. Of note, during the immune activation for viral replication, the high energy demand is characterized by the overproduction of proinflammatory cytokines as suggested in our previous works^{4,20}, leading to an inflammatory and increased oxidative stress condition in PLWH²¹. The activation of a cytokine deregulation in TCs may result in metabolic alterations that could be associated with the dysregulation of miRNA expression, such as through the combination of hsa-miR-376a-3p and hsa-miR-16-5p (miR-376a-3p/miR-16-5p) that can be detected to distinguish cognitive impairment (CI) groups from non-CI groups of PLWH²², or the liver-specific miRNA hsa-miR-199a-3p which is upregulated to a significant degree (FC=2.5, P<0.01) in HIV-infected subjects with lipodystrophy²³, a medical condition characterized by the loss of fat tissue from one body area. Moreover, subcutaneous adipose tissue of HIV-infected patients has an overproduction of inflammatory cytokines²⁴ and lipogenesis, the metabolic formation of fat, could be the result of immune dysregulation promoted by ART²⁵.

Plasma viraemia influences the miRNA profile of ECs

We also evaluated the plasma miRNA profile in TCs under the post-loss condition (from T0 to T+12) and it to that of the control group of PCs (Table S4). Overall, TCs under the post-loss condition also showed an upregulated miRNA profile compared to that of the PCs, except for hsa-miR-497-5p, which showed downregulated expression in the TCs compared to the PCs. In this case, the most highly expressed miRNAs (FC>5.0) in the TCs compared to the PCs were hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-326, hsa-miR-339-5p, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-543, hsa-miR-495-3p and hsa-miR-199a-3p (Figure 2A).

Because hsa-miR-199a-3p and hsa-miR-27a-3p had been previously connected to lipid metabolism (Figure 1D), we considered probed the association of these significantly expressed miRNAs under the post-loss condition with relevant genes linked to lipid pathways (Figure 2B). Then, to determine whether any of these differentially expressed miRNAs can be used for clinically monitoring ECs, we determined the correlation between miRNA relative expression levels ($2^{-\Delta Ct}$) and the VL and the CD4⁺ and CD8⁺ T-cell counts. The relative expression levels of hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-130b-3p, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-22-3p, hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-320b, hsa-miR-423-3p and hsa-miR-584-5p were positively associated with VL. Additionally, the expression levels of hsa-miR-24-3p, hsa-miR-30e-3p and hsa-miR-339-5p increased with increasing CD4⁺ T-cell counts, whereas the

expression of hsa-miR-126-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-335-5p, hsa-miR-339-5p and hsa-miR-423-3p increased with increasing CD8⁺ T-cell counts (Table S5).

Interestingly, the relative expression of hsa-miR-497-5p, which was the only miRNA significantly downregulated in the TCs compared to the PCs, was negatively correlated with both VL and CD8⁺ T-cell counts (P=0.023, ρ =-0.646 and P=0.010 ρ =-0.706, respectively).

Table S4. Significantly expressed miRNAs in TCs compared to PCs under the post-loss condition.

miRNA	Relative Expression PCs	Relative Expression TCs	P-value	Fold Change
hsa-miR-27b-3p	0.17	1.24	0.004	7.2
hsa-miR-326	0.03	0.18	0.005	6.7
hsa-miR-339-5p	0.01	0.04	0.036	5.7
hsa-miR-324-5p	0.01	0.03	0.012	5.5
hsa-miR-543	0.00	0.02	0.024	5.4
hsa-miR-495-3p	0.00	0.02	0.048	5.1
hsa-miR-199a-3p	0.08	0.43	0.003	5.0
hsa-miR-221-3p	0.27	1.31	0.001	4.9
hsa-miR-191-5p	0.02	0.11	0.027	4.7
hsa-miR-423-3p	0.03	0.12	0.003	4.6
hsa-miR-146a-5p	0.12	0.56	0.004	4.5
hsa-miR-126-3p	0.40	1.70	0.001	4.2
hsa-miR-130a-3p	0.08	0.33	0.010	4.1
hsa-miR-148b-3p	0.03	0.10	0.015	4.1
hsa-miR-335-5p	0.18	0.76	0.003	4.1
hsa-miR-130b-3p	0.02	0.09	0.022	3.8
hsa-miR-376a-3p	0.01	0.04	0.055	3.5
hsa-miR-22-3p	0.62	2.07	0.002	3.3
hsa-miR-151a-5p	0.06	0.19	0.048	3.2
hsa-miR-22-5p	0.01	0.05	0.013	3.2
hsa-miR-24-3p	0.08	0.27	0.015	3.2
hsa-miR-27a-3p	0.54	1.73	0.001	3.2
hsa-let-7d-3p	0.09	0.29	0.036	3.1
hsa-miR-142-5p	0.13	0.41	0.035	3.1
hsa-miR-148a-3p	0.05	0.16	0.037	3.1
hsa-miR-128-3p	0.02	0.04	0.042	2.9
hsa-miR-584-5p	0.11	0.31	0.005	2.8
hsa-miR-425-5p	0.01	0.03	0.015	2.7
hsa-miR-29b-3p	0.04	0.10	0.011	2.5
hsa-miR-30d-5p	0.08	0.19	0.020	2.5
hsa-miR-30e-3p	0.01	0.03	0.024	2.5
hsa-miR-484	0.12	0.30	0.016	2.4
hsa-miR-93-5p	0.06	0.15	0.015	2.4
hsa-miR-140-3p	0.02	0.04	0.042	2.0
hsa-miR-320b	0.18	0.33	0.036	1.9
hsa-miR-423-5p	0.21	0.39	0.040	1.8
hsa-miR-19a-3p	0.25	0.43	0.048	1.7
hsa-miR-497-5p	0.09	0.03	0.008	0.3

Data values of the significantly expressed miRNA (relative expression) of PCs and TCs under the post-loss condition are represented by the fold change number (highest to lowest FC). In bold are represented the significantly upregulated miRNAs (FC>5) and the downregulated miRNAs at the bottom of the table (FC<0.4).

Table S5. Post-loss miRNA profile correlates with plasma viraemia rebound, CD4⁺ and CD8⁺-T cells.

miRNA	log VL (copies/ml)		CD4 ⁺ counts		CD8 ⁺ counts	
	P-value	ρ	P-value	ρ	P-value	ρ
hsa-let-7d-3p	0.105	0.435	0.603	0.146	0.308	0.282
hsa-miR-126-3p	0.089	0.490	0.803	0.077	0.026	0.636
hsa-miR-128-3p	0.111	0.414	0.259	0.300	0.248	0.318
hsa-miR-130a-3p	0.039	0.505	0.220	0.314	0.269	0.294
hsa-miR-130b-3p	0.023	0.564	0.444	0.206	0.140	0.400
hsa-miR-140-3p	0.044	0.508	0.222	0.324	0.327	0.262
hsa-miR-142-5p	0.338	0.289	0.297	0.313	0.058	0.538
hsa-miR-146a-5p	0.129	0.464	0.131	0.462	0.001	0.839
hsa-miR-148a-3p	0.131	0.382	0.729	-0.091	0.158	0.371
hsa-miR-148b-3p	0.241	0.301	0.141	0.373	0.188	0.347
hsa-miR-151a-5p	0.483	0.183	0.379	0.228	0.134	0.391
hsa-miR-191-5p	0.402	0.218	0.722	0.093	0.295	0.279
hsa-miR-199a-3p	0.016	0.630	0.140	0.415	0.091	0.468
hsa-miR-19a-3p	0.176	0.418	0.101	0.497	0.142	0.473
hsa-miR-221-3p	0.092	0.486	0.188	0.390	0.162	0.412
hsa-miR-22-3p	0.007	0.703	0.201	0.379	0.209	0.374
hsa-miR-22-5p	0.083	0.462	0.071	0.479	0.147	0.393
hsa-miR-24-3p	0.086	0.429	0.035	0.515	0.305	0.274
hsa-miR-27a-3p	0.028	0.565	0.676	0.118	0.246	0.332
hsa-miR-27b-3p	0.015	0.681	0.297	0.329	0.075	0.531
hsa-miR-29b-3p	0.178	0.354	0.356	0.247	0.393	0.229
hsa-miR-30d-5p	0.174	0.346	0.191	0.333	0.165	0.365
hsa-miR-30e-3p	0.631	0.186	0.050	0.667	0.125	0.550
hsa-miR-320b	0.021	0.590	0.899	0.036	0.232	0.329
hsa-miR-324-5p	0.224	0.347	0.114	0.442	0.185	0.376
hsa-miR-326	0.071	0.463	0.520	0.174	0.269	0.294
hsa-miR-335-5p	0.077	0.529	0.191	0.406	0.039	0.601
hsa-miR-339-5p	0.112	0.428	0.020	0.593	0.044	0.525
hsa-miR-376a-3p	0.742	0.093	0.451	0.211	0.970	0.011
hsa-miR-423-3p	0.026	0.555	0.418	0.218	0.011	0.632
hsa-miR-423-5p	0.222	0.335	0.467	0.204	0.694	0.111
hsa-miR-425-5p	0.221	0.313	0.940	0.020	0.176	0.356
hsa-miR-484	0.123	0.402	0.305	0.274	0.444	0.206
hsa-miR-495-3p	0.460	0.236	0.443	0.245	0.433	0.264
hsa-miR-497-5p	0.023	-0.646	0.417	-0.259	0.010	-0.706
hsa-miR-543	0.420	0.235	0.513	-0.191	0.803	0.077
hsa-miR-584-5p	0.032	0.537	0.070	0.465	0.165	0.365
hsa-miR-93-5p	0.241	0.301	0.633	0.125	0.499	0.182

P and ρ values of the Spearman correlation between significantly expressed miRNAs, VL (copies/mL), CD4⁺ and CD8⁺-T cell counts in TCs under post-loss condition. In bold are represented the significant correlations.

Circulating miRNA 199a-3p predicts plasma viraemia rebound

Next, we searched for circulating miRNAs capable of predicting the loss of viral control (the pre-loss condition) that remained differentially expressed during viraemia rebound (the post-loss condition). A Venn diagram (Figure 3A) displays the number and overlap of significantly differentially expressed miRNAs in TCs compared to PCs under both conditions. Thus, these 19

mRNAs were significantly upregulated in the TCs over time under both conditions compared to the PCs and can be considered potential biomarkers of the loss of natural control in EC. Notably, the expression of hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-376a-3p and hsa-miR-27a-3p, which were the most highly expressed miRNAs in the TCs compared to the PCs (FC=4.0) before the spontaneous loss of viral control (Figure 1B), remained significantly upregulated after the loss of viral control. Indeed, the expression of hsa-miR-199a-3p was highly upregulated in the TCs under both conditions before (FC>4) and after (FC>5) the loss of viral control. Thus, we carried out an analysis by using logistic regression and receiver operating characteristic ROC curves of only hsa-miR-199a-3p under both conditions to evaluate its discriminatory power *per se*. The model displayed an area under the curve (AUC) value of 0.896 (SE=75%, P=0.014) before loss of viral control and an AUC value of 0.958 (SE=100%, P=0.05) after loss of control. These results suggest that this miRNA showed an optimal percentage of separation and can be used to distinguish EC, PC and TC groups under both conditions (Figure 3B).

Interestingly, some of the target sites of the circulating differentially expressed miRNAs under the pre-and post-condition are located in viral RNA regions encoding viral accessory proteins, modulating HIV replication. Interestingly, two of the significantly expressed miRNAs in TCs under the post-loss condition, hsa-miR-29b and hsa-miR-326, target the *nef* gene, which is important in delayed disease progression. Besides, the inhibitory effect of HIV replication by the hsa-miR-29a/29b miRNA can be a mechanism against the virus after losing viral control in TCs. Another remarkable miRNA target in the HIV genome is the *gag* gene, targeted by hsa-miR-423-3p, the *vpr* gene targeted by hsa-miR-149 and the *vif* gene targeted by hsa-miR-324-5p²⁶ (Figure 4).

HIV-1 is one of the many viruses whose expression has been demonstrated to be modulated by cellular miRNAs²⁷. miRNAs can affect HIV replication by directly targeting HIV RNA or targeting some of the cell factors necessary for its replication, suggesting that HIV infection strongly influences the plasma miRNA profile. Interestingly, our results confirmed differences in the expression of some of these miRNAs, before and after the loss of viral control, with target sites located in viral RNA regions encoding viral accessory proteins. The miRNAs that can directly decrease HIV replication by more than 40%²⁸, hsa-miR-423-3p, hsa-miR-29b-3p and hsa-miR-324-5p, were significantly upregulated in the TCs compared to the PCs under both conditions, whereas hsa-miR-326 was one of the most upregulated miRNAs in the TCs after the spontaneous loss of viral control. Notably, as mentioned above, hsa-miR-423-3p targets the *gag* gene, hsa-miR-29a/29b and hsa-miR-326 target the *nef* gene, and hsa-miR-324-5p targets the *vif* gene^{26,29} (Figure 4). The expression of hsa-miR-423-3p was previously reported to be an oncogene in several types of cancers. In fact, overexpression of hsa-miR-423-3p was postulated to be an indicator of poor prognosis in patients with lung cancer, where it seems to promote cell proliferation, migration and invasion³⁰. There is no evidence of a relationship between hsa-miR-423-3p and viral load, but according to these previous findings, our current results suggest that overexpression of hsa-miR-423-3p may be an indicator of poor disease prognosis in TCs, possibly associated with a proinflammatory profile. Recently, the expression of hsa-miR-324-5p was associated with host defence against the highly pathogenic influenza A virus (H5N1 HPAIV), suppressing PB1 expression and targeting CUEDC2, a negative regulator of the JAK-STAT pathway with subsequent viral replication³¹. Both hsa-miR-29b and hsa-miR-326 have been previously reported as regulators of Th1 and Th17 differentiation, respectively.

Indeed, the expression of hsa-miR-29b was previously identified as a regulator of Th1 differentiation and acts by controlling T-box 21 protein (T-bet) transcription factors and IFN- γ . Hsa-miR-29b is increased in memory CD4⁺ T-cells obtained from multiple sclerosis (MS) patients and IFN- γ itself enhances hsa-miR-29b expression and establishes a regulatory feedback loop³². Besides, hsa-miR-29b, in combination with hsa-miR-27b, can inhibit the expression of Cyclin T1 in resting CD4⁺ T cells³³. On the other hand, hsa-miR-29 binds directly to the HIV-1 mRNA increasing its association with proteins in the RISC complex which leads to the inhibition of the translation of viral proteins and viral replication³⁴. Hsa-miR-326 is highly expressed in Th17 cells compared with other subtypes of CD4⁺ T cells in relapsing-remitting multiple sclerosis patients and promotes Th-17 differentiation inhibiting ETS-1, a negative regulator of Th-17 differentiation³⁵.

Interestingly, before the loss of viral control, the expression of no miRNAs was downregulated in the TCs compared to the PCs, indicating that the profiles of miRNAs of these patients indicate high activity. In contrast, after the spontaneous loss of viral control, our results revealed the downregulation of the expression of miR-497-5p. This miRNA belongs to the microRNA-15/16/195/424/497 family cluster and plays an important role in modulating the cell cycle and apoptosis of infected cells^{33,36}. It targets the BCL2L2 gene, which encodes an anti-apoptotic protein (Bcl-2-like protein 2), and the SMAD2 gene (encoding the SMAD family member 2 protein), both of which play important roles in modulating intrinsic apoptotic pathways, the cell cycle and multiple cellular processes³⁷. Additionally, the expression of hsa-miR-497-5p was suggested to inhibit the proliferation, migration and invasion of colon cancer cells (CRC) by negatively regulating the insulin-like growth factor 1³⁸. It has been reported that miR-497-5p targets Pur- α , a cellular partner for the Tat regulatory protein of HIV-1, which is necessary for HIV-1 infection of macrophages³⁹. Although this mechanism is still unknown, the modulation of hsa-miR-497-5p activity may decrease HIV transcription in macrophages^{33,40,41}. Accordingly, the downregulation of hsa-miR-497-5p may enhance the HIV transcription and consequently the spontaneous loss of viral control and disease progression in TCs.

Viraemia effects on the TCs miRNA profile

The VL evolution from TCs under the post-loss condition was 558 [133-983] at +T0 and 1750 [142-8185] HIV-RNA copies/mL under the post-loss condition at 12 month time-point (median [interquartile range]).

After discovering differences in the miRNA plasma profiles between TCs and PCs over time, to further identify the specific influence of viral rebound in the plasma miRNA profile, we compared the relative miRNA expression between the pre- and post-loss conditions for each TC by applying the Wilcoxon test for paired samples. A total of 16 miRNAs were differentially expressed between these conditions (Table S6). The expression levels of hsa-miR-144-3p, hsa-miR-497-5p and hsa-miR-122-5p were significantly downregulated, and the expression of hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-130b-3p and hsa-miR-326 was significantly upregulated in the TCs when both conditions were compared. Notably, differences in hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-326 and hsa-miR-497-5p expression were previously found to be significantly different between TCs and PCs under the post-loss condition. These results confirmed that these three specific miRNAs are remarkably associated with viraemia rebound in TCs and therefore may be relevant predictors of the spontaneous loss of viral control in a cohort of ECs, discriminating between PCs and TCs.

Table S6. miRNA profile in TCs before and after the loss of viral control.

miRNA	Relative Expression (pre-loss)	Relative Expression (post-loss)	P-value	Fold Change
hsa-miR-326	0.05	0.183	0.051	3.4
hsa-miR-130b-3p	0.03	0.090	0.028	3.3
hsa-miR-27b-3p	0.45	1.235	0.046	2.8
hsa-miR-324-5p	0.01	0.033	0.018	2.6
hsa-miR-339-5p	0.02	0.038	0.012	2.5
hsa-miR-425-5p	0.01	0.029	0.005	2.5
hsa-miR-130a-3p	0.16	0.331	0.047	2.0
hsa-miR-24-3p	0.14	0.272	0.047	2.0
hsa-miR-151a-3p	0.04	0.070	0.038	1.8
hsa-miR-421	0.01	0.026	0.046	1.8
hsa-miR-93-5p	0.08	0.147	0.037	1.8
hsa-miR-191-5p	0.07	0.112	0.037	1.5
hsa-miR-301a-3p	0.02	0.026	0.043	1.3
hsa-miR-122-5p	0.07	0.041	0.028	0.6
hsa-miR-144-3p	0.52	0.231	0.018	0.4
hsa-miR-497-5p	0.07	0.030	0.046	0.4

Data values of the significantly expressed miRNAs (relative expression) of TCs under the pre- and post-loss condition are represented by the fold change number (highest to lowest FC). In bold are represented the significantly upregulated miRNAs (FC>2.5) and the downregulated miRNAs in TCs, at the top and the bottom of the table, respectively (FC<0.5).

Viraemia induces an upregulated LDL metabolism in TCs

Because we found that the miRNAs with the highest expression in TCs compared to PCs under both conditions (pre- and post-loss conditions) (miR-199a-3p, miR-27a-3p, miR-27b-3p, miR-324-5p, miR-326, miR-339-5p, miR-376a-3p, miR-495-3p and miR-543) were strongly related to lipid and lipoprotein metabolism, we further investigated the potential roles of lipoproteins in the ECs. First, based on 1H-NMR spectroscopy, no statistically significant differences in lipoprotein levels were found between the TCs and PCs, neither before nor after the loss of viral control (non-parametrical Mann-Whitney U test). On the other hand, alterations in LDL metabolism, including significant changes in LDL composition (LDL cholesterol, P=0.013) LDL size particles (LDL-P, P=0.008), and among LDL-large, medium and small particles (P=0.021, P=0.004 and P=0.026, respectively), were found to be significantly increased in the TCs after the loss of viral control compared to their baseline values (pre-loss condition) by applying the Wilcoxon test for paired samples. In addition, both non-HDL particles (P=0.010) and the LDL-P/HDL-P ratio (P=0.075), which is an important predictor of cardiovascular risk, were increased with viraemia. Thus, our results suggested that LDL metabolism is closely associated with metabolic disorders that can be related to the loss of viral control (Figure S2).

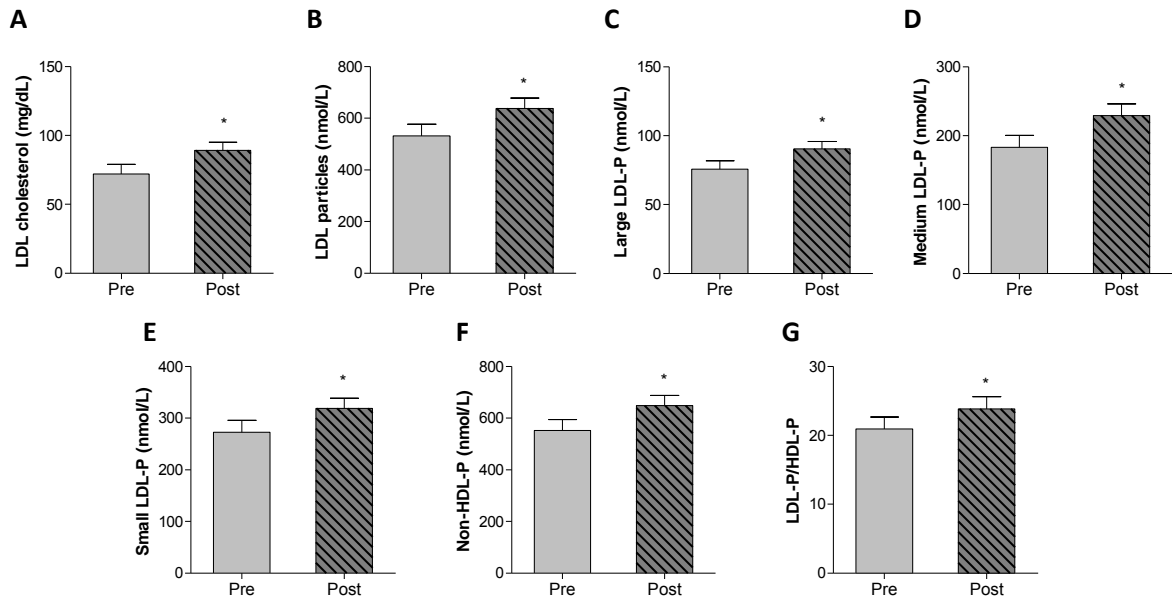


Figure S2. Representation of the significant changes in LDL composition in TCs after the loss of viral control compared to their baseline values (pre-loss condition) applying the Wilcoxon test for paired samples. Significant p-values in LDL cholesterol metabolism: **A)** LDL-Cholesterol ($P=0.013$), **B)** LDL size particles ($P=0.008$), among **C)** LDL-large, **D)** medium and **E)** small particles ($P=0.021$, $P=0.004$ and $P=0.026$, respectively) were found significantly increased in TCs after the loss of viral control. **F)** Non-HDL particles and **G)** LDL-P/HDL-P ratio resulted to be increased with viraemia ($P=0.010$ and $P=0.075$, respectively).

Therefore, we evaluated the association between the highly expressed miRNAs in the TCs compared to the PCs under the two conditions and the associated lipid and lipoprotein profiles. Interestingly, the liver-specific miRNAs hsa-miR-199a-3p and hsa-miR-376a-3p were positively associated with LDL and HDL metabolism, respectively, in the TCs under the pre-loss condition. Hsa-miR-199a-3p was significantly associated with LDL particles ($P=0.047$, $\rho=0.714$), specifically small and medium LDL particles ($P=0.047$ and $P=0.028$, respectively), whereas the miRNA hsa-miR-376a-3p was significantly correlated with HDL triglycerides (HDL-TG) ($P=0.016$, $\rho=0.700$), HDL particles ($P=0.029$, $\rho=0.655$), and specifically small HDL particles ($P=0.023$, $\rho=0.673$) in the TCs under the pre-loss condition. However, hsa-miR-27a-3p, which was highly upregulated in the TCs before the loss of viral control ($FC=4.8$), was negatively correlated with LDL particles ($P=0.042$, $\rho=-0.829$) under the pre-loss condition. In contrast, hsa-miR-497-5p, the only miRNA downregulated in the TCs after the loss of viral control, was positively associated with LDL metabolism, LDL particles ($P=0.021$, $\rho=0.786$) and LDL small particles ($P=0.037$, $\rho=0.738$) and with HDL metabolism, specifically with HDL particles ($P=0.037$, $\rho=0.738$), in the TCs under the post-loss condition (Figure S3).

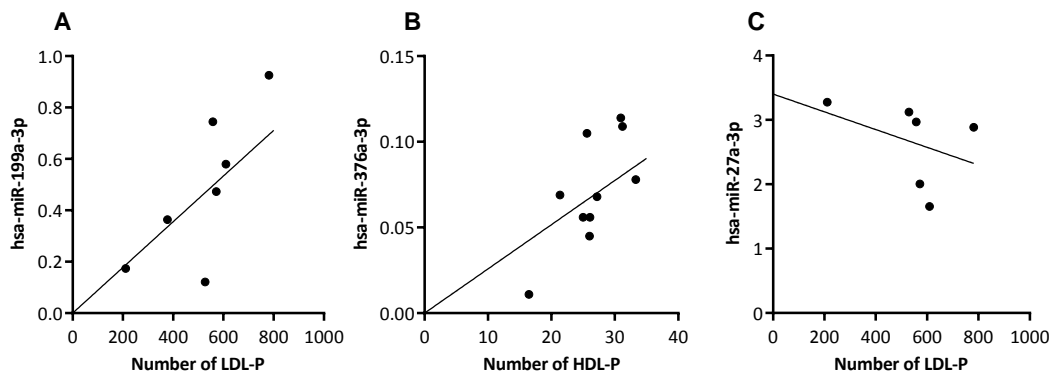


Figure S3. Significantly upregulated miRNAs in TCs under the pre-loss condition correlates with LDL and HDL metabolism. Spearman correlation of the significantly upregulated miRNAs in TCs under the pre-loss condition **A)** hsa-miR-199a-3p ($P=0.047$, $\rho=0.714$), **B)** hsa-miR-376a-3p ($P=0.029$, $\rho=0.655$) and **C)** hsa-miR-27a-3p ($P=0.042$, $\rho=-0.829$) and LDL and HDL particles.

Several miRNAs can regulate different steps of HDL-C metabolism, from synthesis to clearance^{42,43}, including cellular cholesterol efflux, HDL biogenesis, and HDL uptake⁴⁴. Additionally, recent studies have promoted the importance of miRNAs in controlling plasma LDL-C levels, cholesterol biosynthesis, hepatic LDL receptor (LDLR) expression and in the regulation of genes involved in very-low-density lipoprotein (VLDL) secretion⁴⁵. Surprisingly, hsa-miR-27, one of the most upregulated miRNA in the current work, is one of the key regulators of the expression of ABCA1 and the LDL receptor⁴⁶ and was previously found to be involved in the regulation of adipogenesis⁴⁷ and cholesterol biosynthesis⁴⁸ (Figure 1C). Hsa-miR-122, identified in plasma exosomes of HIV/HCV patients, can bind directly to the 5'-UTR of hepatitis virus (HCV) RNA by promoting its replication⁴⁹ and similar to hsa-miR-199a-3p, is implicated in fatty acid and cholesterol biosynthesis⁵⁰. Overexpression of miR-130b-3p or miR-130b-5p in HepG2 cells increases the secretion of very-low-density lipoprotein (VLDL) particles, enhances the secretion of glycerol metabolically labelled triglyceride (TG), and significantly increases the number or the average size of lipid droplets (LDs), respectively⁵¹. Thus, our results suggested that disturbance in lipoprotein levels, mostly induced by upregulation of some liver-specific miRNAs (such as hsa-miR-199a-3p), may be highly associated with the immunological factors behind the loss of viral control in TCs.

In conclusion, we demonstrate that a specific miRNA pattern in ECs may be used as a biomarker for quick screening of the virological and immunological progression in ECs, and we confirmed that viraemia induces increased LDL metabolism in TCs under both pre-loss and post-loss conditions. The association between transcriptomics and previously used omics studies was also challenging because of the multiple different genes that can be affected by a single miRNA and all the biological pathways involved.

REFERENCES

1. Dominguez-Molina B, Leon A, Rodriguez C, et al. Analysis of non-AIDS-defining events in HIV controllers. *Clin Infect Dis*. 2016;62(10):1304-1309. doi:10.1093/cid/ciw120
2. Leon A, Perez I, Ruiz-Mateos E, et al. Rate and predictors of progression in elite and viremic HIV-1 controllers. *AIDS*. 2016;30(8):1209-1220. doi:10.1097/QAD.0000000000001050
3. Blankson JN. Control of HIV-1 replication in elite suppressors. *Discov Med*. 2010;9(46):261-266. Accessed October 26, 2020. PMID 20350494
4. Pernas M, Tarancón-Diez L, Rodríguez-Gallego E, et al. Factors Leading to the Loss of Natural Elite Control of HIV-1 Infection. *J Virol*. 2018;92(5). doi:10.1128/jvi.01805-17
5. Noel N, Lerolle N, Lécuroux C, et al. Immunologic and virologic progression in HIV controllers: The role of viral “blips” and immune activation in the ANRS CO21 CODEX study. *PLoS One*. 2015;10(7). doi:10.1371/journal.pone.0131922
6. Boufassa F, Saez-Cirion A, Lechenadec J, et al. CD4 dynamics over a 15 year-period among HIV controllers enrolled in the ANRS French Observatory. *PLoS One*. 2011;6(4). doi:10.1371/journal.pone.0018726
7. Egaña-Gorroño L, Escribà T, Boulanger N, et al. Differential MicroRNA expression profile between stimulated PBMCs from HIV-1 infected elite controllers and viremic progressors. *PLoS One*. 2014;9(9). doi:10.1371/journal.pone.0106360
8. Rotger M, Dang KK, Fellay J, et al. Genome-wide mRNA expression correlates of viral control in CD4+ T-Cells from HIV-1-infected individuals. *PLoS Pathog*. 2010;6(2). doi:10.1371/journal.ppat.1000781
9. Swaminathan G, Martin-Garcia J, Navas-Martin S. RNA viruses and microRNAs: Challenging discoveries for the 21st century. *Physiol Genomics*. 2013;45(22):1035-1048. doi:10.1152/physiolgenomics.00112.2013
10. Houzet L, Yeung ML, de Lame V, Desai D, Smith SM, Jeang KT. MicroRNA profile changes in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) seropositive individuals. *Retrovirology*. 2008;5. doi:10.1186/1742-4690-5-118
11. Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA. *Trends Genet*. 2006;22(3):165-173. doi:10.1016/j.tig.2006.01.003
12. Ayala-Suárez R, Díez-Fuertes F, Calonge E, et al. Insight in miRNome of Long-Term Non-Progressors and Elite Controllers Exposes Potential RNAi Role in Restraining HIV-1 Infection. *J Clin Med*. 2020;9(8):2452. doi:10.3390/jcm9082452
13. Asahchop EL, Akinwumi SM, Branton WG, Fujiwara E, Gill MJ, Power C. Plasma microRNA profiling predicts HIV-associated neurocognitive disorder. *AIDS*. 2016;30(13):2021-2031. doi:10.1097/QAD.0000000000001160
14. Low H, Hoang A, Pushkarsky T, et al. HIV disease, metabolic dysfunction and atherosclerosis: A three year prospective study. *PLoS One*. 2019;14(4). doi:10.1371/journal.pone.0215620
15. Mallol R, Amigó N, Rodríguez MA, et al. Liposcale: A novel advanced lipoprotein test based on 2D diffusion-ordered 1H NMR spectroscopy. *J Lipid Res*. 2015;56(3):737-746. doi:10.1194/jlr.D050120
16. Chang L, Zhou G, Soufan O, Xia J. miRNet 2.0: network-based visual analytics for miRNA functional analysis and systems biology. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(W1):W244-W251. doi:10.1093/nar/gkaa467
17. Tarancon-Diez L, Rodríguez-Gallego E, Rull A, et al. Immunometabolism is a key factor for the persistent spontaneous elite control of HIV-1 infection. *EBioMedicine*. 2019;42:86-96. doi:10.1016/j.ebiom.2019.03.004
18. Zhang L, Chen X, Shi Y, et al. miR-27a suppresses EV71 replication by directly targeting EGFR. *Virus Genes*. 2014;49(3):373-382. doi:10.1007/s11262-014-1114-4

19. Xie N, Cui H, Banerjee S, et al. miR-27a Regulates Inflammatory Response of Macrophages by Targeting IL-10. *J Immunol.* 2014;193(1):327-334. doi:10.4049/jimmunol.1400203
20. Rodríguez-Gallego E, Tarancón-Diez L, Garcíá F, et al. Proteomic profile associated with loss of spontaneous human immunodeficiency virus type 1 elite control. *J Infect Dis.* 2019;219(6):867-876. doi:10.1093/infdis/jiy599
21. Palmer CS, Ostrowski M, Gouillou M, et al. Increased glucose metabolic activity is associated with CD4+ T-cell activation and depletion during chronic HIV infection. *AIDS.* 2014;28(3):297-309. doi:10.1097/QAD.0000000000000128
22. Kadri F, Laplante A, De Luca M, et al. Defining Plasma MicroRNAs Associated With Cognitive Impairment In HIV-Infected Patients. *J Cell Physiol.* 2016;231(4):829-836. doi:10.1002/jcp.25131
23. Squillace N, Bresciani E, Torsello A, et al. Changes in subcutaneous adipose tissue microRNA expression in HIV-infected patients. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(11):3067-3075. doi:10.1093/jac/dku264
24. Sevastianova K, Sutinen J, Kannisto K, Hamsten A, Ristola M, Yki-Järvinen H. Adipose tissue inflammation and liver fat in patients with highly active antiretroviral therapy-associated lipodystrophy. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2008;295(1). doi:10.1152/ajpendo.90224.2008
25. Kotler DP, Ionescu G, Johnson JA, et al. Studies of adipose tissue metabolism in human immunodeficiency virus - Associated lipodystrophy. *Clin Infect Dis.* 2003;37(SUPPL. 2). doi:10.1086/375891
26. Hariharan M, Scaria V, Pillai B, Brahmachari SK. Targets for human encoded microRNAs in HIV genes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;337(4):1214-1218. doi:10.1016/j.bbrc.2005.09.183
27. Klase Z, Houzet L, Jeang KT. MicroRNAs and HIV-1: Complex interactions. *J Biol Chem.* 2012;287(49):40884-40890. doi:10.1074/jbc.R112.415448
28. Balasubramaniam M, Pandhare J, Dash C. Are microRNAs important players in HIV-1 infection? An update. *Viruses.* 2018;10(3). doi:10.3390/v10030110
29. Ahluwalia JK, Khan SZ, Soni K, et al. Human cellular microRNA hsa-miR-29a interferes with viral nef protein expression and HIV-1 replication. *Retrovirology.* 2008;5:117. doi:10.1186/1742-4690-5-117
30. Wang R, Li G, Zhuang G, Sun S, Song Z. Overexpression of microRNA-423-3p indicates poor prognosis and promotes cell proliferation, migration, and invasion of lung cancer. *Diagn Pathol.* 2019;14(1). doi:10.1186/s13000-019-0831-3
31. Kumar A, Kumar A, Ingle H, et al. MicroRNA hsa-miR-324-5p Suppresses H5N1 Virus Replication by Targeting the Viral PB1 and Host CUEDC2. *J Virol.* 2018;92(19). doi:10.1128/jvi.01057-18
32. Smith KM, Guerau-de-Arellano M, Costinean S, et al. miR-29ab1 Deficiency Identifies a Negative Feedback Loop Controlling Th1 Bias That Is Dysregulated in Multiple Sclerosis. *J Immunol.* 2012;189(4):1567-1576. doi:10.4049/jimmunol.1103171
33. Swaminathan G, Navas-Martín S, Martín-García J. MicroRNAs and HIV-1 infection: Antiviral activities and beyond. *J Mol Biol.* 2014;426(6):1178-1197. doi:10.1016/j.jmb.2013.12.017
34. Nathans R, Chu C ying, Serquina AK, Lu CC, Cao H, Rana TM. Cellular MicroRNA and P Bodies Modulate Host-HIV-1 Interactions. *Mol Cell.* 2009;34(6):696-709. doi:10.1016/j.molcel.2009.06.003
35. Du C, Liu C, Kang J, et al. MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Immunol.* 2009;10(12):1252-1259. doi:10.1038/ni.1798
36. He JF, Luo YM, Wan XH, Jiang D. Biogenesis of MiRNA-195 and its role in biogenesis, the cell cycle, and apoptosis. *J Biochem Mol Toxicol.* 2011;25(6):404-408.

- doi:10.1002/jbt.20396
37. Zahoor MA, Yao XD, Henrick BM, et al. Expression profiling of human milk derived exosomal microRNAs and their targets in HIV-1 infected mothers. *Sci Rep.* 2020;10(1):1-16. doi:10.1038/s41598-020-69799-x
 38. Guo ST, Jiang CC, Wang GP, et al. MicroRNA-497 targets insulin-like growth factor 1 receptor and has a tumour suppressive role in human colorectal cancer. *Oncogene.* 2013;32(15):1910-1920. doi:10.1038/onc.2012.214
 39. Shen CJ, Jia YH, Tian RR, Ding M, Zhang C, Wang JH. Translation of Pur- α is targeted by cellular miRNAs to modulate the differentiation-dependent susceptibility of monocytes to HIV-1 infection. *FASEB J.* 2012;26(11):4755-4764. doi:10.1096/fj.12-209023
 40. Chepenik LG, Tretiakova AP, Krachmarov CP, Johnson EM, Khalili K. The single-stranded DNA binding protein, Pur- α , binds HIV-1 TAR RNA and activates HIV-1 transcription. *Gene.* 1998;210(1):37-44. doi:10.1016/S0378-1119(98)00033-X
 41. Gallia GL, Darbinian N, Tretiakova A, et al. Association of HIV-1 Tat with the cellular protein, Pur α , is mediated by RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(20):11572-11577. doi:10.1073/pnas.96.20.11572
 42. Canfrán-Duque A, Ramírez CM, Goedeke L, Lin CS, Fernández-Hernando C. MicroRNAs and HDL life cycle. *Cardiovasc Res.* 2014;103(3):414-422. doi:10.1093/cvr/cvu140
 43. Rayner KJ, Suárez Y, Dávalos A, et al. MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science (80-).* 2010;328(5985):1570-1573. doi:10.1126/science.1189862
 44. Aryal B, Singh AK, Rotllan N, Price N, Fernández-Hernando C. MicroRNAs and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 2017;28(3):273-280. doi:10.1097/MOL.0000000000000420
 45. Wagschal A, Najafi-Shoushtari SH, Wang L, et al. Genome-wide identification of microRNAs regulating cholesterol and triglyceride homeostasis. *Nat Med.* 2015;21(11):1290-1297. doi:10.1038/nm.3980
 46. Goedeke L, Rotllan N, Ramírez CM, et al. miR-27b inhibits LDLR and ABCA1 expression but does not influence plasma and hepatic lipid levels in mice. *Atherosclerosis.* 2015;243(2):499-509. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.09.033
 47. Sun L, Trajkovski M. MiR-27 orchestrates the transcriptional regulation of brown adipogenesis. *Metabolism.* 2014;63(2):272-282. doi:10.1016/j.metabol.2013.10.004
 48. Khan AA, Agarwal H, Reddy SS, et al. MicroRNA 27a Is a Key Modulator of Cholesterol Biosynthesis. *Mol Cell Biol.* 2020;40(9). doi:10.1128/mcb.00470-19
 49. Jopling CL, Yi MK, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Molecular biology: Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science (80-).* 2005;309(5740):1577-1581. doi:10.1126/science.1113329
 50. Martínez-González E, Brochado-Kith Ó, Gómez-Sanz A, et al. Comparison of methods and characterization of small RNAs from plasma extracellular vesicles of HIV/HCV coinfecting patients. *Sci Rep.* 2020;10(1). doi:10.1038/s41598-020-67935-1
 51. Zhang J, Jazii FR, Haghghi MM, et al. MiR-130b is a potent stimulator of hepatic very-low-density lipoprotein assembly and secretion via marked induction of microsomal triglyceride transfer protein. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2020;318(2):E262-E275. doi:10.1152/ajpendo.00276.2019

Annex S1: Clinical Centres and research groups which contribute to ECRIS:

Clinical centres:

Hospital Universitario de Valme (Sevilla): Juan Antonio Pineda, Pilar Rincón, Juan Macías Sanchez, Luis Miguel Real, Anais Corma Gomez, Marta Fernandez Fuertes, Alejandro Gonzalez-Serna.

Hospital General Universitario Santa Lucía (Cartagena): Onofre Juan Martínez, Lorena Martinez, Francisco Jesús Vera, Josefina García, Begoña Alcaraz, Amaya Jimeno.

Hospital Clinic de Barcelona (Barcelona): José M. Miró, Christian Manzardo, Laura Zamora, Iñaki Pérez, M^a Teresa García, Carmen Ligeró, José Luis Blanco, Felipe García-Alcaide, Esteban Martínez, Josep Mallolas, José M. Gatell.

Hospital General Universitario de Alicante (Alicante): Joaquín Portilla, Irene Portilla, Esperanza Merino, Gema García, Iván Agea, José Sánchez-Payá, Juan Carlos Rodríguez, Lina Gimeno, Livia Giner, Melissa Carreres, Sergio Reus, Vicente Boix, Diego Torrus, Verónica Pérez Esquerdo, Julia Portilla Tamarit.

Hospital Universitari de Bellvitge (Hospitalet de Llobregat): Daniel Podzamczar, Arkaitz Imaz, Juan Tiraboschi, Ana Silva, María Saumoy, Paula Prieto, Sofía Scevola.

Hospital Universitario de Canarias (Santa Cruz de Tenerife): Juan Luís Gómez Sirvent, Jehovana Hernández, Ana López Lirola, Dácil García, Felicitas Díaz-Flores, María del Mar Alonso, Ricardo Pelazas, María Remedios Alemán.

Hospital Carlos III (Madrid): Vicente Soriano, Pablo Labarga, Pablo Barreiro, Pablo Rivas, Francisco Blanco, Luz Martín Carbonero, Eugenia Vispo, Carmen Solera.

Hospital Universitario Central de Asturias (Oviedo): Victor Asensi, María Eugenia Rivas Carmenado, Tomas Suarez-Zarracina Secades.

Hospital Doce de Octubre (Madrid): Federico Pulido, Rafael Rubio, Otilia Bisbal, M^a Asunción Hernando, David Rial Crestelo, María de Lagarde, Rebeca Font, Octavio Arce, Adriana Pinto, Laura Bermejo, Mireia Santacreu.

Hospital Universitario Donostia (San Sebastián): Jose Antonio Iribarren, M^a José Aramburu, Julio Arrizabalaga, Xabier Camino, Francisco Rodríguez-Arrondo, Miguel Ángel von Wichmann, Lidia Pascual Tomé, Miguel Ángel Goenaga, M^a Jesús Bustinduy, Harkaitz Azkune, Maialen Iburguren, Xabier Kortajarena, M^a Pilar Carmona Oyaga, Ainhoa Garaialde Fernandez.

Hospital General Universitario de Elche (Elche): Félix Gutiérrez, Catalina Robledano, Mar Masiá, Sergio Padilla, Araceli Adsuar, Rafael Pascual, Marta Fernández, Antonio Galiana, José Alberto García, Xavier Barber, Vanessa Agullo Re, Javier Garcia Abellan, Reyes Pascual Pérez, Guillermo Telenti, Lucía Guillén, Angela Botella.

Hospital Germans Trías i Pujol (Badalona): Roberto Muga, Arantza Sanvisens, Daniel Fuster.

Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Madrid): Juan Berenguer, Isabel Gutierrez Cuellar, Juan Carlos López Bernaldo de Quirós, Margarita Ramírez, Belén Padilla, Paloma Gijón, Teresa Aldamiz-Echevarría, Francisco Tejerina, Cristina Diez, Leire Pérez Latorre, Chiara Fanciulli, Saray Corral Carretero.

Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, IISPV, Universitat Rovira i Virgili (Tarragona): Francesc Vidal, Anna Martí, Joaquín Peraire, Consuelo Viladés, Sergio Veloso, Montserrat Vargas, Montserrat Olona, Anna Rull, Verónica Alba, Miguel López-Dupla, Elena Yeregui, Jenifer Masip, Laia Reverté.

Hospital Universitario La Fe (Valencia): Marta Montero Alonso, Sandra Cuéllar Tovar, Marino Blanes Juliá, María Tásias Pitarch, Eva Calabuig Muñoz, Miguel Salavert Lletí, Juan Fernández Navarro.

Hospital Universitario La Paz/IdiPaz (Madrid): Juan González-García, Ana Delgado Hierro, Francisco Arnalich, José Ramón Arribas, Jose Ignacio Bernardino de la Serna, Juan Miguel Castro, Luis Escosa, Pedro Herranz, Victor Hontañón, Silvia García-Bujalance, Milagros García López-Hortelano, Alicia González-Baeza, María Luz Martín-Carbonero, Mario Mayoral, María Jose Mellado, Rafael Esteban Micán, Rocio Montejano, María Luisa Montes, Victoria Moreno, Ignacio Pérez-Valero, Berta Rodés, Guadalupe Rúa Cebrián, Talia Sainz, Elena Sendagorta, Eulalia Valencia, Carmen Busca, Joanna Cano, Julen Cardañanos, Rosa de Miguel.

Hospital de la Princesa (Madrid): Ignacio de los Santos Gil, Alejandro de los Santos San Frutos, Jesús Sanz Sanz, Lucio García-Fraile Fraile, Enrique Martín Gayo, Ildfonso Sánchez-Cerrillo, Marta Calvet i Mirabent.

Hospital San Pedro-CIBIR (Logroño): José Antonio Oteo, José Ramón Blanco, Valvanera Ibarra, Luis Metola, Mercedes Sanz, Laura Pérez-Martínez.

Complejo Hospitalario de Navarra (Pamplona): María Rivero, Beatriz Piérola Ruiz de Galarreta, Mainer Goikoetxea Peñagarikano, María Gracia Ruiz de Alda, Carlos Ibero Esparza, Estela Moreno García, Jesús Repáraz.

Hospital Parc Taulí (Sabadell): Gemma Navarro, María José Amengual, Manel Cervantes Garcia, Sonia Calzado Isbert, Marta Navarro Vilasaro, Belen Lopez Garcia.

Hospital Ramón y Cajal (Madrid): Santiago Moreno, Santos del Campo, José Luis Casado Osorio, Fernando Drona Nuñez, Ana Moreno Zamora, María Jesús Pérez Elías, Carolina Gutiérrez, Nadia Madrid, Sergio Serrano Villar, María Jesús Vivancos Gallego, Javier Martínez Sanz, Tamara Velasco, Alejandro Vallejo, Matilde Sanchez Conde, Jose Antonio Pérez Molina.

Hospital Reina Sofía (Murcia): Enrique Bernal, Antonia Alcaraz, Joaquín Bravo Urbietta, Angeles Muñoz Perez, Cristina Tomás Jimenez, Monica Martinez Martinez, Maria Jose Alcaraz, Maria del Carmen Villalba.

Hospital San Cecilio (Granada): Federico García, Clara Martínez, José Hernández Quero, Leopoldo Muñoz Medina, Marta Alvarez, Natalia Chueca, David Vinuesa García, Adolfo de Salazar Gonzalerz, Ana Fuentes Lopez.

Centro Sanitario Sandoval (Madrid): Jorge Del Romero Guerrero, Montserrat Raposo Utrilla, Carmen Rodríguez, Teresa Puerta, Juan Carlos Carrió, Mar Vera, Juan Ballesteros, Oskar Ayerdi.

Hospital Son Espases (Palma de Mallorca): Melchor Riera, María Peñaranda, M^a Angels Ribas, Antonia Campins, Carmen Vidal, Francisco Fanjul, Javier Murillas, Francisco Homar, Helem H Vilchez, Maria Luisa Martin, Antoni Payeras.

Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla): Luis Fernando López-Cortés, Silvia Llaves, Nuria Espinosa.

Research groups:

Hospital General Universitario Gregorio Marañón e Insitute de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón. Maria Angeles Muñoz-Fernández, Laura Tarancon-Diez, Jose Luis Jimenez, Daniel Sepúlveda, Rafael Ceña, Isabel García Merino, Irene Consuegra.

Hospital Clinic. Agathe León, Montse Plana, Nuria Climent, Felipe García.

Hospital Joan XXIII. Francesc Vidal, Anna Marti, Joaquín Peraire, Consuelo Viladés, Sergio Veloso, Montserrat Vargas, Montserrat Olona, Anna Rull, Verónica Alba, Miguel López-Dupla, Elena Yeregui, Jenifer Masip, Laia Reverté.

IIS-Fundacion Jimenez Díaz, UAM. Jose Miguel Benito, Norma Rallón, Clara Restrepo, Marcial García, Alfonso Cabello, Miguel Gorgolas.

Centro Sandoval. Jorge Del Romero, Carmen Rodríguez, Mar Vera.

Fundacion IRSI CAIXA. José Esté, Esther Ballana, Miguel Angel Martinez, S Franco, María Nevot, Julia G. Prado, Esther Jiménez

Hospital Ramón y Cajal. Alejandro Vallejo, Beatriz Sara Sastre, Santiago Moreno.

Virologia Molecular ISCIII. Maria Pernas, Concepción Casado, Cecilio López Galíndez

Infeccion viral e Inmunidad. ISCIII. Salvador Resino

Inmunopatología del SIDA. ISCIII. Laura Capa, Mayte Perez-Olmeda, Pepe Alcami

Mutacion y evolución de virus. Univ Valencia. Rafael Sanjuán, José Manuel Cuevas

Hospital Universitario Doce de Octubre (Madrid): Rafael Rubio, Federico Pulido, Otilia Bisbal, M^a Asunción Hernando, Mariano Matarranz, María Lagarde, Lourdes Domínguez.

Universidad de la Laguna. Agustín Valenzuela-Fernández.

Hospital Virgen del Rocio: Ezequiel Ruiz-Mateos, María Reyes Jiménez-León, Carmen Gasca-Capote, Alberto Pérez-Gómez, Mohamed Rafii-El-Idrissi Benhnia, Alicia Gutierrez-Valencia, María Trujillo, Ana Serna-Gallego, Esperanza Muñoz-Muela, Silvia Llaves, Cristina Roca-Oporto, Nuria Espinosa, Luis Fernando López-Cortés

TREBALL 2: Les concentracions elevades de l'àcid α -cetoglutàric i la presència d'un perfil lipídic singular són factors clau en el control del VIH a llarg termini.

Elevated α -ketoglutaric acid concentrations and a lipid-balanced signature are the key factors in long-term HIV control

Jenifer Masip, Norma Rallón, Elena Yeregui, Montserrat Olona, Salvador Resino, José M Benito, Consuelo Viladés, Graciano García-Pardo, José Alcamí, Ezequiel Ruiz-Mateos, Frederic Gómez-Bertomeu, Montserrat Vargas, Marta Navarro, José A. Oteo, Juan A. Pineda, Anna Martí, Verónica Alba, Francesc Vidal, Joaquin Peraire, Anna Rull and behalf of ECRIS integrated in the Spanish AIDS Research Network.

Antecedents: Els controladors d'elit a llarg termini (LTEC) són un petit subconjunt d'individus infectats per VIH amb control viral i immunològic a llarg termini, designats com a models de cura funcional. Tot i que estudis anteriors han investigat els mecanismes associats amb la replicació del VIH i la immunodeficiència del VIH que podrien contribuir a la pèrdua del control espontani en els controladors d'elit, les dades sobre el fenotip de controladors d'elit a llarg termini (LTEC) són escasses.

Objectiu: L'objectiu d'aquest estudi va ser caracteritzar un perfil metabòlic i lipídic subjacent al fenotip de controlador d'elit a llarg termini per entendre els factors implicats en el control viral i/o immunològic persistent en individus amb més de 10 anys de control del VIH, fonamental per trobar les claus per a la remissió funcional del VIH.

Materials i mètodes: Es van realitzar determinacions metabòliques i lipídiques mitjançant espectrometria de masses d'alta resolució (UHPLC-(ESI) qTOF) en mostres de plasma de 13 pacients amb control viral i/o immunològic per més de 10 anys, definits fenotípicament com a LTEC-extreme, un grup de 20 LTEC que van perdre el control durant el seguiment de l'estudi (LTEC-losing) i 9 pacients amb control viral i immunològic a curt termini (<5 anys) definits com a pacients no-LTEC.

Resultats: El control viral i/o immunològic del VIH a llarg termini està fortament associat amb metabòlits involucrats en el cicle de l'àcid tricarbòxic (TCA). Curiosament, dels nou metabòlits identificats en el TCA, es va trobar que l'àcid α -cetoglutàric ($P=0.004$), un metabòlit implicat en l'activació del complex mTOR, que és un modulador de la latència del VIH i regulador de diversos processos biològics, sent un metabòlit clau en el control virològic persistent. D'altra banda, un perfil lipídic específic, amb la combinació de 45 espècies de lípids, va mostrar un percentatge

òptim de separació (AUC=0.931) i una capacitat per diferenciar el fenotip de controlador a llarg termini (LTEC-extreme) d'aquells que perden el control viral i/o immunològic (LTEC-losing).

Conclusions: El nostre estudi revela un perfil metabolòmic singular associat al manteniment del control natural de la infecció pel VIH als LTEC-extrem i un patró lipidòmic fortament implicat en la pèrdua espontània de control viral i/o immunològic en individus LTEC-losing. El mecanisme exacte subjacent al control natural del VIH a LTEC-extrem no es descriu completament, no obstant, la importància de la identificació del metaboloma i la seva implicació en el sistema immune, és de gran utilitat en la discriminació dels grups fenotípics de LTEC.



Elevated α -Ketoglutaric Acid Concentrations and a Lipid-Balanced Signature Are the Key Factors in Long-Term HIV Control

Jenifer Masip^{1,2,3}, Norma Rallón^{4,5}, Elena Yeregui^{2,3}, Montserrat Olona^{1,2,3}, Salvador Resino^{6,7}, José M. Benito^{4,5}, Consuelo Viladés^{1,2,3,7}, Graciano García-Pardo^{1,2,3}, José Alcamí^{7,8,9}, Ezequiel Ruiz-Mateos¹⁰, Frederic Gómez-Bertomeu^{1,3}, Montserrat Vargas^{1,3}, Marta Navarro¹¹, José A. Oteo¹², Juan A. Pineda¹³, Anna Martí^{1,2,3}, Verónica Alba^{1,2,3}, Francesc Vidal^{1,2,3,7}, Joaquin Peraire^{1,2,3,7*} and Anna Rull^{1,2,3,7*†} on behalf of ECRIS integrated in the Spanish AIDS Research Network

OPEN ACCESS

Edited by:

Aurelio Cafaro,
National Institute of Health (ISS), Italy

Reviewed by:

William Griffiths,
Swansea University, United Kingdom
Jean-Pierre Routy,
McGill University, Canada

*Correspondence:

Joaquin Peraire
joaquim.peraire@urv.cat
Anna Rull
anna.rull@iispv.cat

†These authors have contributed
equally to this work and share
senior authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Viral Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 25 November 2021

Accepted: 22 March 2022

Published: 20 April 2022

Citation:

Masip J, Rallón N, Yeregui E,
Olona M, Resino S, Benito JM,
Viladés C, García-Pardo G,
Alcamí J, Ruiz-Mateos E, Gómez-
Bertomeu F, Vargas M, Navarro M,
Oteo JA, Pineda JA, Martí A, Alba V,
Vidal F, Peraire J, Rull A (2022)
Elevated α -Ketoglutaric Acid
Concentrations and a Lipid-Balanced
Signature Are the Key Factors in
Long-Term HIV Control.
Front. Immunol. 13:822272.
doi: 10.3389/fimmu.2022.822272

¹ Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain, ² Institut Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), Tarragona, Spain, ³ Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Tarragona, Spain, ⁴ HIV and Viral Hepatitis Research Laboratory, Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma de Madrid (IIS-FJD, UAM), Madrid, Spain, ⁵ Hospital Universitario Rey Juan Carlos, Móstoles, Spain, ⁶ Unidad de Infección Viral e Inmunidad, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Spain, ⁷ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain, ⁸ Instituto de Salud Carlos III, AIDS Immunopathology Unit, National Center of Microbiology, Madrid, Spain, ⁹ HIV Unit, Hospital Clinic-IDIBAPS, Barcelona, Spain, ¹⁰ Clinical Unit of Infectious Diseases, Microbiology and Preventive Medicine, Institute of Biomedicine of Seville (IBiS), Virgen del Rocío University Hospital, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), University of Seville, Seville, Spain, ¹¹ Servicio de Enfermedades Infecciosas, Parc Tauli Hospital Universitari, Sabadell, Spain, ¹² Hospital Universitario San Pedro, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), Logroño, Spain, ¹³ Unidad de Investigación Hospital Universitario de Valme, Sevilla, Spain

Long-term elite controllers (LTECs) are a fascinating small subset of HIV individuals with viral and immunological HIV control in the long term that have been designated as models of an HIV functional cure. However, data on the LTEC phenotype are still scarce, and hence, the metabolomics and lipidomics signatures in the LTEC-extreme phenotype, LTECs with more than 10 years of viral and immunological HIV control, could be pivotal to finding the keys for functional HIV remission. Metabolomics and lipidomics analyses were performed using high-resolution mass spectrometry (ultra-high-performance liquid chromatography–electrospray ionization–quadrupole time of flight [UHPLC–(ESI) qTOF] in plasma samples of 13 patients defined as LTEC-extreme, a group of 20 LTECs that lost viral and/or immunological control during the follow-up study (LTEC-losing) and 9 EC patients with short-term viral and immunological control (less than 5 years; no-LTEC patients). Long-term viral and immunological HIV-1 control was found to be strongly associated with elevated tricarboxylic acid (TCA) cycle function. Interestingly, of the nine metabolites identified in the TCA cycle, α -ketoglutaric acid ($p = 0.004$), a metabolite implicated in the activation of the mTOR complex, a modulator of HIV latency and regulator of several biological processes, was found to be a key metabolite in the persistent control. On the other hand, a lipidomics panel combining 45 lipid species

showed an optimal percentage of separation and an ability to differentiate LTEC-extreme from LTEC-losing, revealing that an elevated lipidomics plasma profile could be a predictive factor for the reignition of viral replication in LTEC individuals.

Keywords: metabolomics, lipidomics, elite controllers (ECs), HIV infection, Krebs's cycle, long-term, viral,

mass spectrometry

INTRODUCTION

HIV infection involves a broad, dynamic process and varies in the different phenotypes of people living with HIV. Elite controllers (ECs) are a fascinating subset of these individuals capable of maintaining viral and immunological control, even during long periods without antiretroviral therapy (ART) (1, 2). This characteristic could make ECs a good pathogenic model for a long-awaited HIV cure (3). However, ECs comprise a heterogeneous population in terms of virological, immunological, and even clinical characteristics. Although previous studies have investigated the mechanisms associated with HIV replication and HIV immunodeficiency that could contribute to the loss of spontaneous control in ECs (transient controllers) (4–6), data on long-term ECs (LTECs) are scarce (7). LTECs are a very small proportion of ECs with viral control (HIV-RNA viral load below 50 copies/ml) and lack immunological progression (positive or null CD4 slope) in the long-term without ART (8). Thus, LTEC subjects have been designated as an appropriate model for long-term HIV remission (3) and pose the controversial query of whether ECs need to receive ART (9).

Based on our previous works studying the loss of spontaneous HIV-1 control in ECs (transient controllers) (4, 5, 10), we firmly believe that the identification and quantification of small molecules, from metabolites to lipids, could provide knowledge of immunotherapeutic strategies for ART-free HIV remission (11) and aid in deciding whether ART is warranted in ECs. Thus, we aimed to define the metabolomics and lipidomics signatures underlying the long-term EC phenotype to understand the mechanisms operating for persistent viral and immunological control in LTEC patients with more than 10 years of HIV control.

MATERIALS AND METHODS

Patient Cohort Enrolment and Study Design

A total of 42 ECs from the Spanish AIDS Research Network (RIS) cohort of HIV Controllers Study Group (ECRIS) database were retrospectively selected and classified in different EC phenotypes according to their ability to maintain viral and immunological control in the long term (12) (**Figure 1**). Nine EC patients who experienced a loss of spontaneous viral HIV-1 control in less than 5 years of follow-up were classified as no long-term ECs (no-LTEC); 33 EC patients who maintained viral and immunological control for at least 5 years were defined as LTECs. Among the

LTEC groups, 13 individuals were classified as LTEC-extreme (defined as LTECs maintaining viral and immunological control throughout the whole follow-up period and for more than 10 years); a group of 20 LTECs that lost viral and immunological HIV control during follow-up were included and compared to the group of LTEC-extreme to find the signature underlying the long-term EC phenotype. Loss of viral control was described as two consecutive measurements of plasma HIV-RNA load above the lower detection limit, and the loss of immunological control was described as a statistically significant negative slope of CD4⁺ T-cell count during the follow-up period (p-value <0.05) (**Table 1**).

Samples

Samples from patients were kindly provided by the HIV BioBank integrated into the RIS. Briefly, blood samples were collected using ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes and sent on the same day to the Spanish HIV HGM BioBank for processing. Plasma was obtained by centrifugation and stored at –80°C. All plasma samples analyzed were obtained before the loss of HIV control (in the case of no-LTEC and LTEC-losing groups).

Ethical Protocol

The studies involving human participants were reviewed, approved, and carried out according to the recommendations of the Ethical Committee for Clinical Research following the rules of Good Clinical Practice from the Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (CEIm IISPV, ref. 041/2018). The CEIm IISPV is an independent committee made up of health and non-health professionals that supervise the correct compliance of the ethical principles governing clinical trials and research projects that are carried out in our region, specifically in terms of methodology, ethics, and laws. All participants in the study gave their written informed consent, and the study protocol was evaluated and approved by institutional Ethical Committees in agreement with the Declaration of Helsinki.

Determination of the Metabolomics Profile (Analytical Method)

For metabolomics analysis, a protein precipitation extraction was performed by adding eight volumes of methanol:water (8:2) containing internal standard mixture to plasma samples. Samples were mixed and incubated at 4°C for 10 min and centrifuged at 21,000g, and the supernatant was evaporated to dryness before compound derivatization [methoxyamine hydrochloride and *N*-methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoroacetamide + 1% trimethylsilyl chloride (MSTFA +1% TMCS)]. Samples were analyzed on a 7200 GC-qTOF from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). The chromatographic

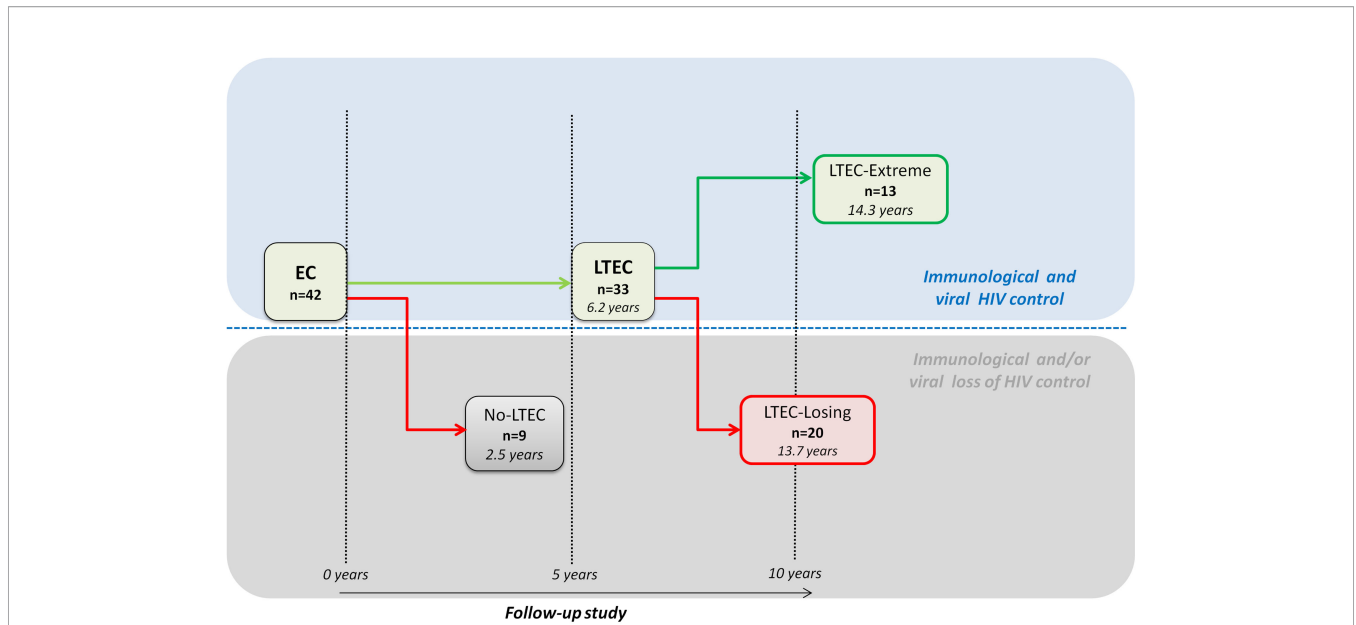


FIGURE 1 | Flowchart illustrating patient cohort enrolment and analysis. From the 42 elite controllers (ECs) analyzed, 9 individuals who experienced a loss of spontaneous viral HIV-1 control in less than 5 years were classified as no long-term elite controllers (no-LTEC); 33 EC individuals who maintained viral and immunological control for at least 5 years were defined as long-term elite controllers (LTECs). Among the LTEC groups, 13 patients were classified as LTEC-extreme (defined as LTECs maintaining viral and immunological control throughout the whole follow-up period and for more than 10 years); and 20 were classified as LTEC-losing (defined as LTECs that lost viral and immunological HIV control during follow-up). Loss of viral control was described as two consecutive measurements of plasma HIV-RNA load above the lower detection limit and a statistically significant negative slope of CD4+ T-cell count during the follow-up period.

separation was based on the Fiehn method (13), using a J&W Scientific HP5-MS (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μm) film capillary column and helium as carrier gas using an oven program from 60°C to 325°C. Ionization was done by electronic impact (EI), with electron energy of 70 eV, and operated in full scan mode, recording data in a range between 35 and 700 *m/z* at a scan rate of 5 spec/s.

Targeted compounds were identified using pure standards with a mass accuracy of 20 ppm: amino acid mix (Cambridge Isotope Laboratories, Montreal, QC, Canada), pyruvic acid, lactic

acid, glycolic acid, 3-hydroxybutyric acid, glycerol, succinic acid, glyceric acid, fumaric acid, malic acid, *D*-threitol, threonic acid, α-ketoglutaric acid, glycerol-1-phosphate, citric acid, *D*-mannitol, myo-inositol, *D*-sucrose, and α-tocopherol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Different internal standards were used to correct signal response: labeled amino acid mix standards (Cambridge Isotope Laboratories), succinic-D₄ acid, myristic-D₂₇ acid, glucose-¹³C₆, and *L*-methionine-(carboxy-¹³C, methyl-D₃) (Sigma Aldrich). Chromatographic peaks were deconvoluted using Unknowns Analysis software (version B.09.00, from

TABLE 1 | Baseline characteristics of the study participants.

Clinical characteristics	No-LTEC (n = 9)	LTEC-losing (n = 20)	LTEC-extreme (n = 13)	p-Value*
Age (years)	37 [34–45]	46 [43–50]	48 [42–51]	0.075
Time of control (years)	2.5 [1.3–3.3]	13.7 [8.6–17.1]	14.3 [13.2–15.6]	<0.001
Male	5 (55.6)	8 (40)	9 (69.2)	0.262
HIV risk factor				0.141
Heterosexual	6 (66.7)	6 (30)	2 (15.4)	
Homo/bisexual	1 (11.1)	2 (10)		
Intravenous drug abuse	2 (22.2)	10 (50)	10 (76.9)	
Other/unknown		2 (10)	1 (7.7)	
CD4+ T-cell count (cells/μl)	724 [430–1029]	756 [646–1041]	830 [522–1028]	0.772
CD4 count slope (cells/month)	–	–0.35 [–1.23 to 0.99]	–1.98 [–2.80 to –1.31]	0.012
HIV viral load (log)	1.6 [1.45–1.7]	1.7 [1.6–1.7]	1.6 [1.3–1.7]	0.337
HCV coinfection (positive)	3 (33.3)	13 (65)	13 (100)	0.003
Active HCV coinfection (positive)	1 (11.1)	10 (50)	10 (77)	0.010

All plasma samples analyzed were obtained before the loss of HIV control (in the case of no-LTEC and LTEC-losing groups) compared to LTEC-extreme. Data are presented as n (%) or median (interquartile range). Categorical data were compared through a χ^2 test, whereas continuous data were compared using the non-parametric Kruskal–Wallis test*. (P values < 0.05 in bold). no-LTEC, no long-term elite controllers; LTEC-losing, long-term elite controllers patients who lost HIV control during follow-up; LTEC-extreme, long-term elite controllers patients maintaining HIV control during the whole follow-up and for more than 10 years.

Agilent, Santa Clara, CA, USA) based on the exact mass. Identification of compounds was tentatively made comparing the mass spectra and retention time of all detected compounds with the Fiehn 2013 Mass Spectral RTL Library and the National Institute of Standards and Technology (NIST) library 11 (2014) libraries also using the Unknowns software. The identity of the main compounds was confirmed with commercial pure standards. After direct (with pure standards) or putative (with library) identification of metabolites, these were semi-quantified in terms of internal standard response ratio. For this relative quantification, the area of specific fragments for each metabolite was divided by the area of its specific internal standard to provide a reliable, accurate, and reproducible relative concentration of metabolites.

Determination of the Lipidomics Profile (Analytical Method)

Lipidomics is a subset of metabolomics considered a dissimilar discipline due to the uniqueness and functional specificity of lipids relative to other metabolites. A total of 114 lipids were identified in plasma samples. The name of each compound is abbreviated as follows: CE for cholesteryl ester, DG for diacylglycerol, LPC for lysophosphocholine, PC for phosphatidylcholine, SM for sphingomyelin, and TG for triacylglycerol. The first number indicates the acyl carbon atoms, and the second indicates the number of unsaturations.

For the extraction of hydrophobic lipids, liquid-liquid extraction with chloroform:methanol (2:1) based on the Folch procedure was performed by adding four volumes of chloroform:methanol (2:1) containing internal standard mixture (Lipidomic SPLASH® Avanti Polar Lipids, Birmingham, AL, USA) with 15:0-18:1(d7) PC, 18:1(d7) LPC, 18:1(d7), Chol Ester, 15:0-18:1 (d7) DG, 15:0-18:1(d7)-15:0 TG and 18:1(d9) SM, among other lipid species) to plasma. Then, the samples were mixed and incubated at -20°C for 30 min. Afterward, 1/10 volumes of NaCl 0.8% were added, and the mixture was centrifuged at 15,000 rpm. The lower phase was recovered, evaporated to dryness, and reconstituted with methanol:methyl-*tert*-butyl ether (9:1) and analyzed on a 1290 Infinity UHPLC coupled to a 6550 qTOF mass spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) in positive electrospray ionization mode. The chromatographic elution consists of a ternary mobile phase containing water (A), methanol (B), 2-propanol (C), and 200 mM of ammonium formate and 2% formic acid (D). The gradient was as follows: 0 min, 10% B, 35% C, and 5% D; 0.5 min, 10% B, 45% C, and 5% D; 1.5 min, 9.5% B, 47.7% C, and 5% D; 1.6 min, 7.5% B, 58.5% C, and 5% D; 5 min, 7% B, 61.2% C, and 5% D; 5.1 min, 4% B, 77.4% C, and 5% D; 7.5 min, 3.5% B, 80% C, and 5% D; 9 min, 3.5% B, 80% C, and 5% D; 9.5 min, 0% B, 100% C, and 0% D; 11.5 min, 0% B, 100% C, and 0% D; 11.6 min, 10% B, 35% C, and 5% D; and 14 min, 10% B, 35% C, and 5% D. The stationary phase was a C18 column (Kinetex EVO C18 Column, 2.6 μm , 2.1 mm \times 100 mm) that allows the sequential elution of the more hydrophobic lipids such as lysophospholipids, SMs, phospholipids, DGs, TGs, and CEs.

To ensure reproducibility during the analysis, a pooled matrix sample was generated by taking a small volume of each experimental sample and was used as a technical replicate throughout the analysis.

The identification of lipid species was performed using the Agilent MassHunter Profinder B.08 software. First, a feature extraction deconvolution was made; then accurate mass and tandem mass spectra, when available, were matched to Metlin-PCDL (2017) from Agilent containing more than 40,000 metabolites and lipids, allowing a mass error of 20 ppm and a score higher than 80 for isotopic distribution. To ensure the tentative characterization, chromatographic behavior of pure standards for each family and corroboration with Lipid Maps database (www.lipidmaps.org) was used to ensure their putative identification. Afterward, matched entities were selected to perform a targeted MS/MS acquisition on the liquid chromatography-quadrupole time of flight-mass spectrometry (LC-qTOF-MS) instrument to corroborate the identification. Lipid species, then, were semiquantified in terms of internal standard response ratio using one internal standard for each lipid family.

Statistical Analysis

Categorical data were compared through a chi-squared test, whereas continuous data were compared using the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U non-parametric tests. Correlations between variables were assessed using Spearman's test. Heatmap analysis of hierarchical clustering comparing LTEC phenotypes, by each quantified lipid species concentration, was performed. The Euclidean distance-metric hierarchical cluster represented patients on vertical lines and candidate lipid families on horizontal lines. The scale from blue (low concentration) to red (high concentration) represents the normalized abundance in arbitrary units. The diagnostic accuracy for predicting individuals belonging to different LTEC phenotypes was evaluated by logistic regression and receiver operating characteristic (ROC) curve analysis.

For metabolomics and lipidomics data analysis, log-transformation was applied to all quantified metabolites to normalize the concentration distributions. Quantitative enrichment analysis (QEA) and pathway analysis were performed using the web-based analytical pipeline MetaboAnalyst 5.0 (14) and log-transformed normalized for uni- and multivariate analyses, high-dimensional feature selection, clustering and supervised classification, functional enrichment, and metabolic pathway analysis. Normalized data were then analyzed using the database Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (15). Significantly altered metabolites were defined by a t-test analysis with a p-value <0.05 and a false discovery rate (FDR) ≤ 0.05 .

The statistical software used was SPSS Software v22 and XLSTAT 2020.5.1.1064. Graphs were generated using GraphPad Prism 5.0. Illustrations were created using the BioRender web server and the web-based analytical MetaboAnalyst 5.0 as indicated in the figure legends. The results were considered statistically significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Characteristics of the Study Participants

A total of 42 HIV-EC were recruited based on the study design shown in **Figure 1**. The clinical and demographic characteristics of patients included in the study are summarized in **Table 1**.

No differences were observed in sex, CD4⁺ T-cell counts, or HIV viral load (log) in the LTEC-extreme group compared to the LTEC-losing group or the no-LTEC group. However, LTEC-extreme patients were older ($p = 0.036$) and showed significantly different transmission routes ($p = 0.031$) than no-LTEC patients. Additionally, our results revealed a higher prevalence of HCV coinfection in the LTEC-extreme group than in the no-LTEC ($p = 0.001$) and LTEC-losing ($p = 0.018$) groups. This higher prevalence of HCV coinfection in the LTEC-extreme group is mainly due to the period of the infection (more than 10 years ago) when the HIV risk factor in this cohort was the majority due to intravenous drug abuse.

Tricarboxylic Acid Cycle Metabolites Were Increased in the Long-Term Elite Controller-Extreme Group Compared to the No-Long-Term Elite Controller Group

A total of 78 metabolites and 114 lipid species were identified in the plasma samples of the study cohort (**Supplementary Tables S1, S2**). Orthogonal principal component analysis (ortho-PCA) of these 78 metabolites showed a high discriminatory ability of metabolomics profile to separate between the LTEC-extreme and the no-LTEC groups (**Figure 2A**). Indeed, relative plasma concentrations of nine metabolites were significantly higher in the LTEC-extreme group than in the no-LTEC group. Metabolic enrichment pathways were evaluated. The metabolomics profile associated with LTEC-extreme confirmed that the TCA cycle ($p = 0.003$), pyruvate metabolism ($p = 0.004$), and glycolysis/gluconeogenesis ($p = 0.005$) (**Figure 2B**) pathways were among the most enriched pathways related to persistent viral and immunological control. Then, among the significant metabolites in the LTEC-extreme group, we found that seven of them were strongly related to the tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) (**Figure 2C**), which could indicate that the Krebs cycle is highly associated with viral control in LTEC-extreme patients. In fact, the combination of these seven metabolites could differentiate perfectly both groups of LTEC phenotype (area under the curve (AUC) = 0.957) (**Figure 2D**).

On the other hand, the ortho-PCA including the 114 lipids identified was unable to differentiate LTEC-extreme from no-LTEC. No significant differences were found between LTEC-extreme and no-LTEC.

The Important Role of Lipid Species in Continuous Viral and Immunological HIV Control in Long-Term Elite Controllers

Then, the metabolomics and lipidomics profiles associated with LTEC-extreme were compared to those associated with LTEC-losing. In this case, ortho-PCA including the 78 metabolites identified was unable to offer a clear differentiation among

groups, which indicated great metabolomics similarity among the two phenotypes of LTEC (**Figure 3A**). Nevertheless, again, higher relative plasma concentrations of metabolites directly related to the TCA cycle were associated with the LTEC-extreme phenotype. Specifically, plasma levels of α -ketoglutaric acid ($p = 0.006$), glyceric acid ($p = 0.04$), oxoproline ($p = 0.027$), and iso-maltoses 1 and 2 ($p = 0.027$ and 0.03) were significantly higher in the LTEC-extreme individuals than in the LTEC-losing individuals. Of interest, plasma glycerol ($p = 0.006$), 3-hydroxyisobutyric acid (3-HIBA) ($p = 0.048$), and urea ($p = 0.036$) relative concentrations were significantly higher in the LTEC-losing group than in the LTEC-extreme group (**Figure 3B**).

On the other hand, ortho-PCA including the 114 lipids identified offered good differentiation among the LTEC-extreme and LTEC-losing groups (**Figure 3C**). In agreement with the ortho-PCA, 45 lipid species were statistically significant between the LTEC-extreme and LTEC-losing samples (**Figure 3D**). Lipids from the SM, PC, TG, and CE families were significantly decreased in the LTEC-extreme group compared to the LTEC-losing group. In fact, the lipidomics profile including these 45 lipid species resulted in a good lipidomics panel with an optimal percentage of separation and an ability to differentiate LTEC-extreme from LTEC-losing (AUC = 0.931) (**Figure 3E**).

Metabolomics/Lipidomics Signatures Related to Long-Term Elite Controller-Extreme Could Be Potential Biomarkers of Long-Term Elite Controller Progression

Finally, to test that the above-described metabolomics and lipidomics signatures could predict the clinical outcome in LTECs, we used the 14 LTEC individuals, defined as LTEC-true, with viral and immunological control during all the follow-up studies that could not be classified as LTEC-extreme or LTEC-losing, due to missing follow-up until 10 years (6.2 ± 0.38 years). Increased plasmatic concentrations of α -ketoglutaric acid, a product of glutaminolysis (**Figure 4A**), were the most representative of persistent natural HIV control in LTEC-extreme (**Figures 2A, 3B**). In fact, relative plasma α -ketoglutaric acid concentrations were significantly higher in LTEC-extreme individuals than in both LTEC-losing and non-LTEC individuals (**Figure 4B**). Hence, we used plasma α -ketoglutaric acid concentrations as a potential distinctive metabolite of the 14 LTEC-true individuals. Our results revealed 4 LTEC-true subjects showing relative plasma α -ketoglutaric acid concentrations around the plasma mean α -ketoglutaric acid relative concentrations previously described for LTEC-extreme (1.24 ± 0.66) (**Figure 4C**). Accordingly, we classified two subgroups of individuals, a group of 4 LTEC-true with the potential capability to become LTEC-extreme and a group of 10 LTEC-true who could probably become LTEC-losing (**Figure 4C**). Thus, these two new groups of LTEC-true were evaluated using an ortho-PCA, which included the lipidomics panel of 45 lipid species related to the spontaneous loss of viral and/or immunological HIV control in LTEC-losing (**Figures 3D, E**). As illustrated in the PCA representation (**Figure 4D**), the LTEC-true group with the

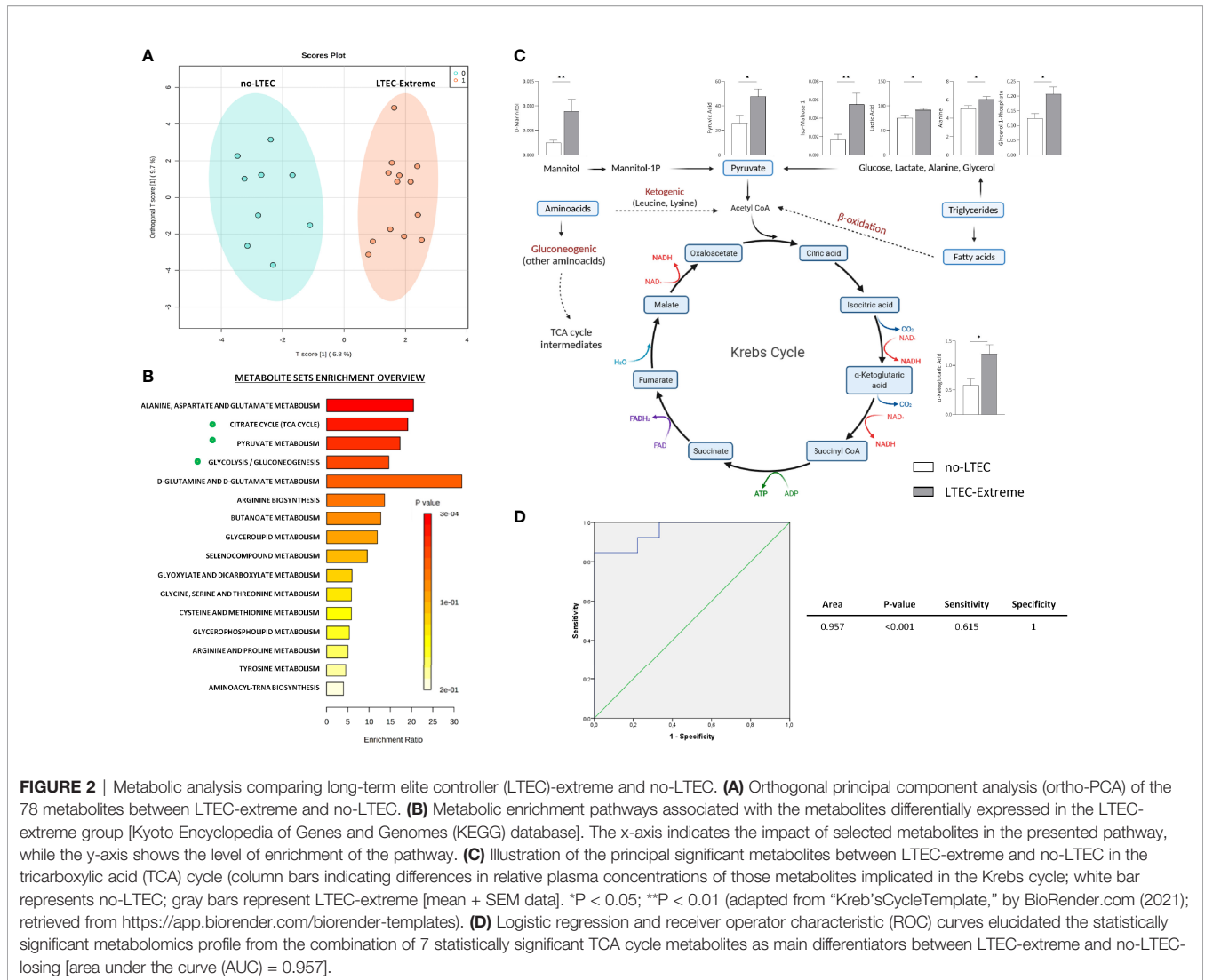


FIGURE 2 | Metabolic analysis comparing long-term elite controller (LTEC)-extreme and no-LTEC. **(A)** Orthogonal principal component analysis (ortho-PCA) of the 78 metabolites between LTEC-extreme and no-LTEC. **(B)** Metabolic enrichment pathways associated with the metabolites differentially expressed in the LTEC-extreme group [Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database]. The x-axis indicates the impact of selected metabolites in the presented pathway, while the y-axis shows the level of enrichment of the pathway. **(C)** Illustration of the principal significant metabolites between LTEC-extreme and no-LTEC in the tricarboxylic acid (TCA) cycle (column bars indicating differences in relative plasma concentrations of those metabolites implicated in the Krebs cycle; white bar represents no-LTEC; gray bars represent LTEC-extreme [mean + SEM data]. *P < 0.05; **P < 0.01 (adapted from “Kreb’sCycleTemplate,” by BioRender.com (2021); retrieved from <https://app.biorender.com/biorender-templates>). **(D)** Logistic regression and receiver operator characteristic (ROC) curves elucidated the statistically significant metabolomics profile from the combination of 7 statistically significant TCA cycle metabolites as main differentiators between LTEC-extreme and no-LTEC-losing [area under the curve (AUC) = 0.957].

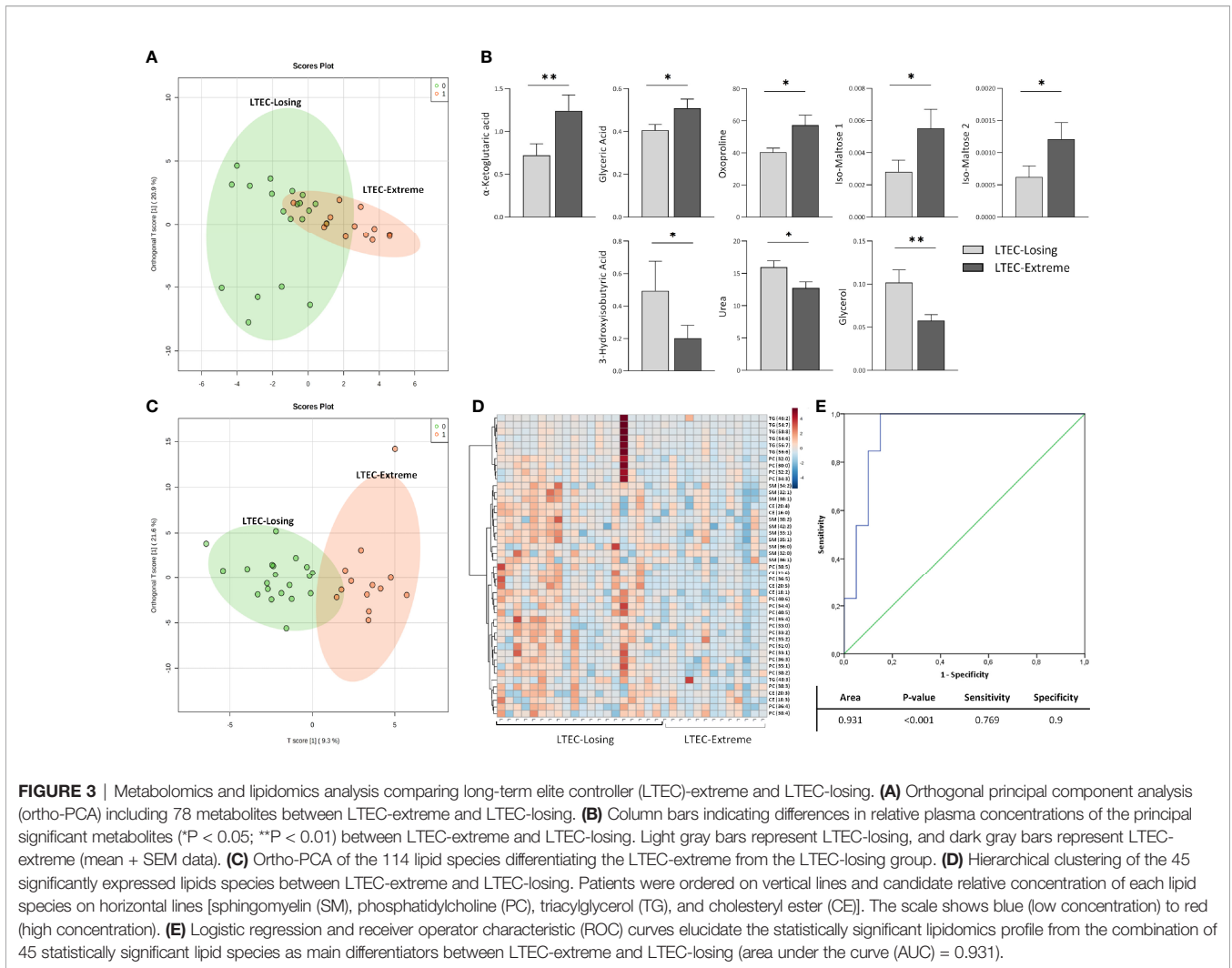
potential capability to maintain viral and immunological HIV control and the LTEC-true group that could probably become LTEC-losing showed clear differentiation. Altogether, these data indicate the feasibility of plasma α -ketoglutaric acid concentrations and the panel of 45 lipid species, including the SM, PC, TG, and CE families, as potential biomarkers for the loss of viral and/or immunological control in LTEC individuals.

DISCUSSION

LTECs are a heterogeneous group of ECs representing subjects who maintain viral control with a stable CD4⁺ immunological state for more than 10 years (1, 16) as well as patients who occasionally lose HIV control at some point in their progression. Multiple studies have already confirmed that metabolic pathways can regulate innate and adaptive host responses to infections (17), but substantial heterogeneity exists in ECs in terms of

virological, immunological, and clinical outcomes. Thus, data on EC phenotypes, such as LTECs, have not yet been fully described. Hence, in this work, our objective was to elucidate the metabolic and lipidomics profiles related to LTEC-extreme to fully understand the mechanism implicated in persistent viral and immunological HIV control. To our knowledge, this extraordinary LTEC phenotype would be useful in the search for a model of functional cure and to decide whether ART is warranted in ECs.

Previously, an immunometabolism study of EC described the strong associations among metabolites, lipid levels, and important immune function parameters associated with spontaneous control of HIV (4). However, the current study identified for the first time metabolomics and lipidomics signatures associated with the persistent viral and immunological control of HIV-1 infection. Some important metabolic pathways described in this article related to continuous viral and immunological HIV control are glycolysis, the TCA cycle, fatty acid metabolism (FAO), and amino acid metabolism (glutaminolysis) (18).



Metabolic pathways related to disturbances in energy metabolism, such as glycolysis, the TCA cycle, and amino acid catabolism, have been previously related to viral control in ECs (19). Previous studies have demonstrated that all of these pathways are targeted during viral infection, characterized by a high demand for energy (20), a decrease in circulating metabolite levels such as glucose, and an increased profile of glycolytic intermediates (glycerol 3P, pyruvate, etc.) (21) in HIV-infected CD4⁺ T cells. Accordingly, our results demonstrated that there was a specific metabolomics profile associated with persistent immunological and viral control in the LTEC-extreme phenotype that was strongly related to critical deregulation of the TCA cycle.

Of note, relative plasma concentrations of α -ketoglutaric acid, a key molecule in the Krebs cycle determining the overall rate of the citric acid cycle in the organism, were significantly increased in LTEC-extreme compared to no-LTEC and LTEC-losing (Figure 4B). Indeed, plasma concentrations of α -ketoglutaric acid showed good clustering within LTEC-true individuals, which could predict the natural evolution of persistent HIV

control. In glutamine metabolism, α -ketoglutarate activates mTOR, a catalytic factor of key cellular pathways regulating cell growth and metabolism that control T-cell activation, differentiation, function, and survival (22). In fact, mTOR has been described as a modulator of HIV latency in Th17 cells in the use of mTOR inhibitors as a potential therapeutic option in decreasing HIV reservoirs and restoring the Th17-mediated immunity at the intestinal level during ART (23, 24). Moreover, increased levels of α -ketoglutaric acid could indicate an antiviral maintained state that impedes HIV replication since the incorporation of α -ketoglutaric acid into the TCA cycle is the major anaplerotic step in proliferating cells (25) (Figure 4A). Furthermore, some studies have proposed that cytotoxic T cells have an important and relevant role in immunological viral control in ECs (specific CD8⁺ T-cell transcriptional profiles in ECs) (26). Although studies failed to sustain a specific antiviral effect of CD8⁺ T cells in ECs, they described activation of related metabolic pathways governed by PI3K/AKT, mTOR, and eIF2, which exhibited regulation of cellular growth, proliferation, and metabolism, as previously mentioned. In this sense, Loucif et al.

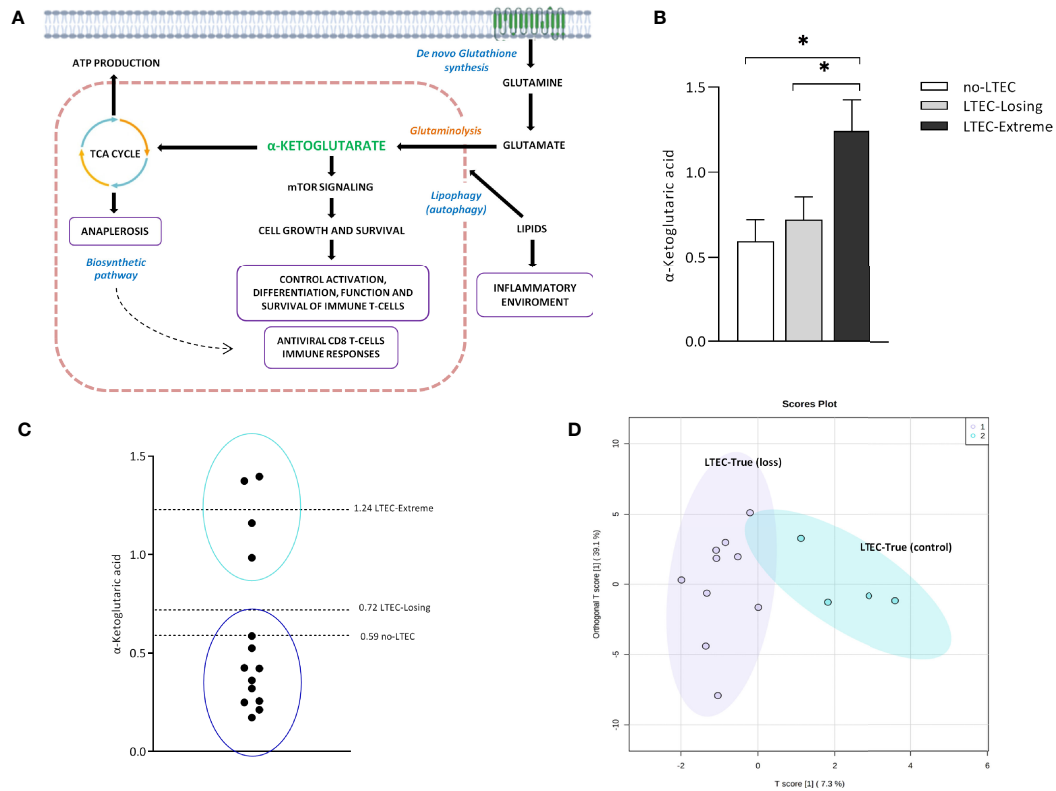


FIGURE 4 | α -Ketoglutaric acid and the lipid panel distinguish two subgroups in long-term elite controller (LTEC)-true. **(A)** Overview of the principal α -ketoglutarate pathways implicated in the antiviral state in the LTEC-extreme patients: mTOR signaling for the control of T immune cells and the biosynthetic pathways in the tricarboxylic acid (TCA) cycle associated with the cell growth and survival. Right: the possible inflammatory environment created by increased lipidic concentrations as the mechanism operating behind the loss of immunological and/or viral control in LTEC-losing patients (created with BioRender.com (2021); retrieved from <https://app.biorender.com/biorender-templates>). **(B)** Increased plasmatic levels of α -ketoglutaric acid in LTEC-extreme compared to other LTEC phenotypical groups (* $P < 0.05$). **(C)** Relative plasmatic concentrations of α -ketoglutaric acid distinguish the classification of two subgroups among the 14 LTEC-true individuals. **(D)** Orthogonal principal component analysis (ortho-PCA) of the combination of 45 lipid species significantly increased in the LTEC-losing group differentiates both subgroups of LTEC-true.

found an association between lipophagy (degradation of endogenous lipids *via* autophagy) as a critical immune mediator to induce functional antiviral CD8⁺ T-cell responses that have an important role in the natural control of HIV-1 infection in ECs (27). Concretely, enhanced lipophagy leads to fuel mitochondrial metabolism due to glutaminolysis and restores protective CD8A T-cell immunity during persistent HIV-1 infection in an IL-21-dependent manner (28, 29). Thus, the plasmatic accumulation of TCA metabolites in LTEC-extreme not only suggests that in proliferating cells the TCA cycle operates as a biosynthetic pathway (anaplerosis) (30, 31) instead of as a purely bioenergetic pathway (Figure 2B), but it could also reflect proliferative and survival states of CD8⁺ T cells as a result of different immune mechanisms underlying natural HIV-1 control. Paradoxically, α -ketoglutarate was one of the increased metabolites in transient controllers before the loss of HIV control compared to the persistent controllers (4). This suggests that α -ketoglutarate could enter the TCA cycle for energy production to compensate for the lack of oxidative Krebs cycle activity. However, the follow-up period of the

transient controllers was only 1 year, compared to the LTEC-extreme phenotype, which can maintain viral and immunological control for more than 10 years. On the other hand, although no significant differences were found in the plasma concentration of lipid species when LTEC-extreme was compared to the no-LTEC group, the lipidomics signature (relative concentration of 45 lipid species) was significantly different in LTEC-losing compared to LTEC-extreme. Our results showed a decreased lipidomics profile in the LTEC-extreme phenotype that could provide a high association between increased relative concentrations of lipidic species and the spontaneous loss of viral and/or immunological control (AUC = 0.931, from a panel of 45 lipid species that differentiated LTEC-losing from LTEC-extreme) (Figure 3D). Lipid processing and transport are affected by inflammatory processes, and many lipid species contribute to inflammation and immune activation and are essential during T-cell differentiation and immune CD8⁺ T-cell responses (32). However, the relationship between the lipidomics profile and the inflammatory state is complex (33). Among the increased

relative plasma concentrations of lipid species that were in the LTEC-losing group, we found TG, PC, and CE. Of note, previous studies suggest an increase in TG concentrations during HIV infection (34, 35), whereas PC indirectly activates the TNF- α signaling cascade (36) *via* PC-derived 1,2-DAG (PC-specific phospholipase C) and acts as a proinflammatory contributor to HIV persistence and rapid post-ART HIV rebound (37). In this sense, El-far et al. previously described the important role of the proinflammatory cytokine IL-32 as a powerful biomarker for control failure in HIV-infected slow progressor subjects. Circulating levels of IL-32 positively correlated with the decline of CD4 T-cell counts, increased viral load, lower CD4/CD8 ratio, and levels of other inflammatory markers (sCD14 and IL-6) (**Figure 4A**) (38). Another study associated the coinfection with cytomegalovirus (CMV) to additional inflammation, leading to CD4 T-cell activation, which contributes to progressive T-cell loss (CD4 T-cell decay) in ECs (39). Thus, according to our results, an increase in the relative concentration of the lipidic profile in the LTEC-losing group could be associated with a sustained inflammatory environment, which in turn would be very advantageous for HIV replication (**Figure 4A**). Furthermore, the combination of these 45 lipid species was a main differentiating factor in the evaluation of LTEC progression.

Our study has several limitations. Although the number of patients per group did not seem to be consistent, LTEC patients are not common, and it is difficult to have a continuous follow-up of more than 10 years for this EC phenotype. Accordingly, with this long period of follow-up for more than 10 years, most of the LTEC-extreme patients had an active HCV coinfection that, although being treated in most cases, was not cured. In this regard, information regarding HLA typing was missing. Other inflammatory-related parameters (such as CMV status, IL-32, or IL-21), immunological recovery factors (CD4/CD8 ratio), or quantitative concentration of some target mitochondrial fuels would have been very useful in the understanding of mechanistic pathways. On the other hand, the association between metabolomics and lipidomics in previous omics studies in ECs was also challenging because of the high diversity of patients included in the LTEC cohort. Designating relative plasma α -ketoglutaric acid concentrations and the panel of 45 lipid species as potential biomarkers of extreme long-term conditions requires a consistent group of LTEC individuals with continuous follow-up. Validation studies are needed.

To conclude, our study reveals a singular metabolomics profile associated with maintained viral and/or immunological control in LTEC-extreme individuals. Notably, elevated plasma concentrations of TCA metabolites in LTEC-extreme were associated with the natural control of HIV infection, especially those metabolites related to glutamine metabolism. On the other hand, the lipidomics pattern is highly associated with the spontaneous loss of viral and/or immunological control in LTEC individuals, with good differentiation of LTEC-losing versus LTEC-extreme. Although the exact mechanism underlying natural HIV control in LTEC-extreme is not fully described, we can hypothesize the importance of metabolites

and/or lipid species in immune metabolism as potential biomarkers among phenotypical groups of LTECs.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

All research protocols were approved and carried out according to the recommendations of the Ethical Committee for Clinical Research following the rules of Good Clinical Practice from the Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (CEIm IISPV, ref. 041/2018). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors have seen and approved the submitted version of the manuscript. The author's contributions are as follows: experimental design (JM, NR, SR, GG-P, JB, ER-M, and AR) and intellectual guidance (NR, JB, CV, JA, FG-B, ER-M, MN, JO, JAP, FV, JP, and AR); recruitment of participants (JM, NR, EY, MO, JB, ER-M, MV, AM, FV, and AR) and sample procurement (JM and VA); data collection (NR, JB, ER-M, FV, JP, and AR); data analysis and interpretation (JM, NR, JB, ER-M, and AR); manuscript preparation (JM, NR, JB, ER-M, FV, AR, and JP). JM, NR, JB, ER-M, FV, AR, and JP were responsible for the study design, data analysis, and article development. NR, JB, ER-M, FV, and AR reviewed and edited the manuscript.

FUNDING

This work was supported by the Fondo de Investigación Sanitaria [PI13/0796, PI16/00503, PI16/0684, PI18/1532, PI19/00004, PI19/01127, PI19/01337, PI16/001769, PI19/00973, and PI20/00326]-ISCIII-FEDER (co-funded by the European Regional Development Fund/European Social Fund; "A way to make Europe"/"Investing in your future"); Programa de Suport als Grups de Recerca AGAUR (2017SGR948); Gilead Fellowship Program GLD14/293; The SPANISH AIDS Research Network [RD16/0002/0001, RD16/0002/0002, RD16/0025/0006, RD16/0025/0013, and RD16/0025/0020]-ISCIII-FEDER (Spain); and the Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas-ISCIII [CB21/13/00015, CB21/13/00020, and CB21/13/00044], Madrid, Spain. JM is supported by the Universitat Rovira I Virgili under grant agreement "2019PMF-PIPF-18," through the call "Martí Franquès Research Fellowship Programme." NR is a Miguel Servet researcher from the ISCIII

[CPII19/00025]. EY is supported by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) under grant agreement “FI20/0011800” through the program “Contratos Predoctorales de Formación en Investigación en Salud.” ER-M was supported by the Spanish National Research Council (CSIC). FV is supported by grants from the Programa de Intensificación de Investigadores (INT20/00031)-ISCIII and by “Premi a la Trajectòria Investigadora als Hospitals de l'ICS 2018.” AR is supported by IISPV through the project “2019/IISPV/05” (Boosting Young Talent), by GeSIDA through the “III Premio para Jóvenes Investigadores 2019,” and by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) under grant agreement “CP19/00146” through the Miguel Servet Program.

ACKNOWLEDGMENTS

This study would not have been possible without the collaboration of all the patients and medical and nursing staff who have taken part in the project. We want to particularly acknowledge the Spanish HIV BioBank integrated with the Spanish AIDS Research Network (RIS) and collaborating centers for the generous gifts of clinical samples provided (see **Annex 1 in the Supplementary Material**). The Spanish HIV

BioBank is supported by Instituto de Salud Carlos III, Spanish Health Ministry (Grant no. RD06/0006/0035, RD12/0017/0037 and RD16/0025/0019) as part of the Plan Nacional R + D + I and cofinanced by ISCIII-Subdirección General de Evaluación y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). The RIS Cohort (CoRIS) is funded by the Instituto de Salud Carlos III through the Red Temática de Investigación Cooperativa en SIDA (RIS C03/173, RD12/0017/0018 and RD16/0002/0006) as part of the Plan Nacional R+D+I and cofinanced by ISCIII-Subdirección General de Evaluación y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). We also thank Maria Guirro, Salvador Fernández, and Antoni del Pino from the Proteomics and Metabolomics Facilities of the Centre for Omic Sciences (COS) Joint Unit of the Universitat Rovira I Virgili-Eurecat for their contribution to mass spectrometry analyses.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.822272/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Navarrete-Muñoz MA, Restrepo C, Benito JM, Rallón N. Elite Controllers: A Heterogeneous Group of HIV-Infected Patients. *Virulence* (2020) 11:889. doi: 10.1080/21505594.2020.1788887
- Deeks SG, Walker BD. Human Immunodeficiency Virus Controllers: Mechanisms of Durable Virus Control in the Absence of Antiretroviral Therapy. *Immunity* (2007) 27:406–16. doi: 10.1016/j.immuni.2007.08.010
- Autran B, Descours B, Avettand-Fenoel V, Rouzioux C. Elite Controllers as a Model of Functional Cure. *Curr Opin HIV AIDS* (2011) 6:181–7. doi: 10.1097/COH.0b013e328345a328
- 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. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.03.004
- Rodríguez-Gallego E, Tarancon-Diez L, García F, Del Romero J, Benito JM, Alba V, et al. Proteomic Profile Associated With Loss of Spontaneous Human Immunodeficiency Virus Type 1 Elite Control. *J Infect Dis* (2019) 219:867–76. doi: 10.1093/infdis/jiy599
- Pernas M, Tarancon-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* (2018) 92:e01805–17. doi: 10.1128/jvi.01805-17
- Pereyra F, Addo MM, Kaufmann DE, Liu Y, Miura T, Rathod A, et al. Genetic and Immunologic Heterogeneity Among Persons Who Control HIV Infection in the Absence of Therapy. *J Infect Dis* (2008) 197:563–71. doi: 10.1086/526786
- Grabar S, Selinger-Leneman H, Abgrall S, Pialoux G, Weiss L, Costagliola D. Prevalence and Comparative Characteristics of Long-Term Nonprogressors and HIV Controller Patients in the French Hospital Database on HIV. *AIDS* (2009) 23:1163–9. doi: 10.1097/QAD.0b013e32832b44c8
- Ruiz-Mateos E, Poveda E, MM L. Antiretroviral Treatment for HIV Elite Controllers? *Pathog Immun* (2020) 5:121–33. doi: 10.20411/PAI.V5I1.364
- Masip J, Gasca-Capote C, Jimenez-Leon MR, Peraire J, Perez-Gomez A, Alba V, et al. Differential miRNA Plasma Profiles Associated With the Spontaneous Loss of HIV-1 Control: miR-199a-3p and its Potential Role as a Biomarker for Quick Screening of Elite Controllers. *Clin Transl Med* (2021) 11:e474. doi: 10.1002/CTM2.474
- 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) 10:1902. doi: 10.1038/s41598-020-58696-Y
- Leon A, Perez I, Ruiz-Mateos E, Benito JM, Leal M, Lopez-Galindez C, et al. Rate and Predictors of Progression in Elite and Viremic HIV-1 Controllers. *AIDS* (2016) 30:1209–20. doi: 10.1097/QAD.0000000000001050
- Kind T, Wohlgenuth G, Lee DY, Lu Y, Palazoglu M, Shahbaz S, et al. FiehnLib: Mass Spectral and Retention Index Libraries for Metabolomics Based on Quadrupole and Time-of-Flight Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Anal Chem* (2009) 81:10038–48. doi: 10.1021/AC9019522
- Pang Z, Chong J, Zhou G, De Lima Morais DA, Chang L, Barrette M, et al. MetaboAnalyst 5.0: Narrowing the Gap Between Raw Spectra and Functional Insights. *Nucleic Acids Res* (2021) 49:W388–96. doi: 10.1093/nar/gkab382
- Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res* (2000) 28:27–30. doi: 10.1093/nar/28.1.27
- López-Galindez C. HIV Long-Term Non-Progressors Elite Controllers: An Interplay Between Host, Immune and Viral Factors. *Future Virol* (2019) 14:287–97. doi: 10.2217/FVL-2018-0207
- Mathis D, Shoelson SE. Immunometabolism: An Emerging Frontier. *Nat Rev Immunol* (2011) 11:81. doi: 10.1038/NRI2922
- Sáez-Cirión A, Sereti I. Immunometabolism and HIV-1 Pathogenesis: Food for Thought. *Nat Rev Immunol* (2020) 21:5–19. doi: 10.1038/s41577-020-0381-7. 2020 211.
- 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) 415:153–9. doi: 10.1016/j.virol.2011.04.007
- Shoji-Kawata S, Levine B. Autophagy, Antiviral Immunity, and Viral Countermeasures. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* (2009) 1793:1478–84. doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.02.008
- 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) 28:297–309. doi: 10.1097/QAD.0000000000000128
- Chi H. Regulation and Function of mTOR Signaling in T Cell Fate Decisions. *Nat Rev Immunol* (2012) 12:325–38. doi: 10.1038/nri3198
- Planas D, Zhang Y, Monteiro P, Goulet JP, Gosselin A, Grandvaux N, et al. HIV-1 Selectively Targets Gut-Homing CCR6+CD4+ T Cells via

- mTOR-Dependent Mechanisms. *JCI Insight* (2017) 2:e93230. doi: 10.1172/JCI.INSIGHT.93230
24. Planas D, Pagliuzza A, Ponte R, Fert A, Marchand LR, Massanella M, et al. LILAC Pilot Study: Effects of Metformin on mTOR Activation and HIV Reservoir Persistence During Antiretroviral Therapy. *EBioMedicine* (2021) 65:103270. doi: 10.1016/j.EBIOM.2021.103270/ATTACHMENT/8BD22FE6-D066-4D98-B822-6C0665C0A542/MMC4.PDF
 25. Durán RV, Oppliger W, Robitaille AM, Heiserich L, Skendaj R, Gottlieb E, et al. Glutaminolysis Activates Rag-Mtorc1 Signaling. *Mol Cell* (2012) 47:349–58. doi: 10.1016/j.molcel.2012.05.043
 26. Chowdhury FZ, Ouyang Z, Buzon M, Walker BD, Lichterfeld M, Yu XG. Metabolic Pathway Activation Distinguish Transcriptional Signatures of CD8 + T Cells From HIV-1 Elite Controllers HHS Public Access. *AIDS* (2018) 32:2669–77. doi: 10.1097/QAD.0000000000002007
 27. Turk G, Seiger K, Lian X, Sun W, Parsons EM, Gao C, et al. A Possible Sterilizing Cure of HIV-1 Infection Without Stem Cell Transplantation. *Ann Intern Med* (2022) 175:95–100. doi: 10.7326/L21-0297
 28. Loucif H, Dagenais-Lussier X, Avizonis D, Choinière L, Beji C, Cassin L, et al. Autophagy-Dependent Glutaminolysis Drives Superior IL21 Production in HIV-1-Specific CD4 T Cells. *Autophagy* (2021) 1–18. doi: 10.1080/15548627.2021.1972403
 29. Loucif H, Dagenais-Lussier X, Beji C, Cassin L, Jrade H, Tellitchenko R, et al. Lipophagy Confers a Key Metabolic Advantage That Ensures Protective CD8A T-Cell Responses Against HIV-1. *Autophagy* (2021) 17:3408–23. doi: 10.1080/15548627.2021.1874134
 30. Owen OE, Kalhan SC, Hanson RW. The Key Role of Anaplerosis and Cataplerosis for Citric Acid Cycle Function. *J Biol Chem* (2002) 277:30409–12. doi: 10.1074/jbc.R200006200
 31. Yang C, Ko B, Hensley CT, Jiang L, Wasti AT, Kim J, et al. Glutamine Oxidation Maintains the TCA Cycle and Cell Survival During Impaired Mitochondrial Pyruvate Transport. *Mol Cell* (2014) 56:414–24. doi: 10.1016/j.molcel.2014.09.025
 32. Tall AR, Yvan-Charvet L. Cholesterol, Inflammation and Innate Immunity. *Nat Rev Immunol* (2015) 15:104–16. doi: 10.1038/nri3793
 33. Bowman ER, Kulkarni M, Gabriel J, Cichon MJ, Riedl K, Belury MA, et al. Altered Lipidome Composition Is Related to Markers of Monocyte and Immune Activation in Antiretroviral Therapy Treated Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection and in Uninfected Persons. *Front Immunol* (2019) 0:785. doi: 10.3389/FIMMU.2019.00785
 34. Grunfeld C. Dyslipidemia and its Treatment in HIV Infection. *Top HIV Med* (2010) 18:112–8.
 35. El-Sadr WM, Mullin CM, Carr A, Gibert C, Rappoport C, Visnegarwala F, et al. Effects of HIV Disease on Lipid, Glucose and Insulin Levels: Results From a Large Antiretroviral-Naïve Cohort. *HIV Med* (2005) 6:114–21. doi: 10.1111/j.1468-1293.2005.00273.x
 36. Schütze S, Wiegmann K, Machleidt T, Krönke M. TNF-Induced Activation of NF- κ B. *Immunobiology* (1995) 193:193–203. doi: 10.1016/S0171-2985(11)80543-7
 37. Giron LB, Papasavvas E, Yin X, Goldman AR, Tang HY, Palmer CS, et al. Phospholipid Metabolism Is Associated With Time to Hiv Rebound Upon Treatment Interruption. *MBio* (2021) 12:1–6. doi: 10.1128/mBio.03444-20
 38. El-Far M, Kouassi P, Sylla M, Zhang Y, Fouda A, Fabre T, et al. Proinflammatory Isoforms of IL-32 as Novel and Robust Biomarkers for Control Failure in HIV-Infected Slow Progressors. *Sci Rep* (2016) 6:22902. doi: 10.1038/SREP22902
 39. Isnard S, Ramendra R, Lin J, Kant S, Fombuena B, Ouyang J, et al. Anti-Cytomegalovirus Immunoglobulin G Is Linked to CD4 T-Cell Count Decay in Human Immunodeficiency Virus (HIV) Elite Controllers. *Clin Infect Dis* (2021) 73:144–7. doi: 10.1093/CID/CIAA1129
- Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.
- Copyright © 2022 Masip, Rallón, Yeregui, Olona, Resino, Benito, Viladés, García-Pardo, Alcamí, Ruiz-Mateos, Gómez-Bertomeu, Vargas, Navarro, Oteo, Pineda, Martí, Alba, Vidal, Peraire and Rull. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Supplementary Material

Elevated α -ketoglutaric acid concentrations and a lipid-balanced signature are the key factors in long-term HIV control

Jenifer Masip^{1,2,3}, Norma Rallón^{4,5}, Elena Yeregui^{2,3}, Montserrat Olona^{1,2,3}, Salvador Resino^{6,7}, José M Benito^{4,5}, Consuelo Viladés^{1,2,3,7}, Graciano García-Pardo^{1,2,3}, José Alcami^{7,8,9}, Ezequiel Ruiz-Mateos¹⁰, Frederic Gómez-Bertomeu^{1,3}, Montserrat Vargas^{1,3}, Marta Navarro¹¹, José A. Oteo¹², Juan A. Pineda¹³, Anna Martí^{1,2,3}, Verónica Alba^{1,2,3}, Francesc Vidal^{1,2,3,7}, Joaquin Peraire^{1,2,3,7*†}, Anna Rull^{1,2,3,7*†}, On behalf of ECRIS integrated in the Spanish AIDS Research Network

1 Additional information

Table S1. List of the 78 metabolites identified in the study, including Human Metabolome Database ID, Retention time (RT), quantitative and qualitative ions and internal standard used. **Table S2.** List of the 114 lipid species identified in the study.

Table S2. List of the 114 lipid species identified in the study, including parental ion, m/z and retention time.

Table S3. Relative concentrations of the 45 lipid species increased in the LTEC-losing group when compared to the LTEC-extreme individuals.

Supplementary Figure 1. Overlapped extracted ion chromatograms (EIC) of metabolites analyzed by GC-EI-QTOF-MS.

Supplementary Figure 2. Overlapped extracted ion chromatograms (EIC) of lipids analyzed by LC-ESI-QTOF-MS using the accurate mass (m/z) from pseudomolecular ions. LCP, lysophosphatidylcholines; PC, phosphatidylcholines; SM, sphingomyelins; DG, diglyceride; ChoE/CE, cholesteroyl esthers; TG, triglycerides.

2 ECRIS integrated in the Spanish AIDS Research Network

1 Additional information

Table S1. List of the 78 metabolites identified in the study, including Human Metabolome Database ID, Retention time (RT), quantitative and qualitative ions and internal standard used.

Metabolite/Internal Standard	Human Metabolome Database	RT (min)	M ⁺ (m/z) (Quantitative)	M ⁺ (m/z) (Qualitative)	Internal standard
2-Hydroxybutyric acid	HMDB0000008	6.87	131.0895	205.106	Succinic-d ₄ acid
2-Hydroxyisobutyric acid	HMDB0000729	5.91	131.0895	205.106	Succinic-d ₄ acid
2-Hydroxyisovaleric acid	HMDB0000407	7.39	145.1061	147.0672	Succinic-d ₄ acid
3-hydroxybutyric acid / 3-hydroxyisobutyric acid	HMDB0000357/ HMDB0062640	7.31	117.0731	191.0925	Succinic-d ₄ acid
3-Hydroxyisovaleric acid	HMDB0000407	8.02	131.0859	205.1086	Succinic-d ₄ acid
4-Hydroxybenzoic acid	HMDB0000500	13.41	223.101	267.0912	Succinic-d ₄ acid
4-hydroxyphenyllactic acid	HMDB0000755	16.26	179.0902	308.116	Succinic-d ₄ acid
4-Hydroxyproline	HMDB0000725	12.28	230.1434	140.0919	L-Proline ¹³ C ₅
Alanine	HMDB0000161	6.45	116.0916	190.1094	L-Alanine ¹³ C ₃
alpha-Ketoglutaric acid	HMDB0000208	12.82	198.0622	288.1119	Succinic-d ₄ acid
alpha-Tocopherol	HMDB0001893	26.30	237.1337	502.4279	Glucose- ¹³ C ₆
Aspartic acid	HMDB0000191	12.23	232.13	218.1075	L-Aspartic acid ¹³ C ₄
Benzoic acid	HMDB0001870	8.51	179.0559	135.0652	Succinic-d ₄ acid
Citric acid	HMDB0000094	15.71	273.105	347.1215	Succinic-d ₄ acid
Creatinine	HMDB0000562	12.61	115.0841	329.1847	L-Proline ¹³ C ₅
d-Arabinose	HMDB0029942	14.06	307.1622	277.1497	Glucose- ¹³ C ₆
Decanoic acid	HMDB0000511	11.29	229.1615		Myristic-d ₂₇ acid
d-Fructose	HMDB0000660	16.36	307.165	103.06	Glucose- ¹³ C ₆
d-Galactitol	HMDB0000107	17.19	319.1675	307.1653	Glucose- ¹³ C ₆
d-Gluconic acid	HMDB0000625	17.35	292.1385	333.1434	Glucose- ¹³ C ₆
d-Maltose	HMDB0000163	23.72	361.179	204.1134	Glucose- ¹³ C ₆
d-Maltose (isomer)	HMDB0000163	23.81	361.179	204.1134	Glucose- ¹³ C ₆
d-Mannitol	HMDB0000765	16.95	319.1675	307.1653	Glucose- ¹³ C ₆
d-Mannonic acid	HMDB0242119	17.10	333.1434	292.1385	Glucose- ¹³ C ₆
Dodecanoic acid	HMDB0000638	13.64	257.1941		Myristic-d ₂₇ acid
d-Sucrose	HMDB0000258	23.18	361.179	204.1134	Glucose- ¹³ C ₆
d-Threitol	HMDB0004136	12.16	204.107	117.0412	Glucose- ¹³ C ₆
d-Xylose	HMDB0000098	13.89	307.1622	277.1497	Glucose- ¹³ C ₆
Erythronic acid	HMDB0000613	12.61	217.1142	117.0401	Glucose- ¹³ C ₆
Ethanolamine	HMDB0000149	8.85	174.1147	262.1472	L-Valine ¹³ C ₅
Fumaric acid	HMDB0000134	9.93	245.0752	217.0746	Succinic-d ₄ acid
Galactonic acid	HMDB0000565	17.43	292.1395		Glucose- ¹³ C ₆
Galacturonic acid	HMDB0003363	17.18	333.1434	292.1385	Glucose- ¹³ C ₆

Glutamic acid	HMDB0000148	13.41	246.1392	230.1061	L-Glutamic ¹³ C ₅
Glutamine	HMDB0000641	15.17	156.0847	245.1485	L-Glutamic ¹³ C ₅
Glyceric acid	HMDB0000139	9.79	189.0782	292.1363	Succinic-d ₄ acid
Glycerol	HMDB0000131	9.00	218.1185		Glucose- ¹³ C ₆
Glycerol-1-phosphate	HMDB0000126	15.11	299.0801	357.1222	Glucose- ¹³ C ₆
Glycine	HMDB0000123	9.41	174.1153	248.1331	Glycine ¹³ C ₂
Glycolic acid	HMDB0000115	6.04	177.0764	131.0353	Succinic-d ₄ acid
Heptanoic acid	HMDB0000666	7.34	187.1148		Myristic-d ₂₇ acid
Hexanoic acid	HMDB0000535	5.934	173.1005		Myristic-d ₂₇ acid
Hippuric acid	HMDB0000714	15.73	105.0373	206.1045	Succinic-d ₄ acid
Indole-3-propanoic acid	HMDB0002302	18.19	202.1095	333.1607	Succinic-d ₄ acid
Indolelactic acid	HMDB0000671	19.14	202.1064		Succinic-d ₄ acid
Isoleucine	HMDB0000172	9.24	158.1404	218.1063	L-Isoleucine ¹³ C ₆
Lactic acid	HMDB0144295	5.83	190.088	117.0767	Succinic-d ₄ acid
Leucine	HMDB0000687	8.94	158.1432	218.1053	L-Leucine ¹³ C ₆
Linoleic acid	HMDB0000673	19.258	117.0382	337.2654	Myristic-d ₂₇ acid
Malic acid	HMDB0000744	11.85	233.1045	245.0686	Succinic-d ₄ acid
meso-Erythritol	HMDB0002994	12.06	204.107	117.0412	Glucose- ¹³ C ₆
Methionine	HMDB0033951	12.15	128.0909	176.0949	Methionine ¹³ C ₅
myo-Inositol	HMDB0000211	18.48	318.1569	305.1495	Glucose- ¹³ C ₆
Nonanoic acid	HMDB0000847	10.04	215.1464		Myristic-d ₂₇ acid
Octanoic acid	HMDB0000482	8.72	201.1311		Myristic-d ₂₇ acid
Oleic acid	HMDB0000207	19.32	117.0382	339.2795	Myristic-d ₂₇ acid
Oleic acid (isomer)	HMDB0000207	19.3566	117.0382		Myristic-d ₂₇ acid
Ornithine	HMDB0000214	15.63	142.1063	174.1163	L-Glutamic ¹³ C ₅
Oxalic acid	HMDB0002329	6.912	131.0353	175.0616	Succinic-d ₄ acid
Oxoproline	HMDB0000267	12.21	156.0853	230.1032	L-Proline ¹³ C ₅
Palmitic acid	HMDB0000220	17.73	117.0382	313.2578	Myristic-d ₂₇ acid
Phenylalanine	HMDB0000159	13.47	218.105	192.1222	L-Phenylalanine ¹³ C ₉
Phosphoric acid	HMDB0001488	9.13	299.0788		Succinic-d ₄ acid
Pipecolic acid	HMDB0000070	10.17	156.122	230.1397	L-Serine ¹³ C ₃
Proline	HMDB0000162	9.27	142.1082	216.1261	L-Proline ¹³ C ₅
Pyruvic acid	HMDB0000243	5.68	174.0629	89.0438	Succinic-d ₄ acid
Ribonic acid	HMDB0000867	15.31	292.1424	333.1432	Glucose- ¹³ C ₆
Saccharic acid	HMDB0000663	17.68	292.1385	333.1434	Glucose- ¹³ C ₆
Sarcosine	HMDB0000271	6.95	116.0909	190.1089	L-Alanine ¹³ C ₃
Serine	HMDB0000187	10.18	204.1316	218.1084	L-Serine ¹³ C ₃
Stearic acid	HMDB0000827	19.52	117.0382	341.2983	Myristic-d ₂₇ acid
Succinic acid	HMDB0000254	9.46	247.0851	147.0702	Succinic-d ₄ acid

Tetradecanoic acid	HMDB0000806	15.776	285.2254		Myristic-d ₂₇ acid
Threonic acid	HMDB0000943	12.55	292.1383	220.098	Succinic-d ₄ acid
Threonine	HMDB0000167	10.55	218.1053	117.0738	L-Threonine ¹³ C ₄
Urea	HMDB0000294	8.45	189.0909	171.0786	Glycine ¹³ C ₂
Uric acid	HMDB0000289	18.51	441.1685	456.1901	Succinic-d ₄ acid
Valine	HMDB0000883	8.13	144.1229	218.1131	L-Valine ¹³ C ₅
L-Alanine ¹³C₃	-	6.40	119.096		-
L-Valine ¹³C₅	-	8.06	149.1347		-
L-Leucine ¹³C₆	-	8.86	164.1546		-
L-Isoleucine ¹³C₆	-	9.17	164.1573		-
L-Proline ¹³C₅	-	9.16	221.1068		-
Glycine ¹³C₂	-	9.34	176.1242		-
L-serine ¹³C₃	-	10.11	207.1323		-
L-Threonine ¹³C₄	-	10.48	222.1371		-
L-Methionine-(carboxy-¹³C, methyl-D₃)	-	12.10	132.0988		-
L-Aspartic acid ¹³C₄	-	12.16	236.1305		-
L-Glutamic ¹³C₅	-	13.34	251.1492		-
L-Phenylalanine ¹³C₉	-	13.40	201.1486		-
Succinic-d₄ acid	-	9.34	251.1121		-
Glucose-¹³C₆	-	16.64	323.1732		-
L-Alanine ¹³C₃	-	6.40	119.096		-

Table S2. List of the 114 lipid species identified in the study, including parental ion, *m/z* and retention time.

Lipid	Parent ion	<i>m/z</i>	Retention time (min)
CE 16:0	[M+Na] ⁺	647.5738	9.04
CE 16:1	[M+Na] ⁺	645.5581	8.62
CE 17:1	[M+Na] ⁺	659.5738	8.90
CE 18:0	[M+Na] ⁺	675.6051	9.60
CE 18:1	[M+Na] ⁺	673.5894	9.10
CE 18:2	[M+Na] ⁺	671.5738	8.80
CE 18:3	[M+Na] ⁺	669.5581	8.50
CE 20:2	[M+Na] ⁺	699.6051	9.30
CE 20:3	[M+Na] ⁺	697.5894	8.96
CE 20:4	[M+Na] ⁺	695.5738	8.65
CE 20:5	[M+Na] ⁺	693.5581	8.40
CE 22:4	[M+Na] ⁺	723.6051	9.08
CE 22:5	[M+Na] ⁺	721.5894	8.87
CE 22:6	[M+Na] ⁺	719.5738	8.59
DG 34:1	[M+Na] ⁺	617.5115	6.51
DG 34:2	[M+Na] ⁺	615.4959	6.26
DG 34:3	[M+Na] ⁺	613.4802	6.14
DG 36:1	[M+Na] ⁺	645.5434	6.70
DG 36:2	[M+Na] ⁺	643.5272	6.51
DG 36:3	[M+Na] ⁺	641.5115	6.34
DG 36:4	[M+Na] ⁺	639.4959	6.15
DG 40:4	[M+Na] ⁺	695.5591	8.26
LPC 15:0	[M+H] ⁺	482.3241	1.47
LPC 16:0	[M+H] ⁺	496.3398	1.68
LPC 16:0 e	[M+H] ⁺	482.3605	1.86
LPC 16:1 e	[M+H] ⁺	480.3449	1.86
LPC 18:0	[M+H] ⁺	524.3711	2.13
LPC 18:0 e	[M+H] ⁺	510.3918	2.35
LPC 18:1	[M+H] ⁺	522.3554	1.79
LPC 18:2	[M+H] ⁺	520.3398	1.56
LPC 20:0	[M+H] ⁺	552.4024	2.64
LPC 20:2	[M+H] ⁺	548.3711	1.94
LPC 20:3	[M+H] ⁺	546.3554	1.72
PC 30:0	[M+H] ⁺	706.5381	3.80
PC 31:0	[M+H] ⁺	720.5538	4.05
PC 32:0	[M+H] ⁺	734.5694	4.32
PC 32:1	[M+H] ⁺	732.5538	3.96
PC 32:2	[M+H] ⁺	730.5381	3.76
PC 33:0	[M+H] ⁺	748.5851	4.51

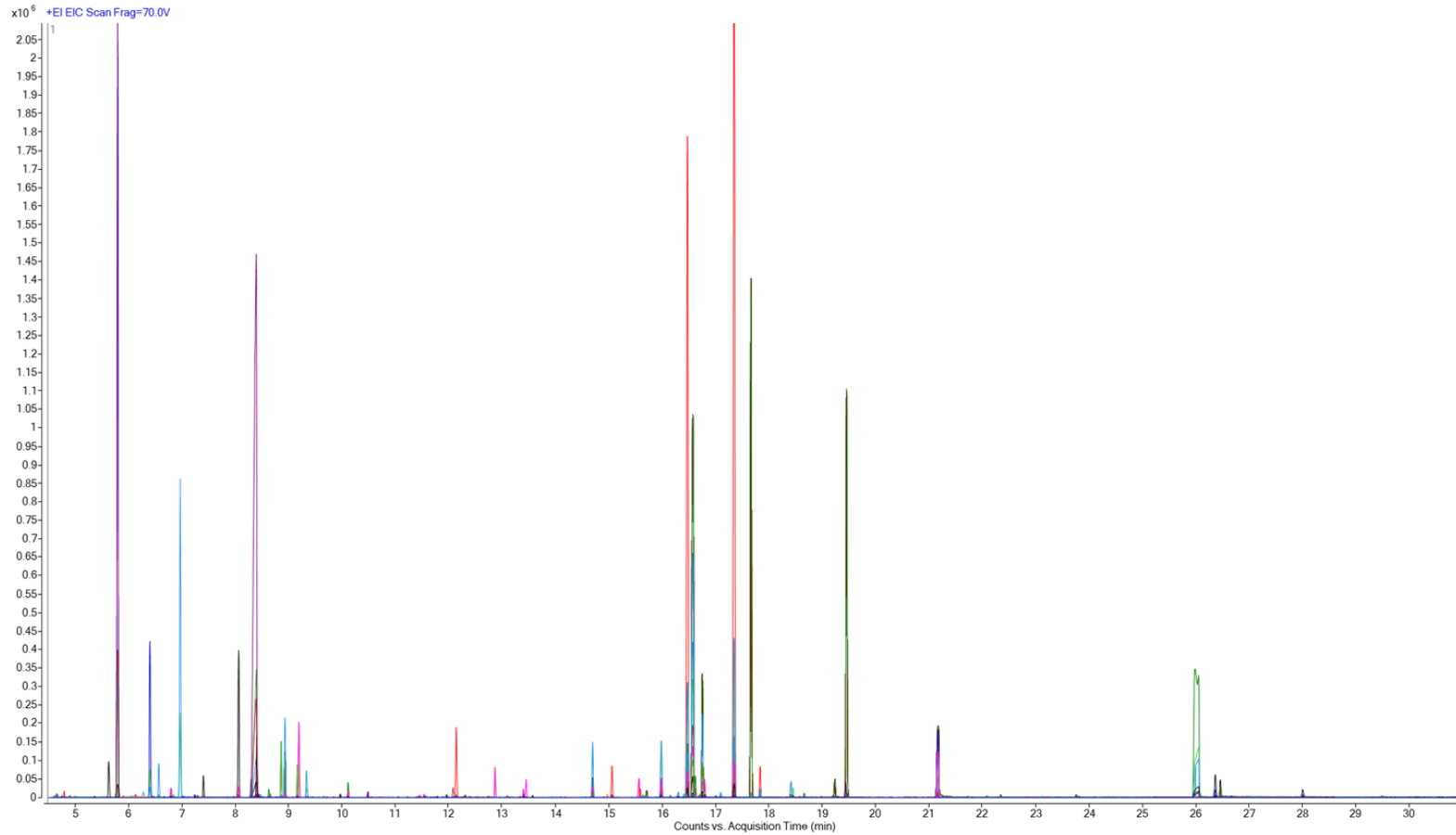
PC 33:1	[M+H] ⁺	746.5694	4.21
PC 33:2	[M+H] ⁺	730.5381	3.67
PC 34:0	[M+H] ⁺	762.6008	4.99
PC 34:1	[M+H] ⁺	760.5851	4.50
PC 34:2	[M+H] ⁺	758.5694	4.16
PC 34:3	[M+H] ⁺	756.5538	3.81
PC 34:4	[M+H] ⁺	754.5381	3.71
PC 35:1	[M+H] ⁺	774.6007	4.83
PC 35:2	[M+H] ⁺	772.5851	4.45
PC 35:4	[M+H] ⁺	768.5538	4.21
PC 36:1	[M+H] ⁺	788.6164	5.23
PC 36:2	[M+H] ⁺	786.6007	4.79
PC 36:3	[M+H] ⁺	784.5851	4.39
PC 36:4	[M+H] ⁺	782.5694	4.22
PC 36:5	[M+H] ⁺	780.5538	4.16
PC 38:2	[M+H] ⁺	814.632	5.48
PC 38:3	[M+H] ⁺	812.6164	5.09
PC 38:4	[M+H] ⁺	810.6007	4.87
PC 38:5	[M+H] ⁺	808.5851	4.36
PC 38:6	[M+H] ⁺	806.5694	4.22
PC 40:4	[M+H] ⁺	838.632	5.45
PC 40:5	[M+H] ⁺	836.6164	5.03
PC 40:6	[M+H] ⁺	834.6007	4.87
SM 32:0	[M+H] ⁺	677.5592	3.46
SM 32:1	[M+H] ⁺	675.5436	3.31
SM 32:2	[M+H] ⁺	673.5279	3.10
SM 33:1	[M+H] ⁺	689.5592	3.50
SM 34:1	[M+H] ⁺	703.5749	3.70
SM 34:2	[M+H] ⁺	701.5592	3.44
SM 35:1	[M+H] ⁺	717.5905	3.94
SM 36:0	[M+H] ⁺	733.6218	4.42
SM 36:1	[M+H] ⁺	731.6062	4.19
SM 36:2	[M+H] ⁺	729.5905	3.87
SM 38:1	[M+H] ⁺	759.6375	4.85
SM 38:2	[M+H] ⁺	757.6218	4.43
SM 39:1	[M+H] ⁺	773.6531	5.28
SM 40:1	[M+H] ⁺	787.6688	5.70
SM 40:2	[M+H] ⁺	785.6531	5.17
SM 41:1	[M+H] ⁺	801.6844	6.11
SM 41:2	[M+H] ⁺	799.6688	5.62
SM 42:1	[M+H] ⁺	815.7001	6.29
SM 42:2	[M+H] ⁺	813.6844	5.79
SM 42:3	[M+H] ⁺	811.6688	5.24

SM 43:1	[M+H] ⁺	829.7157	6.38
SM 43:2	[M+H] ⁺	827.7001	6.04
TG 46:0	[M+NH ₄] ⁺	796.7389	8.40
TG 46:1	[M+NH ₄] ⁺	794.7232	8.13
TG 46:2	[M+NH ₄] ⁺	792.7076	7.89
TG 47:0	[M+NH ₄] ⁺	810.7545	9.17
TG 47:1	[M+NH ₄] ⁺	808.7389	8.81
TG 48:0	[M+NH ₄] ⁺	824.7702	8.81
TG 48:1	[M+NH ₄] ⁺	822.7545	8.50
TG 48:2	[M+NH ₄] ⁺	820.7389	8.22
TG 48:3	[M+NH ₄] ⁺	818.7232	7.99
TG 50:0	[M+NH ₄] ⁺	852.8015	9.29
TG 50:1	[M+NH ₄] ⁺	850.7858	8.91
TG 50:2	[M+NH ₄] ⁺	848.7702	8.60
TG 50:3	[M+NH ₄] ⁺	846.7545	8.33
TG 50:4	[M+NH ₄] ⁺	844.7389	8.09
TG 51:2	[M+NH ₄] ⁺	862.7858	8.80
TG 51:3	[M+NH ₄] ⁺	860.7702	8.69
TG 52:1	[M+NH ₄] ⁺	878.8171	9.41
TG 52:2	[M+NH ₄] ⁺	876.8015	9.01
TG 52:3	[M+NH ₄] ⁺	874.7858	8.72
TG 52:4	[M+NH ₄] ⁺	872.7702	8.47
TG 52:5	[M+NH ₄] ⁺	870.7545	8.24
TG 54:2	[M+NH ₄] ⁺	904.8328	9.53
TG 54:3	[M+NH ₄] ⁺	902.8171	9.13
TG 54:4	[M+NH ₄] ⁺	900.8015	8.83
TG 54:5	[M+NH ₄] ⁺	898.7858	8.56
TG 54:6	[M+NH ₄] ⁺	896.7702	8.31
TG 54:7	[M+NH ₄] ⁺	894.7545	8.10
TG 56:6	[M+NH ₄] ⁺	924.8015	9.12
TG 56:7	[M+NH ₄] ⁺	922.7858	8.74
TG 58:8	[M+NH ₄] ⁺	948.8015	9.00

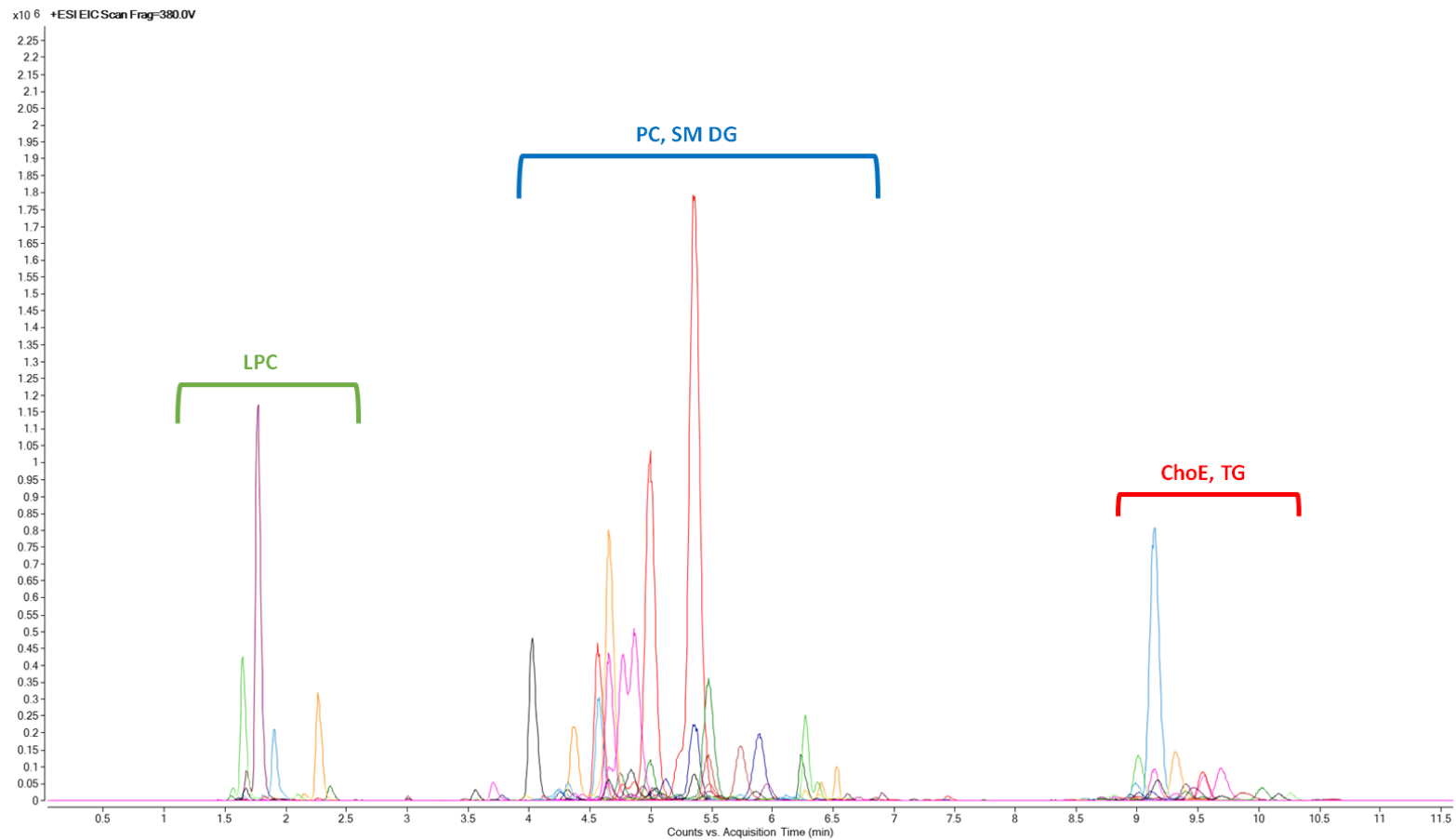
Table S3. Relative concentrations of the 45 lipid species increased in the LTEC-losing group when compared to the LTEC-extreme individuals.

Lipid compounds	LTEC-losing	SEM	LTEC-extreme	SEM	Lipid compounds	LTEC-losing	SEM	LTEC-extreme	SEM
SM (32:1)	0,2116	0,0153	0,1373	0,0161	PC (35:1)	0,0115	0,0011	0,0074	0,0011
SM (34:2)	0,3626	0,0294	0,2671	0,0299	PC (40:6)	0,1198	0,0130	0,0694	0,0125
SM (32:0)	0,0051	0,0004	0,0035	0,0004	PC (38:4)	0,4598	0,0357	0,3157	0,0355
SM (33:1)	0,0985	0,0062	0,0730	0,0063	SM (38:1)	0,2804	0,0219	0,2095	0,0222
PC (32:2)	0,0129	0,0025	0,0067	0,0025	PC (40:5)	0,0204	0,0024	0,0109	0,0023
PC (34:4)	0,0039	0,0005	0,0020	0,0005	PC (38:3)	0,1795	0,0138	0,1281	0,0135
PC (30:0)	0,0132	0,0038	0,0057	0,0038	PC (38:2)	0,0182	0,0014	0,0123	0,0014
PC (34:3)	0,0447	0,0087	0,0251	0,0087	SM (42:2)	1,8332	0,1065	1,4279	0,1067
PC (33:2)	0,0092	0,0010	0,0054	0,0010	TG (46:2)	0,0646	0,0315	0,0312	0,0315
SM (35:1)	0,0600	0,0042	0,0420	0,0043	TG (48:3)	0,0866	0,0448	0,0340	0,0448
PC (36:5)	0,0982	0,0160	0,0309	0,0135	TG (54:7)	0,0721	0,0305	0,0244	0,0305
PC (35:4)	0,0031	0,0004	0,0016	0,0004	CE (20:5)	0,4340	0,0814	0,1214	0,0767
PC (31:0)	0,0022	0,0003	0,0012	0,0003	CE (18:3)	0,3544	0,0347	0,2310	0,0289
PC (33:1)	0,0078	0,0011	0,0044	0,0011	CE (22:6)	0,3444	0,0438	0,1833	0,0423
SM (36:1)	0,4317	0,0284	0,3281	0,0282	TG (54:6)	0,2590	0,0904	0,1054	0,0905
PC (36:4)	0,8663	0,0650	0,5788	0,0680	CE (20:4)	3,1239	0,2282	2,2060	0,2279
PC (32:0)	0,0699	0,0099	0,0443	0,0101	TG (56:7)	0,2041	0,0614	0,0843	0,0617
PC (36:3)	0,8228	0,0694	0,5940	0,0704	CE (20:3)	0,2072	0,0184	0,1447	0,0181
SM (36:0)	0,0196	0,0024	0,0126	0,0024	TG (56:6)	0,2103	0,0628	0,1014	0,0631
PC (35:2)	0,0291	0,0026	0,0206	0,0027	CE (16:0)	0,2344	0,0134	0,1741	0,0133
SM (38:2)	0,0938	0,0083	0,0705	0,0084	TG (58:8)	0,0483	0,0191	0,0164	0,0192
PC (33:0)	0,0023	0,0002	0,0015	0,0002	CE (18:1)	1,3846	0,1129	1,0141	0,1112
PC (38:5)	0,0559	0,0074	0,0252	0,0056					

Supplementary Figure 1. Overlapped extracted ion chromatograms (EIC) of metabolites analyzed by GC-EI-QTOF-MS.



Supplementary Figure 2. Overlapped extracted ion chromatograms (EIC) of lipids analyzed by LC-ESI-QTOF-MS using the accurate mass (m/z) from pseudomolecular ions. LCP, lysophosphatidylcholines; PC, phosphatidylcholines; SM, sphingomyelins; DG, diglyceride; ChoE/CE, cholesteryl esters; TG, triglycerides.



2 ECRIS integrated in the Spanish AIDS Research Network

a. *Clinical Centres and Research Groups contributing to ECRIS*

Hospital Universitario de Valme (Sevilla): Juan Antonio Pineda, Pilar Rincón, Juan Macías Sanchez, Luis Miguel Real, Anais Corma Gomez, Marta Fernandez Fuertes, Alejandro Gonzalez-Serna.

Hospital General Universitario Santa Lucía (Cartagena): Onofre Juan Martínez, Lorena Martinez, Francisco Jesús Vera, Josefina García, Begoña Alcaraz, Amaya Jimeno.

Hospital Clinic de Barcelona (Barcelona): José M. Miró, Christian Manzardo, Laura Zamora, Iñaki Pérez, M^a Teresa García, Carmen Ligeró, José Luis Blanco, Felipe García-Alcaide, Esteban Martínez, Josep Mallolas, José M. Gatell.

Hospital General Universitario de Alicante (Alicante): Joaquín Portilla, Irene Portilla, Esperanza Merino, Gema García, Iván Agea, José Sánchez-Payá, Juan Carlos Rodríguez, Lina Gimeno, Livia Giner, Melissa Carreres, Sergio Reus, Vicente Boix, Diego Torrus, Verónica Pérez Esquerdo, Julia Portilla Tamarit.

Hospital Universitari de Bellvitge (Hospitalet de Llobregat): Daniel Podzamczer, Arkaitz Imaz, Juan Tiraboschi, Ana Silva, María Saumoy, Paula Prieto, Sofía Scevola.

Hospital Universitario de Canarias (Santa Cruz de Tenerife): Juan Luís Gómez Sirvent, Jehovana Hernández, Ana López Lirola, Dácil García, Felicitas Díaz-Flores, María del Mar Alonso, Ricardo Pelazas, María Remedios Alemán.

Hospital Carlos III (Madrid): Vicente Soriano, Pablo Labarga, Pablo Barreiro, Pablo Rivas, Francisco Blanco, Luz Martín Carbonero, Eugenia Vispo, Carmen Solera.

Hospital Universitario Central de Asturias (Oviedo): Victor Asensi, María Eugenia Rivas Carmenado, Tomas Suarez-Zarracina Secades.

Hospital Doce de Octubre (Madrid): Federico Pulido, Rafael Rubio, Otilia Bisbal, M^a Asunción Hernando, David Rial Crestelo, María de Lagarde, Rebeca Font, Octavio Arce, Adriana Pinto, Laura Bermejo, Mireia Santacreu.

Hospital Universitario Donostia (San Sebastián): Jose Antonio Iribarren, M^aJosé Aramburu, Julio Arrizabalaga, Xabier Camino, Francisco Rodríguez-Arrondo, Miguel Ángel von Wichmann, Lidia Pascual Tomé, Miguel Ángel Goenaga, M^a Jesús Bustinduy, Harkaitz Azkune, Maialen Iburguren, Xabier Kortajarena, M^a Pilar Carmona Oyaga, Ainhoa Garaialde Fernandez.

Hospital General Universitario de Elche (Elche): Félix Gutiérrez, Catalina Robledano, Mar Masiá, Sergio Padilla, Araceli Adsuar, Rafael Pascual, Marta Fernández, Antonio Galiana, José Alberto García, Xavier Barber, Vanessa Agullo Re, Javier Garcia Abellan, Reyes Pascual Pérez, Guillermo Telenti, Lucia Guillén, Angela Botella.

Hospital Germans Trías i Pujol (Badalona): Roberto Muga, Arantza Sanvisens, Daniel Fuster.

Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Madrid): Juan Berenguer, Isabel Gutierrez Cuellar, Juan Carlos López Bernaldo de Quirós, Margarita Ramírez, Belén Padilla, Paloma Gijón, Teresa Aldamiz-Echevarría, Francisco Tejerina, Cristina Diez, Leire Pérez Latorre, Chiara Fanciulli, Saray Corral Carretero.

Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, IISPV, Universitat Rovira i Virgili (Tarragona): Francesc Vidal, Anna Marti, Joaquín Peraire, Consuelo Viladés, Sergio Veloso, Montserrat Vargas, Montserrat Olona,

Anna Rull, Verónica Alba, Miguel López-Dupla, Elena Yeregui, Jenifer Masip, Graciano García-Pardo, Frederic Gomez-Bertomeu.

Hospital Universitario La Fe (Valencia): Marta Montero Alonso, Sandra Cuéllar Tovar, Marino Blanes Juliá, María Tacias Pitarch, Eva Calabuig Muñoz, Miguel Salavert Lletí, Juan Fernández Navarro.

Hospital Universitario La Paz/IdiPaz (Madrid): Juan González-García, Ana Delgado Hierro, Francisco Arnalich, José Ramón Arribas, Jose Ignacio Bernardino de la Serna, Juan Miguel Castro, Luis Escosa, Pedro Herranz, Victor Hontañón, Silvia García-Bujalance, Milagros García López-Hortelano, Alicia González-Baeza, María Luz Martín-Carbonero, Mario Mayoral, María Jose Mellado, Rafael Esteban Micán, Rocio Montejano, María Luisa Montes, Victoria Moreno, Ignacio Pérez-Valero, Berta Rodés, Guadalupe Rúa Cebrián, Talia Sainz, Elena Sendagorta, Eulalia Valencia, Carmen Busca, Joanna Cano, Julen Cardañanos, Rosa de Miguel.

Hospital de la Princesa (Madrid): Ignacio de los Santos Gil, Alejandro de los Santos San Frutos, Jesús Sanz Sanz, Lucio García-Fraile Fraile, Enrique Martín Gayo, Ildefonso Sánchez-Cerrillo, Marta Calvet i Mirabent.

Hospital San Pedro-CIBIR (Logroño): José Antonio Oteo, José Ramón Blanco, Valvanera Ibarra, Luis Metola, Mercedes Sanz, Laura Pérez-Martínez.

Complejo Hospitalario de Navarra (Pamplona): María Rivero, Beatriz Piérola Ruiz de Galarreta, Maider Goikoetxea Peñagarikano, María Gracia Ruiz de Alda, Carlos Ibero Esparza, Estela Moreno García, Jesús Repáraz.

Hospital Parc Taulí (Sabadell): Gemma Navarro, María José Amengual, Manel Cervantes Garcia, Sonia Calzado Isbert, Marta Navarro Vilasaro, Belen Lopez Garcia.

Hospital Ramón y Cajal (Madrid): Santiago Moreno, Santos del Campo, José Luis Casado Osorio, Fernando Drona Nuñez, Ana Moreno Zamora, María Jesús Pérez Elías, Carolina Gutiérrez, Nadia Madrid, Sergio Serrano Villar, María Jesús Vivancos Gallego, Javier Martínez Sanz, Tamara Velasco, Alejandro Vallejo, Matilde Sanchez Conde, Jose Antonio Pérez Molina.

Hospital Reina Sofía (Murcia): Enrique Bernal, Antonia Alcaraz, Joaquín Bravo Urbietta, Angeles Muñoz Perez, Cristina Tomás Jimenez, Monica Martinez Martinez, Maria Jose Alcaraz, Maria del Carmen Villalba.

Hospital San Cecilio (Granada): Federico García, Clara Martínez, José Hernández Quero, Leopoldo Muñoz Medina, Marta Alvarez, Natalia Chueca, David Vinuesa García, Adolfo de Salazar Gonzalerz, Ana Fuentes Lopez.

Centro Sanitario Sandoval (Madrid): Jorge Del Romero Guerrero, Montserrat Raposo Utrilla, Carmen Rodríguez, Teresa Puerta, Juan Carlos Carrió, Mar Vera, Juan Ballesteros, Oskar Ayerdi.

Hospital Son Espases (Palma de Mallorca): Melchor Riera, María Peñaranda, M^a Angels Ribas, Antonia Campins, Carmen Vidal, Francisco Fanjul, Javier Murillas, Francisco Homar, Helem H Vilchez, Maria Luisa Martin, Antoni Payeras.

Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla): Luis Fernando López-Cortés, Silvia Llaves, Nuria Espinosa.

b. Research groups:

Hospital General Universitario Gregorio Marañón e Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón. Maria Angeles Muñoz-Fernández, Laura Tarancon-Diez, Jose Luis Jimenez, Daniel Sepúlveda, Rafael Ceña, Isabel García Merino, Irene Consuegra.

Hospital Clinic. Agathe León, Montse Plana, Nuria Climent, Felipe García.

Hospital Joan XXIII. Francesc Vidal, Anna Marti, Joaquín Peraire, Consuelo Viladés, Sergio Veloso, Montserrat Vargas, Montserrat Olona, Anna Rull, Verónica Alba, Miguel López-Dupla, Elena Yeregui, Jenifer Masip, Graciano García-Pardo, Frederic Gomez-Bertomeu.

IIS-Fundacion Jimenez Díaz, UAM. Jose Miguel Benito, Norma Rallón, Clara Restrepo, Marcial García, Alfonso Cabello, Miguel Gorgolas.

Centro Sandoval. Jorge Del Romero, Carmen Rodríguez, Mar Vera.

Fundacion IRSI CAIXA. José Esté, Esther Ballana, Miguel Angel Martinez, S Franco, María Nevot, Julia G. Prado, Esther Jiménez

Hospital Ramón y Cajal. Alejandro Vallejo, Beatriz Sara Sastre, Santiago Moreno.

Virologia Molecular ISCIII. Maria Pernas, Concepción Casado, Cecilio López Galíndez

Infeccion viral e Inmunidad. ISCIII. Salvador Resino

Inmunopatología del SIDA. ISCIII. Laura Capa, Mayte Perez-Olmeda, Pepe Alcami

Mutacion y evolución de virus. Univ Valencia. Rafael Sanjuán, José Manuel Cuevas

Hospital Universitario Doce de Octubre (Madrid): Rafael Rubio, Federico Pulido, Otilia Bisbal, M^a Asunción Hernando, Mariano Matarranz, María Lagarde, Lourdes Domínguez.

Universidad de la Laguna. Agustín Valenzuela-Fernández.

Hospital Virgen del Rocío: Ezequiel Ruiz-Mateos, María Reyes Jiménez-León, Carmen Gasca-Capote, Alberto Pérez-Gómez, Mohamed Ráfii-El-Idrissi Benhnia, Alicia Gutierrez-Valencia, María Trujillo, Ana Serna-Gallego, Esperanza Muñoz-Muela, Silvia Llaves, Cristina Roca-Oporto, Nuria Espinosa, Luis Fernando López-Cortés.

VI. DISCUSSIÓ

VI. DISCUSSIÓ

L'estudi dels mecanismes que condueixen a la pèrdua de control viral en els controladors d'elit és crucial per a la identificació de marcadors que permetin el disseny de noves estratègies d'eradicació i immunoterapèutiques. Diversos estudis han intentat establir els mecanismes implicats en la pèrdua espontània de control en els controladors d'elit, des de factors virals associats a la pèrdua de control immunològic i viral fins als factors de l'hoste^{36,191,192}, suggerint que els mecanismes patògens relacionats amb la infecció del VIH encara es troben actius en aquests individus. S'han descrit fortes associacions entre diverses molècules i paràmetres importants de la funció immune associats amb el control espontani del VIH en els controladors d'elit¹⁵⁷. És per això que la identificació de molècules petites, des de microRNA, metabòlits fins a lípids, podrien proporcionar coneixements sobre estratègies immunoterapèutiques per a la remissió del VIH sense TAR³⁷, així com aprofundir el nostre coneixement sobre el control natural en els controladors d'elit.

1. Estudi 1: el perfil d'expressió de miRNA està associat a la progressió virològica en els controladors d'elit.

La investigació dels miRNA ha avançat considerablement en els últims anys i s'han descobert en molts camps a causa de el seu interès en la identificació de perfils específics associats a infeccions víriques¹⁹³⁻¹⁹⁵. Els gens que codifiquen miRNA es troben dispersos per tot el genoma humà¹⁹⁶, molts es generen com a úniques transcripcions de regions no codificants, tot i que també poden ocórrer dins dels introns o regions no traduïdes de l'ADN que codifica proteïnes^{197,198}. Els gens transcrits per l'ARN polimerasa II poden produir ARN missatgers (ARNm) o ARN reguladors anomenats ARN primaris, que formen una estructura típica de bucle de forquilla i se sotmeten a diversos passos de processament per convertir-se en miRNAs¹⁹⁹. Aquestes molècules tenen un paper vital en una àmplia gamma de processos biològics i el seu estudi obre enormes possibilitats per a nous tractaments i diagnòstic de diverses malalties en humans. S'ha demostrat que l'expressió del VIH, entre altres virus, està modulada pels miRNA cel·lulars¹⁶⁵, dirigint-se directament al seu ARN o bé dirigint-se a alguns dels factors cel·lulars necessaris per a la seva replicació. Durant la infecció, els perfils de miRNA de l'hoste s'alteren com a resposta contra el virus o, alternativament, com a mecanisme perquè el virus faciliti la replicació i la infecció viral.

1.1. Replicació i cicle cel·lular.

El perfil de miRNA de l'hoste canvia durant la infecció, amb diferents miRNAs produïts en diferents etapes de progressió de la malaltia en individus infectats pel VIH ²⁰⁰. A més, també s'han descrit associacions a tot el genoma i anàlisis de transcriptoma en els controladors d'elit i en comparació amb altres fenotips de persones infectades pel VIH ^{193,194}. Els patrons específics de miRNA entre els controladors i els progressors virals ¹⁹³ també s'han caracteritzat, confirmant el paper potencial dels miRNAs i la seva importància en la replicació viral i la progressió de la malaltia ²⁰¹. Per tant, els miRNAs es poden utilitzar potencialment com a biomarcadors més sensibles i precisos en la detecció de la infecció pel VIH amb una major eficiència que altres mètodes convencionals ²⁰².

Amb l'aplicació de la transcriptòmica es van identificar els perfils de miRNA associats als controladors d'elit persistents (CP) que els distingeixen dels controladors d'elit transitoris (CT). Els resultats actuals van confirmar diferències en l'expressió de miRNA, abans i després de la pèrdua de control viral, amb llocs diana situats a regions d'ARN viral que codifiquen proteïnes accessòries virals, a través dels gens *env*, *pol*, *gag*, *vif* i *tat* del genoma del VIH. En particular, miR-423-3p es dirigeix al gen *gag*, mentre que els miRNA miR-29a/29b i miR-326 s'orienten al gen *nef* i miR-324-5p s'orienta al *vif* gen ^{164,203}. Curiosament, alguns dels miRNA fortament expressats en els controladors transitoris en comparació amb els controladors persistents, en ambdues condicions, van ser els miR-29b-3p, miR-324-5p i miR-423-3p. Les alteracions de la funció *gag*, *pol* i *env* del VIH en controladors d'elit supprimeixen espontàniament la virèmia plasmàtica i es troben associades amb una progressió més lenta cap a la SIDA ^{204,205}. Entre els miRNA més expressats en els controladors transitoris, el miR-29b-3p s'uneix directament a l'ARNm del VIH a través del gen *nef*, augmentant la seva associació amb proteïnes del complex RISC la qual cosa comporta la inhibició de la traducció de proteïnes virals i conseqüentment la replicació viral ²⁰⁶. Tanmateix, altres estudis van descriure alts nivells del miR-29-3p en el plasma dels controladors d'elit en comparació amb pacients d'infecció crònica. Juntament amb el miR-326, són reguladors de la diferenciació Th1 i Th17. Un estudi d'assaig *in silico* va provar que molts miRNA cel·lulars es podien unir amb seqüències del VIH, com per exemple, la sobreexpressió de miR-29b va disminuir la replicació del VIH en un 60%; i entre els altres 17 miRNA estudiats, el miR-326, va disminuir constantment la infecció en més d'un 40% ²⁰⁷. A més, el lloc diana del miR-326 es troba a l'ORF *nef* situat a la 3' U3 de totes les transcripcions virals. El miR-326 té una expressió endògena en cèl·lules T primàries i línies de cèl·lules T, a més de la seva interacció funcional amb una seqüència diana complementària en el genoma del VIH-1, ben conservada entre diversos aïllats de VIH ²⁰⁷. Un altre miRNA altament expressat en els

controladors transitoris va ser el miR-324-5p, el qual segons altres estudis es va associar amb la defensa de l'hoste contra el virus altament patògen de la grip A (H5N1 HPAIV), suprimint l'expressió PB1 i orientant-se a CUEDC2, un regulador negatiu de la via JAK-STAT amb la posterior replicació viral²⁰⁸. Tot i que no hi ha evidències d'una relació entre el miR-423-3p i la càrrega viral en el camp de la infecció pel HIV, alguns estudis han trobat que l'expressió de miR-423-3p en sèrum o teixits s'associa amb un mal pronòstic en càncer de pròstata, carcinoma hepatocel·lular i carcinoma de laringe²⁰⁹, afavorint la proliferació cel·lular, la migració i la invasió²¹⁰. Aquestes associacions poden suggerir que la sobreexpressió de miR-423-3p en CT pot ser un indicador de mal pronòstic de la malaltia, possiblement associat a un perfil proinflamatori.

Pel que fa la condició després de la pèrdua espontània del control viral, l'únic miRNA que es va desregular va ser l'expressió de miR-497-5p, del clúster de la família microRNA-15/16/195/424/497 amb un paper important en la modulació del cicle cel·lular i l'apoptosi de les cèl·lules infectades^{211,212}. Tot i que la relació d'aquest miRNA amb la infecció pel VIH no està completament caracteritzada, es coneix que té dos gens diana, el gen BCL2L2, que codifica una proteïna anti-apoptòtica (proteïna 2 similar a Bcl-2) i el gen SMAD2 (que codifica la proteïna 2 del membre de la família SMAD), ambdós amb un paper important en la modulació de les vies apoptòtiques intrínseques, la cicle cel·lular i múltiples processos cel·lulars²¹³. A més, la seva sobreexpressió inhibeix la proliferació, migració i invasió de cèl·lules canceroses de còlon a través de la regulació negativa del factor de creixement similar a la insulina 1²¹⁴. S'uneix a Pur- α , la parella cel·lular de la proteïna reguladora Tat del VIH, necessària per a la infecció del VIH dels macròfags²¹⁵, de fet, tot i que de manera desconeguda, la modulació de l'activitat del miR-497-5p pot arribar a disminuir la transcripció del VIH als macròfags^{212,216,217}. En els nostres resultats, aquest miRNA es troba en molt baixa expressió en el controladors transitoris, fet que suggereix la facilitació de la transcripció del VIH i, en conseqüència, la pèrdua espontània del control viral i la progressió de la malaltia.

1.2. Activació immune i Inflamació

Cal destacar que durant l'activació immune per a la replicació viral, l'elevada demanda energètica es caracteritza per la sobreproducció de citocines proinflamatòries tal com s'ha suggerit en els nostres treballs anteriors^{36,158}, donant lloc a una condició inflamatòria i un augment dels nivells d'estrès oxidatiu¹⁷⁴. La desregulació de citocines en els CT pot provocar alteracions metabòliques que podrien estar associades a la desregulació de l'expressió de miRNA²¹⁸. Abans de la pèrdua del control viral, els miRNAs més expressats en els CT en comparació amb els CP van ser els miR-27a-3p, miR-199a-3p i miR-376a-3p. Curiosament, la

sobreexpressió del miR-27a comporta una sobreproducció de citocines proinflamatòries mitjançant macròfags activats per TLR2/4 ²¹⁹. A més, es van identificar alts nivells d'expressió dels miRNA miR-27a, -27b i 29b en els controladors d'elit, suggerint que el perfil de miRNA dels controladors és similar al dels individus sans i difereix de VP ¹⁹³. La sobreexpressió de miR-27a pot inhibir la replicació de l'enterovirus 71, suggerint una potent activitat antiviral per part d'aquest miRNA ²²⁰. Per tant, els nostres resultats actuals confirmen que el perfil de miRNA en els CT podria actuar com a mecanisme de defensa antiviral afectant directament passos importants durant la infecció pel VIH. De fet, abans de la pèrdua del control viral, l'expressió de cap miRNA es va trobar desregulada els CT, cosa que podria confirmar aquesta alta activitat per evitar la replicació viral.

Curiosament, el teixit adipós subcutani dels pacients infectats pel VIH també comporta una sobreproducció de citocines inflamatòries ²²¹. Continuant amb la condició pre-pèrdua, trobem l'expressió de miR-199a-3p, altament expressat en els CT amb un percentatge òptim de separació i una capacitat per diferenciar els dos fenotips de CE abans i després de la pèrdua del control viral. Aquest miRNA és específic del fetge i curiosament es troba fortament expressat en individus infectats pel VIH amb lipodistròfia ²²², una condició mèdica caracteritzada per la pèrdua de teixit gras d'una zona del cos. Altres miRNA representatius associats a la pèrdua espontània de control viral al llarg del temps també són miRNA específics del fetge, com ara miR-122-5p, miR-199a-3p i miR-376a-3p.

1.3. Immunometabolisme

Se sap que la infecció pel VIH es caracteritza per una alta demanda d'energia per reprogramar les cèl·lules cap a vies glicolítiques aeròbiques que, en conseqüència, poden augmentar el metabolisme anabòlic¹⁵⁷. Per tant, l'augment del perfil lipídic en els CT abans de la pèrdua del control viral podria ser conseqüència del mecanisme de defensa antiviral de l'hoste contra la replicació viral. Curiosament, s'ha suggerit que algunes de les proteïnes accessòries del VIH esmentades anteriorment, com el gen *nef*, perjudiquen l'eflux de colesterol lipídic dels macròfags, provocant l'acumulació de colesterol intracel·lular, la qual cosa afecta el risc de malalties cardiovasculars (CVD) en els individus infectats pel VIH ^{223,224}. Diversos miRNAs poden regular diferents passos del metabolisme de les lipoproteïnes, des de la síntesi fins a la seva eliminació ^{225,226}. A més, estudis recents han promogut la importància dels miRNAs en el control dels nivells plasmàtics de colesterol en lipoproteïnes de baixa densitat (LDL-C), la biosíntesi de colesterol, l'expressió del receptor de LDL hepàtic (LDLR) i en la regulació dels gens implicats en la secreció de lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL)²²⁷. De fet, en els controladors

la secreció de lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL)²²⁷. De fet, en els controladors transitoris, el metabolisme de les LDL, incloent el colesterol LDL (LDL-C), partícules LDL i altres partícules no-HDL, es veu augmentat en la condició posterior a la pèrdua de control viral¹⁵⁷. Així, els nostres resultats van suggerir que la alteració dels nivells de lipoproteïnes, principalment induïda per la regulació d'alguns miRNAs específics del fetge, com és el miR-199a-3p i la seva implicació en la biosíntesi d'àcids grassos i colesterol²²⁸, pot estar molt associada amb els factors immunològics darrere de la pèrdua de control viral en els CT.

2. Estudi 2: el perfil metabòlic subjacent al fenotip de controladors d'elit a llarg termini associat al control viral i immunològic persistent

Els estudis sobre el metabolisme del sistema immunitari o immunometabolisme, han intentat explorar el paper de les vies metabòliques dins cèl·lules immunitàries i com aquesta interacció regula els resultats de la resposta immune¹⁵⁷. Els canvis en el perfil metabòlic de cèl·lules després de la infecció viral són importants per a la replicació viral²²⁹. És per això que la quantificació dels productes metabòlics al plasma ha revelat diferències en els fenotips dels individus infectats pel VIH i ha identificat biomarcadors associats a l'evolució natural del VIH^{188,230,231} que poden participar en la contenció viral juntament amb diferents característiques immunes. Donada la importància de la infecció pel VIH per immunometabolisme i la manca d'informació metabòlica en aquesta població heterogènia, els estudis metabòlics podria revelar diferències metabòliques importants entre els controladors d'elit persistents i transitoris, que podrien donar lloc a noves troballes darrere del control espontani persistent.

En aquest sentit, funcions metabòliques desequilibrades relacionades amb l'energia, les proteïnes, els lípids i el metabolisme de la glucosa s'han trobat en persones infectades pel VIH des del reconeixement de la malaltia i la introducció del TAR^{232,233}. S'han caracteritzat augments en el metabolisme durant els períodes asimptomàtics que poden arribar a nivells encara més alts durant les infeccions oportunistes^{234,235}. Recentment, es va demostrar que la via metabòlica relacionada amb el transport de l'aminoàcid alanina és important per a l'activació de les cèl·lules T, inclús, les alteracions del transport d'alanina a les cèl·lules T CD4⁺ poden contribuir a la patogènesi del VIH mitjançant la modulació de la producció de virus, el debilitament de la resposta immune adaptativa i la millora de la pèrdua de cèl·lules T CD4⁺²³⁵. El nostre estudi

2.1. Perfil metabòlic

Com tots els virus, el VIH depèn completament de les cèl·lules hoste per proporcionar els recursos metabòlics per donar suport a la seva replicació. Tot i que el VIH és capaç d'infectar diversos tipus de cèl·lules immunitàries, la seva replicació productiva i lítica es produeix principalment en les cèl·lules T CD4⁺ activades. Se sap que la transició de les cèl·lules T CD4⁺ en repòs a les activades coincideix amb un canvi metabòlic que es caracteritza per la regulació positiva de la glucòlisi i la glutaminòlisi a les cèl·lules activades^{236,237}. Els nostres resultats van demostrar que hi havia un perfil metabòlic específic associat amb un control immunològic i viral persistent en el fenotip LTEC-extreme que estava fortament relacionat amb la desregulació crítica del cicle de l'àcid tricarboxílic (TCA). De fet, les vies metabòliques relacionades amb alteracions en el metabolisme energètic, com la glucòlisi, el cicle del TCA i el catabolisme d'aminoàcids, s'han relacionat anteriorment amb el control viral en els controladors d'elit²²⁹. Aquestes vies estan dirigides durant la infecció viral, caracteritzada per una alta demanda d'energia¹⁷³, ja que la replicació del VIH depèn del fenotip altament glicolític de les cèl·lules T CD4⁺ activades, una disminució dels nivells de metabòlits circulants com la glucosa i un augment del perfil dels intermedis glicolítics (glicerol 3P, piruvat, etc.)¹⁷⁴.

A més de la glucosa, la glutamina és un recurs metabòlic important per a les cèl·lules T activades i, de manera més general, per als teixits en proliferació²³⁷. Per tant, és important determinar si el metabolisme de la glutamina es troba en qualsevol forma afectada per la infecció de cèl·lules T CD4⁺ amb VIH. De fet, el fenotip LTEC-extreme va mostrar alts nivells d'àcid α -cetoglutàric dins del seu perfil metabòlic característic. Aquest metabòlit que es troba en el metabolisme de la glutamina pot activar mTOR, un complex de serina/treonina quinasa conservat evolutivament i factor catalític de les vies cel·lulars clau que regulen el creixement i el metabolisme cel·lular que controlen l'activació, la diferenciació, la funció i la supervivència de les cèl·lules T²³⁸. Tanmateix, mTOR s'ha descrit com un modulador de la latència del VIH, ja que es va demostrar que els inhibidors de mTOR, com són Torin1 i pp242, van suprimir la reactivació del VIH latent mitjançant estimulants de cèl·lules T tant en el model de cèl·lules primàries de latència del VIH com en cèl·lules T CD4⁺ de pacients amb teràpia antiretroviral altament activa²³⁹. Aquesta activitat proliferativa i de diferenciació elevada en els controladors extreme per l'augment de la concentració de l'àcid α -cetoglutàric podria suggerir un estat antiviral per impedir la replicació del VIH, ja que la incorporació de l'àcid α -cetoglutàric en el cicle TCA és el principal pas anapleròtic en la proliferació de cèl·lules²⁴⁰. Així, l'acumulació plasmàtica de metabòlits de TCA a LTEC-extrem no només suggereix que a les cèl·lules en proliferació, el cicle de TCA funciona com una via biosintètica (anaplerosi)^{241,242} en lloc de com una via purament bioenergètica, sinó

que també podria reflectir un estat proliferatiu i de supervivència de les cèl·lules T CD8⁺ com a resultat de diferents mecanismes immunitaris subjacents al control natural del VIH-1. Paradoxalment, l' α -cetoglutarat era un dels metabòlits augmentats en controladors transitoris abans de la pèrdua del control del VIH en comparació amb els controladors persistents¹⁵⁷. Això suggereix que l' α -cetoglutarat podria entrar al cicle TCA per a la producció d'energia per compensar la manca d'activitat oxidativa del cicle TCA. No obstant, el període de seguiment dels controladors transitoris va ser només d'1 any, en comparació amb el fenotip LTEC-extrem que pot mantenir el control viral i immunològic durant més de 10 anys.

Altres estudis van demostrar que les cèl·lules T CD8⁺ dels controladors d'elit en comparació amb pacients infectats amb TAR, mostraven activació de vies metabòliques mediades per factors com eIF2, mTOR i PI3K, implicades en l'activació metabòlica, la síntesi de proteïnes i la senyalització dels TCR. Tot i que aquest efecte antiviral específic de cèl·lules T CD8⁺ als CE no està completament descrit, es va identificar una reprogramació en la senyalització de molècules de transducció de senyal cel·lular amb funcions crítiques per regular el creixement cel·lular, la proliferació i el metabolisme, com a aspectes diferenciadors de les cèl·lules T CD8⁺ en els controladors d'elit²⁴³. La degradació de lípids endògens mitjançant autofàgia (lipofàgia) és un mediador immunitari crític per induir respostes antivirals funcionals de cèl·lules T CD8⁺ que tenen un paper important en el control natural de la infecció pel VIH en els CE²⁴⁴. Aquest augment de lípids lliures alimenta el metabolisme mitocondrial a causa de la glutaminòlisi i restableix la immunitat protectora de les cèl·lules T CD8⁺ durant la infecció persistent per VIH^{245,246}.

2.2. Perfil lipídomic

La infecció pel VIH i el tractament posterior amb teràpia antiretroviral s'associen sovint amb pertorbacions en els perfils lipídics. A més, malgrat la supressió de la replicació viral per part del TAR, la inflamació persistent probablement contribueix a modificacions en la composició i la funció dels lípids augmentant el risc de desenvolupament de malalties cardiovasculars (CVD)²⁴⁷. Com es va descriure en el estudi 1, el processament i el transport dels lípids es veuen afectats pels processos inflamatoris, i moltes espècies de lípids contribueixen a la inflamació i l'activació immune i són essencials durant la diferenciació i les respostes immunitàries de les cèl·lules T CD8⁺²⁴⁸. Tot i que la relació entre el perfil lipídomic i l'estat inflamatori és complexa¹⁷⁶, no es van trobar diferències significatives en el plasma dels individus LTEC-extreme en comparació amb els individus no-LTEC. No obstant, el perfil lipídomic va ser significativament rellevant quan vam comparar els dos tipus de fenotips de controladors d'elit, els LTEC-losing i els LTEC-extreme.

Concretament, els individus que perdien el control viral i/o immunològic durant el seguiment tenien altes concentracions plasmàtiques relatives de 45 espècies de lípids, entre les quals es trobaven triglicèrids (TG), fosfatidilcolines (PC) i èsters de colesterol (ChE). A més, la combinació d'aquestes 45 espècies de lípids va ser un factor diferenciador principal en l'avaluació de la progressió dels LTEC.

De fet, altres estudis també han identificat diverses classes de lípids associades amb la infecció pel VIH, entre les quals podem incloure les ceramides (Cer), les PC, diverses espècies de di- i triglicèrids (DG i TG) i ChE. Molts d'aquests lípids tenen propietats proinflamatòries i es veuen implicats en el desenvolupament de malalties cardiovasculars en persones VIH⁺²⁴⁹. L'augment del perfil lipídic en els individus LTEC-losing suggereix un entorn proinflamatori sostingut associat a la pèrdua de control viral i/o immunològic molt avantatjós per a la replicació del VIH. Els canvis en els nivells de citocines en persones infectades pel VIH poden afectar la funció del sistema immunitari i tenen el potencial d'afectar directament el curs de la malaltia del VIH mitjançant la millora o la supressió de la replicació del VIH. En particular, l'equilibri entre les citocines proinflamatòries, com són les interleucines 1 o 6 (IL-1, IL-6), TNF- α , que regulen l'expressió del VIH, i la IL-10, que poden actuar tant com a antiinflamatori i com a factor estimulador de cèl·lules B, poden tenir un paper important en la progressió cap a la SIDA²⁵⁰. A més els alts nivells circulants de la citocina proinflamatòria IL-32 es van correlacionar positivament amb la disminució del recompte de cèl·lules T CD4⁺, l'augment de la càrrega viral, la relació cel·lular CD4/CD8 més baixa i els nivells d'altres marcadors inflamatoris com són el sCD14 i la IL-6²⁵¹. Molts d'aquests lípids, com són les PC, es troben implicats en cascades de senyalització inflamatòries amb l'activació del TNF- α ¹⁷⁹ que contribueix a la persistència i al ràpid rebot del VIH²⁵². Un altre estudi va associar la coinfecció amb CMV a una inflamació addicional, donant lloc a l'activació de les cèl·lules T CD4⁺, que contribueix a la pèrdua progressiva de cèl·lules T amb la desintegració de les cèl·lules T CD4 als controladors d'elit²⁵³. Pel que fa a la concentració relativa de lípids als LTEC-losing, els TG tenen un paper important, ja que s'han descrit prèviament diferències en els nivells de TG^{177,178} i colesterol de lipoproteïnes d'alta i baixa densitat (HDL-C i LDL-C) entre individus amb SIDA, individus amb VIH però sense SIDA i controls²⁵⁴. Curiosament, els pacients amb SIDA van resultar tenir nivells més alts de TG en comparació amb els participants amb VIH i els controls, resultats que ens suggereixen aquesta progressió de la infecció en els individus LTEC-losing.

En resum, els nostres resultats conjunts van mostrar una diferència consistent en l'expressió dels perfils plasmàtics entre els diferents fenotips estudiats. Tot i què és una població molt diversa i es troben molts factors implicats en el control natural del VIH de forma simultània, el perfil de miRNA dels controladors persistents diferia dels controladors transitoris abans de la pèrdua del control viral i aquestes diferències van persistir després de la pèrdua de control, demostrant una associació entre el perfil de miRNA i la virèmia. A més la majoria d'aquests miRNAs expressats estan implicats en el metabolisme dels lípids, revelant una forta correlació entre els metabòlits circulants i les concentracions de lípids amb paràmetres immunològics, oferint una nova visió de les vies metabòliques associades a la pèrdua espontània de control viral. Per altra banda, les diferències en el perfil metabolòmic també van ser rellevants en els controladors d'elit a llarg termini, fet que es troba associat al manteniment del control viral i/o immunològic en individus controladors d'elit de fenotip extrem. En particular, les concentracions plasmàtiques elevades de metabòlits de TCA es van associar amb el control natural de la infecció pel VIH, especialment aquells metabòlits relacionats amb el metabolisme de la glutamina. En canvi, el patró lipidòmic amb alts nivells de diverses espècies lipídiques en els controladors LTEC-losing, suggereix un entorn proinflamatori sostingut associat a la pèrdua de control viral i/o immunològic molt avantatjós per a la replicació del VIH.

VII. CONCLUSIONS

VII. CONCLUSIONS

- L'estudi dels mecanismes que condueixen a la pèrdua de control viral en els controladors d'elit és crucial per a la identificació de marcadors diferencials per al disseny de noves estratègies d'eradicació i immunoteràpia.
- Diferències en els patrons d'expressió de miRNA entre controladors d'elit persistents i transitoris abans de la pèrdua de control i que perduren després de la pèrdua de control, demostrant una associació entre el perfil de miRNA i la virèmia.
- Una alta expressió del miR-199a-3p en els controladors transitoris mostra un percentatge òptim de separació i una molt bona capacitat per diferenciar controladors d'elit persistents i transitoris abans i després de la pèrdua del control viral.
- L'alteració dels nivells de lipoproteïnes, principalment induïda per la regulació d'alguns miRNAs específics del fetge, com són el miR-27a-3p, el miR-376a-3p i el miR-199a-3p, pot estar molt associada amb els factors immunològics darrere de la pèrdua de control viral en els controladors transitoris.
- Un perfil metabolòmic singular associat al manteniment del control viral i/o immunològic en individus LTEC-extreme, caracteritzat per l'acumulació plasmàtica de metabòlits del cicle de respiració cel·lular (TCA), especialment aquells metabòlits relacionats amb el metabolisme de la glutamina, com és l'àcid α -cetoglutàric, suggerint que el cicle de TCA funciona com una via biosintètica en un estat antiviral.
- Alts nivells de diverses espècies lipídiques en els controladors LTEC-losing està altament associat a la pèrdua espontània de control viral i/o immunològic.

VIII. ALTRES PUBLICACIONS RELLEVANTS

VIII. ALTRES PUBLICACIONS RELLEVANTS

Llistat de publicacions durant la tesi doctoral:

Jenifer Masip, Rosa Jorba, Miguel López-Dupla, Pere Domingo, Yolanda María Pacheco, Graciano García-Pardo, Esteban Martínez, Consuelo Viladés, Sergi Veloso, Verónica Alba, Montserrat Olona, Francesc Vidal, Frederic Gómez-Bertomeu, Joaquim Peraire and Anna Rull. Lipoprotein Profile in Immunological Non-Responders PLHIV after Antiretroviral Therapy Initiation. *Int J Mol Sci.* 2022; 22;23(15):8071. Published 2022 Jul 22. doi: 10.3390/ijms23158071.

Elena Yeregui, **Jenifer Masip**, Consuelo Viladés, Pere Domingo, Yolanda M. Pacheco, Julià Blanco, Josep Mallolas, Verónica Alba, Montserrat Vargas, Graciano García-Pardo, Eugènia Negro, Montserrat Olona, Judit Vidal-González, Maria Peraire, Anna Martí, Laia Reverté, Frédéric Gómez-Bertomeu, Manuel Leal, Francesc Vidal, Joaquim Peraire and Anna Rull. Adipokines as New Biomarkers of Immune Recovery: Apelin Receptor, RBP4 and ZAG Are Related to CD4+ T-Cell Reconstitution in PLHIV on Suppressive Antiretroviral Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23(4), 2202. Published 2022 Feb 17. doi.org/10.3390/ijms23042202.

Ana-Irene Malo, Joaquim Peraire, Ezequiel Ruiz-Mateos, **Jenifer Masip**, Núria Amigó, José Alcamí, Santiago Moreno, Josefa Girona, Graciano García-Pardo, Rosaura Reig, Francesc Vidal, Antoni Castro, Lluís Masana and Anna Rull. Evolution of Serum Acute-Phase Glycoproteins Assessed by 1H-NMR in HIV Elite Controllers. *Front Immunol.* 2021; 12: 730691. Published online 2021 Sep 28. doi: 10.3389/fimmu.2021.730691.

Elena Yeregui, Consuelo Viladés, Pere Domingo, Andra Ceausu, Yolanda María Pacheco, Sergi Veloso, Alexy Inciarte, Judit Vidal-González, Maria Peraire, Carles Perpiñán, Vicenç Falcó, **Jenifer Masip**, Verónica Alba, Montserrat Vargas, Anna Martí, Laia Reverté, Josep Mallolas, Francesc Vidal, Joaquim Peraire and Anna Rull. High Circulating SDF-1 and MCP-1 Levels and Genetic Variations in CXCL12, CCL2 and CCR5: Prognostic Signature of Immune Recovery Status in Treated HIV-Infected Patients. *EBioMedicine.* 2020;62:103077. Published online 2020 Nov 6. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.103077.

Presentacions a congressos:

Assistència i presentació de la comunicació “**POSTER ESQUINA**” amb títol “*Differential metabolomic profile distinguishes persistent viral and immunological control within long-term elite controllers*”, al **XII Congreso Nacional de GeSIDA** celebrat a Màlaga, del 29 de novembre al 2 de desembre de 2021.

Assistència i presentació de la comunicació online amb títol “*miRNAs plasma profile anticipate the loss of virological control in Elite Controllers*”, a la **Virtual Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections 2021 (CROI)**, celebrat del 6 al 10 de març de 2021.

Presentació de la comunicació online amb títol “*Immunometabolism is a key factor for the spontaneous loss of virological control in HIV Elite Controllers*”, a la **7th IISPV SCIENTIFIC SESSION 2020 “Trans-Omics analysis for reconstructing global biochemical networks”**, celebrat el 15 de desembre del 2020.

IX. REFERÈNCIES

IX. REFERÈNCIES

1. Masip, J. *et al.* Differential miRNA plasma profiles associated with the spontaneous loss of HIV-1 control: miR-199a-3p and its potential role as a biomarker for quick screening of elite controllers. *Clin Transl Med* **11**, e474 (2021).
2. Masip, J. *et al.* Elevated α -Ketoglutaric Acid Concentrations and a Lipid-Balanced Signature Are the Key Factors in Long-Term HIV Control. *Front Immunol* **13**, (2022).
3. Greene, W. C. A history of AIDS: looking back to see ahead. *Eur J Immunol* **37 Suppl 1**, (2007).
4. Merson, M. H., O'Malley, J., Serwadda, D. & Apisuk, C. The history and challenge of HIV prevention. *Lancet* **372**, 475–488 (2008).
5. Infección por el VIH. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>.
6. Barouch, D. H. Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. *Nature* **455**, 613–619 (2008).
7. Richman, D. D. *et al.* The challenge of finding a cure for HIV infection. *Science* **323**, 1304–1307 (2009).
8. Sharp, P. M. & Hahn, B. H. Origins of HIV and the AIDS Pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med* **1**, (2011).
9. Faria, N. R. *et al.* The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science* **346**, 56 (2014).
10. van Heuvel, Y., Schatz, S., Rosengarten, J. F. & Stitz, J. Infectious RNA: Human Immunodeficiency Virus (HIV) Biology, Therapeutic Intervention, and the Quest for a Vaccine. *Toxins* **2022, Vol. 14, Page 138** **14**, 138 (2022).
11. An, P. & Winkler, C. A. Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. *Trends Genet* **26**, 119–131 (2010).
12. Miller, W. C., Rosenberg, N. E., Rutstein, S. E. & Powers, K. A. The Role of Acute and Early HIV Infection in the Sexual Transmission of HIV. *Curr Opin HIV AIDS* **5**, 277 (2010).
13. Brenchley, J. M. *et al.* CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* **200**, 749–759 (2004).
14. Brenchley, J. M. & Douek, D. C. The mucosal barrier and immune activation in HIV pathogenesis. *Curr Opin HIV AIDS* **3**, 356–361 (2008).
15. Ford, E. S., Puroonen, C. E. & Sereti, I. Immunopathogenesis of Asymptomatic Chronic HIV Infection: The Calm before the Storm. *Curr Opin HIV AIDS* **4**, 206 (2009).

16. Hernandez-Vargas, E. A. & Middleton, R. H. Modeling the three stages in HIV infection. *J Theor Biol* **320**, 33–40 (2013).
17. Fauci, A. S. HIV and AIDS: 20 years of science. *Nat Med* **9**, 839–843 (2003).
18. Pacheco, Y. *et al.* Risk factors, CD4 long-term evolution and mortality of HIV-infected patients who persistently maintain low CD4 counts, despite virological response to HAART. *Curr HIV Res* **7**, 612–619 (2009).
19. Massanella, M., Negro, E., Clotet, B. & Blanco, J. Immunodiscordant responses to HAART – mechanisms and consequences. <http://dx.doi.org/10.1586/1744666X.2013.842897> **9**, 1135–1149 (2014).
20. Hubert, J. B. *et al.* Natural history of serum HIV-1 RNA levels in 330 patients with a known date of infection. The SEROCO Study Group. *AIDS* **14**, 123–131 (2000).
21. Gonzalo-Gil, E., Ikediobi, U. & Sutton, R. E. Focus: Infectious Diseases: Mechanisms of Virologic Control and Clinical Characteristics of HIV+ Elite/Viremic Controllers. *Yale J Biol Med* **90**, 245 (2017).
22. Olson, A. D. *et al.* An Evaluation of HIV Elite Controller Definitions within a Large Seroconverter Cohort Collaboration. doi:10.1371/jour.
23. Hunt, P. W. *et al.* Relationship between T cell activation and CD4+ T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy. *J Infect Dis* **197**, 126–133 (2008).
24. Deeks, S. G. & Walker, B. D. Human Immunodeficiency Virus Controllers: Mechanisms of Durable Virus Control in the Absence of Antiretroviral Therapy. *Immunity* vol. 27 406–416 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.08.010> (2007).
25. Okulicz, J. F. *et al.* Clinical outcomes of elite controllers, viremic controllers, and long-term nonprogressors in the US Department of Defense HIV natural history study. *J Infect Dis* **200**, 1714–1723 (2009).
26. 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).
27. Owen, R. E. *et al.* HIV+ elite controllers have low HIV-specific T cell activation yet maintain strong, polyfunctional T cell responses. *AIDS* **24**, 1095 (2010).
28. Baker, B. M., Block, B. L., Rothchild, A. C. & Walker, B. D. Elite Control of HIV Infection: Implications for Vaccine Design. *Expert Opin Biol Ther* **9**, 55 (2009).
29. Pereyra, F. *et al.* Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy. *J Infect Dis* **197**, 563–571 (2008).
30. Okulicz, J. F. *et al.* CD4 T cell count reconstitution in HIV controllers after highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* **50**, 1187–1191 (2010).

31. Eriksson, E. M. *et al.* Expansion of CD8+ T cells lacking Sema4D/CD100 during HIV-1 infection identifies a subset of T cells with decreased functional capacity. *Blood* **119**, 745–755 (2012).
32. Sáez-Cirión, A. *et al.* Restriction of HIV-1 replication in macrophages and CD4+ T cells from HIV controllers. *Blood* **118**, 955–964 (2011).
33. López, M. *et al.* Elite controllers display higher activation on central memory CD8 T cells than HIV patients successfully on HAART. *AIDS Res Hum Retroviruses* **27**, 157–165 (2011).
34. 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).
35. Canouï, E. *et al.* A Subset of Extreme Human Immunodeficiency Virus (HIV) Controllers Is Characterized by a Small HIV Blood Reservoir and a Weak T-Cell Activation Level. *Open Forum Infect Dis* **4**, (2017).
36. Pernas, M. *et al.* Factors Leading to the Loss of Natural Elite Control of HIV-1 Infection. *J Virol* **92**, e01805-17 (2018).
37. Casado, C. *et al.* Permanent control of HIV-1 pathogenesis in exceptional elite controllers: a model of spontaneous cure. *Sci Rep* **10**, 1902 (2020).
38. Mendoza, D. *et al.* Comprehensive analysis of unique cases with extraordinary control over HIV replication. *Blood* **119**, 4645–4655 (2012).
39. López-Galíndez, C. HIV long-term non-progressors elite controllers: an interplay between host, immune and viral factors. *Future Virol* **14**, 287–297 (2019).
40. Chen, H. *et al.* CD4+ T cells from elite controllers resist HIV-1 infection by selective upregulation of p21. *J Clin Invest* **121**, 1549–1560 (2011).
41. Carrington, M. & O'Brien, S. J. The influence of HLA genotype on AIDS. *Annu Rev Med* **54**, 535–551 (2003).
42. Pereyra, F. *et al.* The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. *Science* **330**, 1551–1557 (2010).
43. Betts, M. R. *et al.* HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* **107**, 4781–4789 (2006).
44. Gebara, N. Y., El Kamari, V. & Rizk, N. HIV-1 elite controllers: an immunovirological review and clinical perspectives. *J Virus Erad* **5**, 163–166 (2019).
45. Madec, Y., Boufassa, F., Porter, K. & Meyer, L. Spontaneous control of viral load and CD4 cell count progression among HIV-1 seroconverters. *AIDS* **19**, 2001–2007 (2005).

46. Altfeld, M. *et al.* HLA Alleles Associated with Delayed Progression to AIDS Contribute Strongly to the Initial CD8(+) T Cell Response against HIV-1. *PLoS Med* **3**, 1851–1864 (2006).
47. Madec, Y., Boufassa, F., Rouzioux, C., Delfraissy, J. F. & Meyer, L. Undetectable viremia without antiretroviral therapy in patients with HIV seroconversion: an uncommon phenomenon? *Clin Infect Dis* **40**, 1350–1354 (2005).
48. Sterling, T. R. *et al.* Sex differences in longitudinal human immunodeficiency virus type 1 RNA levels among seroconverters. *J Infect Dis* **180**, 666–672 (1999).
49. Deacon, N. J. *et al.* Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* **270**, 988–991 (1995).
50. Churchill, M. J. *et al.* Longitudinal analysis of human immunodeficiency virus type 1 nef/long terminal repeat sequences in a cohort of long-term survivors infected from a single source. *J Virol* **80**, 1047–1052 (2006).
51. Blankson, J. N. *et al.* Isolation and characterization of replication-competent human immunodeficiency virus type 1 from a subset of elite suppressors. *J Virol* **81**, 2508–2518 (2007).
52. Bailey, J. R. *et al.* Neutralizing antibodies do not mediate suppression of human immunodeficiency virus type 1 in elite suppressors or selection of plasma virus variants in patients on highly active antiretroviral therapy. *J Virol* **80**, 4758–4770 (2006).
53. Klepiela, P. *et al.* Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature* **432**, 769–774 (2004).
54. Bailey, J. R., Williams, T. M., Siliciano, R. F. & Blankson, J. N. Maintenance of viral suppression in HIV-1-infected HLA-B*57+ elite suppressors despite CTL escape mutations. *J Exp Med* **203**, 1357–1369 (2006).
55. Migueles, S. A. *et al.* HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2709–2714 (2000).
56. Kiepiela, P. *et al.* CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nat Med* **13**, 46–53 (2007).
57. Fellay, J. *et al.* A whole-genome association study of major determinants for host control of HIV-1. *Science* **317**, 944–947 (2007).
58. Migueles, S. A. *et al.* The differential ability of HLA B*5701+ long-term nonprogressors and progressors to restrict human immunodeficiency virus replication is not caused by loss of recognition of autologous viral gag sequences. *J Virol* **77**, 6889–6898 (2003).
59. Martin, M. P. *et al.* Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nat Genet* **39**, 733–740 (2007).

60. Dean, M. *et al.* Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CKR5* structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* **273**, 1856–1862 (1996).
61. Gonzalez, E. *et al.* The influence of *CCL3L1* gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science* **307**, 1434–1440 (2005).
62. Dolan, M. J. *et al.* *CCL3L1* and *CCR5* influence cell-mediated immunity and affect HIV-AIDS pathogenesis via viral entry-independent mechanisms. *Nat Immunol* **8**, 1324–1336 (2007).
63. Winkler, C. *et al.* Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an *SDF-1* chemokine gene variant. ALIVE Study, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC). *Science* **279**, 389–393 (1998).
64. Harris, R. S. & Liddament, M. T. Retroviral restriction by *APOBEC* proteins. *Nat Rev Immunol* **4**, 868–877 (2004).
65. Bishop, K. N., Holmes, R. K., Sheehy, A. M. & Malim, M. H. *APOBEC*-mediated editing of viral RNA. *Science* **305**, 645 (2004).
66. Sheehy, A. M., Gaddis, N. C., Choi, J. D. & Malim, M. H. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral *Vif* protein. *Nature* **418**, 646–650 (2002).
67. Stremlau, M. *et al.* The cytoplasmic body component *TRIM5alpha* restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* **427**, 848–853 (2004).
68. Mehandru, S. *et al.* Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of *CD4+* T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* **200**, 761–770 (2004).
69. Li, Q. *et al.* Peak SIV replication in resting memory *CD4+* T cells depletes gut lamina propria *CD4+* T cells. *Nature* **434**, 1148–1152 (2005).
70. Mattapallil, J. J. *et al.* Massive infection and loss of memory *CD4+* T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* **434**, 1093–1097 (2005).
71. Brenchley, J. M. *et al.* Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* **12**, 1365–1371 (2006).
72. Pichlmair, A. & Reis e Sousa, C. Innate recognition of viruses. *Immunity* **27**, 370–383 (2007).
73. Martin, M. P. *et al.* Epistatic interaction between *KIR3DS1* and *HLA-B* delays the progression to AIDS. *Nat Genet* **31**, 429–434 (2002).

74. Qi, Y. *et al.* KIR/HLA pleiotropism: protection against both HIV and opportunistic infections. *PLoS Pathog* **2**, 0741–0745 (2006).
75. Altfeld, M. *et al.* Influence of HLA-B57 on clinical presentation and viral control during acute HIV-1 infection. *AIDS* **17**, 2581–2591 (2003).
76. Bochud, P. Y. *et al.* Polymorphisms in Toll-like receptor 9 influence the clinical course of HIV-1 infection. *AIDS* **21**, 441–446 (2007).
77. Beignon, A. S. *et al.* Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J Clin Invest* **115**, 3265–3275 (2005).
78. Schmidt, B., Fujimura, S. H., Martin, J. N. & Levy, J. A. Variations in plasmacytoid dendritic cell (PDC) and myeloid dendritic cell (MDC) levels in HIV-infected subjects on and off antiretroviral therapy. *J Clin Immunol* **26**, 55–64 (2006).
79. Loré, K., Smed-Sørensen, A., Vasudevan, J., Mascola, J. R. & Koup, R. A. Myeloid and plasmacytoid dendritic cells transfer HIV-1 preferentially to antigen-specific CD4+ T cells. *J Exp Med* **201**, 2023–2033 (2005).
80. Soumelis, V. *et al.* Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. *Blood* **98**, 906–912 (2001).
81. Tsubota, H., Lord, C. I., Watkins, D. I., Morimoto, C. & Letvin, N. L. A cytotoxic T lymphocyte inhibits acquired immunodeficiency syndrome virus replication in peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* **169**, 1421–1434 (1989).
82. Addo, M. M. *et al.* Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T-cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load. *J Virol* **77**, 2081–2092 (2003).
83. Betts, M. R. *et al.* Analysis of total human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell responses: relationship to viral load in untreated HIV infection. *J Virol* **75**, 11983–11991 (2001).
84. Migueles, S. A. *et al.* HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat Immunol* **3**, 1061–1068 (2002).
85. Zimmerli, S. C. *et al.* HIV-1-specific IFN-gamma/IL-2-secreting CD8 T cells support CD4-independent proliferation of HIV-1-specific CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7239–7244 (2005).
86. Sáez-Cirión, A. *et al.* HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 6776–6781 (2007).

87. Jansen, C. A. *et al.* High responsiveness of HLA-B57-restricted Gag-specific CD8+ T cells in vitro may contribute to the protective effect of HLA-B57 in HIV-infection. *Eur J Immunol* **35**, 150–158 (2005).
88. Martinez-Picado, J. *et al.* Fitness cost of escape mutations in p24 Gag in association with control of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **80**, 3617–3623 (2006).
89. Leslie, A. J. *et al.* HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission. *Nat Med* **10**, 282–289 (2004).
90. Sacha, J. B. *et al.* Gag-specific CD8+ T lymphocytes recognize infected cells before AIDS-virus integration and viral protein expression. *J Immunol* **178**, 2746–2754 (2007).
91. Grakoui, A. *et al.* HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* **302**, 659–662 (2003).
92. Lichterfeld, M. *et al.* Loss of HIV-1-specific CD8+ T cell proliferation after acute HIV-1 infection and restoration by vaccine-induced HIV-1-specific CD4+ T cells. *J Exp Med* **200**, 701–712 (2004).
93. Guadalupe, M. *et al.* Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J Virol* **77**, 11708–11717 (2003).
94. Douek, D. C. *et al.* HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature* **417**, 95–98 (2002).
95. Emu, B. *et al.* Phenotypic, functional, and kinetic parameters associated with apparent T-cell control of human immunodeficiency virus replication in individuals with and without antiretroviral treatment. *J Virol* **79**, 14169–14178 (2005).
96. Harari, A., Petitpierre, S., Vallelian, F. & Pantaleo, G. Skewed representation of functionally distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-1-infected subjects with progressive disease: changes after antiretroviral therapy. *Blood* **103**, 966–972 (2004).
97. Boaz, M. J., Waters, A., Murad, S., Easterbrook, P. J. & Vyakarnam, A. Presence of HIV-1 Gag-specific IFN-gamma+IL-2+ and CD28+IL-2+ CD4 T cell responses is associated with nonprogression in HIV-1 infection. *J Immunol* **169**, 6376–6385 (2002).
98. Pereyra, F. *et al.* Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy. *Journal of Infectious Diseases* **197**, 563–571 (2008).
99. Kaufmann, D. E. *et al.* Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nat Immunol* **8**, 1246–1254 (2007).

100. Martinez, V. *et al.* Combination of HIV-1-specific CD4 Th1 cell responses and IgG2 antibodies is the best predictor for persistence of long-term nonprogression. *J Infect Dis* **191**, 2053–2063 (2005).
101. Pontesilli, O. *et al.* Lymphoproliferative response to HIV type 1 p24 in long-term survivors of HIV type 1 infection is predictive of persistent AIDS-free infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* **15**, 973–981 (1999).
102. Rosenberg, E. S. *et al.* Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science* **278**, 1447–1450 (1997).
103. Wilson, J. D. K. *et al.* Loss of CD4+ T cell proliferative ability but not loss of human immunodeficiency virus type 1 specificity equates with progression to disease. *J Infect Dis* **182**, 792–798 (2000).
104. Pitcher, C. J. *et al.* HIV-1-specific CD4+ T cells are detectable in most individuals with active HIV-1 infection, but decline with prolonged viral suppression. *Nat Med* **5**, 518–525 (1999).
105. Okulicz, J. F. & Lambotte, O. Epidemiology and clinical characteristics of elite controllers. *Curr Opin HIV AIDS* **6**, 163–168 (2011).
106. Cockerham, L. R. & Hatano, H. Elite control of HIV: is this the right model for a functional cure? *Trends Microbiol* **23**, 71–75 (2015).
107. Dubé, K. *et al.* Re-examining the HIV ‘functional cure’ oxymoron: Time for precise terminology? *J Virus Erad* **6**, (2020).
108. Fuchs, S. P. *et al.* AAV-Delivered Antibody Mediates Significant Protective Effects against SIVmac239 Challenge in the Absence of Neutralizing Activity. *PLoS Pathog* **11**, (2015).
109. Gardner, M. R. *et al.* AAV-expressed eCD4-Ig provides durable protection from multiple SHIV challenges. *Nature* **519**:7541 **519**, 87–91 (2015).
110. Gautam, R. *et al.* A single injection of anti-HIV-1 antibodies protects against repeated SHIV challenges. *Nature* **533**, 105–109 (2016).
111. Schoofs, T. *et al.* HIV-1 therapy with monoclonal antibody 3BNC117 elicits host immune responses against HIV-1. *Science* **352**, 997–1001 (2016).
112. Scheid, J. F. *et al.* HIV-1 antibody 3BNC117 suppresses viral rebound in humans during treatment interruption. *Nature* **535**, 556–560 (2016).
113. Caskey, M. *et al.* Viraemia suppressed in HIV-1-infected humans by broadly neutralizing antibody 3BNC117. *Nature* **522**:7557 **522**, 487–491 (2015).
114. Balazs, A. B. *et al.* Antibody-based protection against HIV infection by vectored immunoprophylaxis. *Nature* **481**, 81–86 (2011).

115. Hütter, G. *et al.* Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802905> **360**, 692–698 (2009).
116. Gupta, R. K. *et al.* HIV-1 remission following CCR5Δ32/Δ32 haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature* **568**, 244–248 (2019).
117. Henrich, T. J. *et al.* Antiretroviral-free HIV-1 remission and viral rebound after allogeneic stem cell transplantation: report of 2 cases. *Ann Intern Med* **161**, 319–327 (2014).
118. Cummins, N. W. *et al.* Extensive virologic and immunologic characterization in an HIV-infected individual following allogeneic stem cell transplant and analytic cessation of antiretroviral therapy: A case study. *PLoS Med* **14**, (2017).
119. O'Brien, T. R. *et al.* HIV-1 infection in a man homozygous for CCR5Δ32 [1]. *Lancet* **349**, 1219 (1997).
120. Smoleń-Dzirba, J. *et al.* HIV-1 Infection in Persons Homozygous for CCR5-Δ32 Allele: The Next Case and the Review. *Reviews* **19**, (2017).
121. Xu, W. *et al.* Advancements in Developing Strategies for Sterilizing and Functional HIV Cures. *Biomed Res Int* **2017**, (2017).
122. van Lint, C., Bouchat, S. & Marcello, A. HIV-1 transcription and latency: An update. *Retrovirology* **10**, 1–38 (2013).
123. Ding, J., Liu, Y. & Lai, Y. Knowledge From London and Berlin: Finding Threads to a Functional HIV Cure. *Front Immunol* **12**, 1852 (2021).
124. Durand, C. M., Blankson, J. N. & Siliciano, R. F. Developing strategies for HIV-1 eradication. *Trends Immunol* **33**, 554–562 (2012).
125. Siliciano, J. D. *et al.* Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med* **9**, 727–728 (2003).
126. Remoli, A. L., Marsili, G., Battistini, A. & Sgarbanti, M. The development of immune-modulating compounds to disrupt HIV latency. *Cytokine Growth Factor Rev* **23**, 159–172 (2012).
127. Weichselderfer, M., Reitz, M. & Latinovic, O. S. Past HIV-1 Medications and the Current Status of Combined Antiretroviral Therapy Options for HIV-1 Patients. *Pharmaceutics* **2021**, Vol. 13, Page 1798 **13**, 1798 (2021).
128. Sáez-Cirión, A. *et al.* Post-treatment HIV-1 controllers with a long-term virological remission after the interruption of early initiated antiretroviral therapy ANRS VISCONTI Study. *PLoS Pathog* **9**, (2013).
129. Pereyra, F. *et al.* The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. *Science* **330**, 1551–1557 (2010).

130. Lai, Y. Early treatment during primary infection holds the key to a functional cure for HIV. *Intervirology* **57**, 52–53 (2014).
131. Rerks-Ngarm, S. *et al.* Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med* **361**, 2209–2220 (2009).
132. Cao, Y., Qin, L., Zhang, L., Safrit, J. & Ho, D. D. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* **332**, 201–208 (1995).
133. Deeks, S. G. *et al.* Neutralizing antibody responses against autologous and heterologous viruses in acute versus chronic human immunodeficiency virus (HIV) infection: evidence for a constraint on the ability of HIV to completely evade neutralizing antibody responses. *J Virol* **80**, 6155–6164 (2006).
134. Lambotte, O. *et al.* Heterogeneous neutralizing antibody and antibody-dependent cell cytotoxicity responses in HIV-1 elite controllers. *AIDS* **23**, 897–906 (2009).
135. Mousseau, G. *et al.* The Tat Inhibitor Didehydro-Cortistatin A Prevents HIV-1 Reactivation from Latency. *mBio* **6**, (2015).
136. Autran, B., Descours, B., Avettand-Fenoel, V. & Rouzioux, C. Elite controllers as a model of functional cure. *Curr Opin HIV AIDS* **6**, 181–187 (2011).
137. Valente, S. Silencing the HIV reservoir.
138. Services, D. of H. and H. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents Guidelines for the use of antiretroviral agents in adults and adolescents with HIV. *Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents Guidelines for the use of antiretroviral agents in adults and adolescents with HIV*. aidsinfo.nih.gov/guidelines/html/1/adult-and-adolescent (2018).
139. Grossman, Z., Meier-Schellersheim, M., Sousa, A. E., Victorino, R. M. M. & Paul, W. E. CD4+ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause? *Nat Med* **8**, 319–323 (2002).
140. Liu, Z. *et al.* CD8+ T-lymphocyte activation in HIV-1 disease reflects an aspect of pathogenesis distinct from viral burden and immunodeficiency. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **18**, 332–340 (1998).
141. McCune, J. M. The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease. *Nature* **410**, 974–979 (2001).
142. Deeks, S. G. & Walker, B. D. The immune response to AIDS virus infection: good, bad, or both? *J Clin Invest* **113**, 808–810 (2004).
143. Addo, M. M. *et al.* Fully differentiated HIV-1 specific CD8+ T effector cells are more frequently detectable in controlled than in progressive HIV-1 infection. *PLoS One* **2**, (2007).

144. Day, C. L. *et al.* PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* **443**, 350–354 (2006).
145. Petrovas, C. *et al.* PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *J Exp Med* **203**, 2281–2292 (2006).
146. Trautmann, L. *et al.* Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med* **12**, 1198–1202 (2006).
147. Kaufmann, D. E. *et al.* Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nat Immunol* **8**, 1246–1254 (2007).
148. Hsue, P. Y. *et al.* Role of viral replication, antiretroviral therapy, and immunodeficiency in HIV-associated atherosclerosis. *AIDS* **23**, 1059–1067 (2009).
149. Thornton, A. M. & Shevach, E. M. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* **164**, 183–190 (2000).
150. Nilsson, J. *et al.* HIV-1-driven regulatory T-cell accumulation in lymphoid tissues is associated with disease progression in HIV/AIDS. *Blood* **108**, 3808–3817 (2006).
151. Mathis, D. & Shoelson, S. E. Immunometabolism: an emerging frontier. *Nat Rev Immunol* **11**, 81 (2011).
152. Torre-Tarazona, E. D. La, Ayala-Suárez, R., Díez-Fuertes, F. & Alcamí, J. Omic Technologies in HIV: Searching Transcriptional Signatures Involved in Long-Term Non-Progressor and HIV Controller Phenotypes. *Front Immunol* **13**, (2022).
153. Park, S., Sadanala, K. C. & Kim, E. K. A Metabolomic Approach to Understanding the Metabolic Link between Obesity and Diabetes. *Mol Cells* **38**, 587–596 (2015).
154. Misra, B. B., Langefeld, C., Olivier, M. & Cox, L. A. Integrated omics: tools, advances and future approaches. *J Mol Endocrinol* **62**, R21–R45 (2019).
155. Ritchie, M. D., Holzinger, E. R., Li, R., Pendergrass, S. A. & Kim, D. Methods of integrating data to uncover genotype-phenotype interactions. *Nat Rev Genet* **16**, 85–97 (2015).
156. Koks, G., Pfaff, A. L., Bubb, V. J., Quinn, J. P. & Koks, S. At the dawn of the transcriptomic medicine. *Exp Biol Med* **246**, 286 (2021).
157. Tarancon-Diez, L. *et al.* Immunometabolism is a key factor for the persistent spontaneous elite control of HIV-1 infection. *EBioMedicine* **42**, 86–96 (2019).
158. Rodríguez-Gallego, E. *et al.* Proteomic profile associated with loss of spontaneous human immunodeficiency virus type 1 elite control. *Journal of Infectious Diseases* **219**, 867–876 (2019).
159. Peng, X. *et al.* Deep sequencing of HIV-infected cells: insights into nascent transcription and host-directed therapy. *J Virol* **88**, 8768–8782 (2014).

160. Xu, W. W. *et al.* Genome-wide search for the genes accountable for the induced resistance to HIV-1 infection in activated CD4+ T cells: apparent transcriptional signatures, co-expression networks and possible cellular processes. *BMC Med Genomics* **6**, (2013).
161. van 't Wout, A. B. *et al.* Cellular gene expression upon human immunodeficiency virus type 1 infection of CD4(+)-T-cell lines. *J Virol* **77**, 1392–1402 (2003).
162. Houzet, L. *et al.* MicroRNA profile changes in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) seropositive individuals. *Retrovirology* **5**, (2008).
163. Kim, V. N. & Nam, J. W. Genomics of microRNA. *Trends in Genetics* vol. 22 165–173 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.01.003> (2006).
164. Hariharan, M., Scaria, V., Pillai, B. & Brahmachari, S. K. Targets for human encoded microRNAs in HIV genes. *Biochem Biophys Res Commun* **337**, 1214–1218 (2005).
165. Klase, Z., Houzet, L. & Jeang, K. T. MicroRNAs and HIV-1: Complex interactions. *Journal of Biological Chemistry* vol. 287 40884–40890 Preprint at <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.415448> (2012).
166. Balasubramaniam, M., Pandhare, J. & Dash, C. Are microRNAs important players in HIV-1 infection? An update. *Viruses* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.3390/v10030110> (2018).
167. Donnelly, M. R. & Ciborowski, P. Proteomics, biomarkers, and HIV-1: A current perspective. *Proteomics Clin Appl* **10**, 110 (2016).
168. Li, M. Proteomics in the investigation of HIV-1 interactions with host proteins. *Proteomics Clin Appl* **9**, 221 (2015).
169. Aebersold, R. & Mann, M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature* **537**, 347–355 (2016).
170. Aslam, B., Basit, M., Nisar, M. A., Khurshid, M. & Rasool, M. H. Proteomics: Technologies and Their Applications. *J Chromatogr Sci* **55**, 182–196 (2017).
171. Rinschen, M. M., Ivanisevic, J., Giera, M. & Siuzdak, G. Identification of bioactive metabolites using activity metabolomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**, 353 (2019).
172. Sáez-Cirión, A. & Sereti, I. Immunometabolism and HIV-1 pathogenesis: food for thought. *Nature Reviews Immunology* **2020 21:1** **21**, 5–19 (2020).
173. Shoji-Kawata, S. & Levine, B. Autophagy, antiviral immunity, and viral countermeasures. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* vol. 1793 1478–1484 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.02.008> (2009).
174. 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).

175. Züllig, T., Trötz Müller, M. & Köfeler, H. C. Lipidomics from sample preparation to data analysis: a primer. *Anal Bioanal Chem* **412**, 2191 (2020).
176. Bowman, E. R. *et al.* Altered Lipidome Composition Is Related to Markers of Monocyte and Immune Activation in Antiretroviral Therapy Treated Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection and in Uninfected Persons. *Front Immunol* **10**, 785 (2019).
177. Grunfeld, C. Dyslipidemia and its Treatment in HIV Infection. *Topics in HIV medicine : a publication of the International AIDS Society, USA* vol. 18 112–118 Preprint at /pmc/articles/PMC3189481/ (2010).
178. El-Sadr, W. M. *et al.* Effects of HIV disease on lipid, glucose and insulin levels: Results from a large antiretroviral-naïve cohort. *HIV Med* **6**, 114–121 (2005).
179. Schütze, S., Wiegmann, K., Machleidt, T. & Krönke, M. TNF-Induced Activation of NF-κB. *Immunobiology* **193**, 193–203 (1995).
180. Freitas, P. *et al.* Impact of Lipodystrophy on the prevalence and components of metabolic syndrome in HIV-infected patients. *BMC Infect Dis* **11**, 1–11 (2011).
181. Gelpi, M. *et al.* Higher Risk of Abdominal Obesity, Elevated Low-Density Lipoprotein Cholesterol, and Hypertriglyceridemia, but not of Hypertension, in People Living With Human Immunodeficiency Virus (HIV): Results From the Copenhagen Comorbidity in HIV Infection Study. *Clin Infect Dis* **67**, 579–586 (2018).
182. Friis-Møller, N. *et al.* An updated prediction model of the global risk of cardiovascular disease in HIV-positive persons: The Data-collection on Adverse Effects of Anti-HIV Drugs (D:A:D) study. *Eur J Prev Cardiol* **23**, 214–223 (2016).
183. Mora, S. *et al.* Lipoprotein particle profiles by nuclear magnetic resonance compared with standard lipids and apolipoproteins in predicting incident cardiovascular disease in women. *Circulation* **119**, 931–939 (2009).
184. Gazi, I. F., Tsimihodimos, V., Tselepis, A. D., Elisaf, M. & Mikhailidis, D. P. Clinical importance and therapeutic modulation of small dense low-density lipoprotein particles. *Expert Opin Biol Ther* **7**, 53–72 (2007).
185. Duprez, D. A. *et al.* Lipoprotein particle subclasses, cardiovascular disease and HIV infection. *Atherosclerosis* **207**, 524–529 (2009).
186. Munger, A. M. *et al.* Characterization of lipid composition and high-density lipoprotein function in HIV-infected individuals on stable antiretroviral regimens. *AIDS Res Hum Retroviruses* **31**, 221–228 (2015).
187. Sitole, L. J., Williams, A. A. & Meyer, D. Metabonomic analysis of HIV-infected biofluids. *Mol Biosyst* **9**, 18–28 (2013).
188. 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).

189. Ruiz-Mateos, E., Poveda E, & MM, Lederman. Antiretroviral Treatment for HIV Elite Controllers? *Pathog Immun* **5**, 121–133 (2020).
190. Kind, T. *et al.* FiehnLib: mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem* **81**, 10038–10048 (2009).
191. Noel, N. *et al.* Immunologic and virologic progression in HIV controllers: The role of viral ‘blips’ and immune activation in the ANRS CO21 CODEX study. *PLoS One* **10**, (2015).
192. Boufassa, F. *et al.* CD4 dynamics over a 15 year-period among HIV controllers enrolled in the ANRS French Observatory. *PLoS One* **6**, (2011).
193. Egaña-Gorroño, L. *et al.* Differential MicroRNA expression profile between stimulated PBMCs from HIV-1 infected elite controllers and viremic progressors. *PLoS One* **9**, (2014).
194. Rotger, M. *et al.* Genome-wide mRNA expression correlates of viral control in CD4+ T-Cells from HIV-1-infected individuals. *PLoS Pathog* **6**, (2010).
195. Swaminathan, G., Martin-Garcia, J. & Navas-Martin, S. RNA viruses and microRNAs: Challenging discoveries for the 21st century. *Physiological Genomics* vol. 45 1035–1048 Preprint at <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00112.2013> (2013).
196. Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L. & Bradley, A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* **14**, 1902–1910 (2004).
197. Poliseno, L. *et al.* Identification of the miR-106b~25 microRNA cluster as a proto-oncogenic PTEN-targeting intron that cooperates with its host gene MCM7 in transformation. *Sci Signal* **3**, (2010).
198. Ramalingam, P. *et al.* Biogenesis of intronic miRNAs located in clusters by independent transcription and alternative splicing. *RNA* **20**, 76–87 (2014).
199. Quick-Cleveland, J. *et al.* The DGCR8 RNA-binding heme domain recognizes primary microRNAs by clamping the hairpin. *Cell Rep* **7**, 1994–2005 (2014).
200. Swaminathan, S., Murray, D. D. & Kelleher, A. D. The role of microRNAs in HIV-1 pathogenesis and therapy. *AIDS* **26**, 1325–1334 (2012).
201. Ayala-Suárez, R. *et al.* Insight in miRNome of Long-Term Non-Progressors and Elite Controllers Exposes Potential RNAi Role in Restraining HIV-1 Infection. *J Clin Med* **9**, 2452 (2020).
202. Su, B. *et al.* Potential Application of MicroRNA Profiling to the Diagnosis and Prognosis of HIV-1 Infection. *Front Microbiol* **9**, (2018).
203. Ahluwalia, J. K. *et al.* Human cellular microRNA hsa-miR-29a interferes with viral nef protein expression and HIV-1 replication. *Retrovirology* **5**, 117 (2008).

204. Cruz, N. V. G., Amorim, R., Oliveira, F. E., Speranza, F. A. C. & Costa, L. J. Mutations in the nef and vif genes associated with progression to AIDS in elite controller and slow-progressor patients. *J Med Virol* **85**, 563–574 (2013).
205. Mwimanzi, P. *et al.* Attenuation of multiple Nef functions in HIV-1 elite controllers. *Retrovirology* **10**, (2013).
206. Nathans, R. *et al.* Cellular MicroRNA and P Bodies Modulate Host-HIV-1 Interactions. *Mol Cell* **34**, 696–709 (2009).
207. Houzet, L. *et al.* The extent of sequence complementarity correlates with the potency of cellular miRNA-mediated restriction of HIV-1. *Nucleic Acids Res* **40**, 11684 (2012).
208. Kumar, A. *et al.* MicroRNA hsa-miR-324-5p Suppresses H5N1 Virus Replication by Targeting the Viral PB1 and Host CUEDC2. *J Virol* **92**, (2018).
209. Guan, G. *et al.* microRNA-423-3p promotes tumor progression via modulation of AdipoR2 in laryngeal carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* **7**, 5683 (2014).
210. Wang, R., Li, G., Zhuang, G., Sun, S. & Song, Z. Overexpression of microRNA-423-3p indicates poor prognosis and promotes cell proliferation, migration, and invasion of lung cancer. *Diagn Pathol* **14**, (2019).
211. He, J. F., Luo, Y. M., Wan, X. H. & Jiang, D. Biogenesis of MiRNA-195 and its role in biogenesis, the cell cycle, and apoptosis. *J Biochem Mol Toxicol* **25**, 404–408 (2011).
212. Swaminathan, G., Navas-Martín, S. & Martín-García, J. MicroRNAs and HIV-1 infection: Antiviral activities and beyond. *Journal of Molecular Biology* vol. 426 1178–1197 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.12.017> (2014).
213. Zahoor, M. A. *et al.* Expression profiling of human milk derived exosomal microRNAs and their targets in HIV-1 infected mothers. *Sci Rep* **10**, 1–16 (2020).
214. Guo, S. T. *et al.* MicroRNA-497 targets insulin-like growth factor 1 receptor and has a tumour suppressive role in human colorectal cancer. *Oncogene* **32**, 1910–1920 (2013).
215. Shen, C. J. *et al.* Translation of Pur- α is targeted by cellular miRNAs to modulate the differentiation-dependent susceptibility of monocytes to HIV-1 infection. *FASEB Journal* **26**, 4755–4764 (2012).
216. Chepenik, L. G., Tretiakova, A. P., Krachmarov, C. P., Johnson, E. M. & Khalili, K. The single-stranded DNA binding protein, Pur- α , binds HIV-1 TAR RNA and activates HIV-1 transcription. *Gene* **210**, 37–44 (1998).
217. Gallia, G. L. *et al.* Association of HIV-1 Tat with the cellular protein, Pur α , is mediated by RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11572–11577 (1999).
218. Kadri, F. *et al.* Defining Plasma MicroRNAs Associated With Cognitive Impairment In HIV-Infected Patients. *J Cell Physiol* **231**, 829–836 (2016).

219. Xie, N. *et al.* miR-27a Regulates Inflammatory Response of Macrophages by Targeting IL-10. *The Journal of Immunology* **193**, 327–334 (2014).
220. Zhang, L. *et al.* miR-27a suppresses EV71 replication by directly targeting EGFR. *Virus Genes* **49**, 373–382 (2014).
221. Sevastianova, K. *et al.* Adipose tissue inflammation and liver fat in patients with highly active antiretroviral therapy-associated lipodystrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295**, (2008).
222. Squillace, N. *et al.* Changes in subcutaneous adipose tissue microRNA expression in HIV-infected patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **69**, 3067–3075 (2014).
223. Aryal, B., Singh, A. K., Rotllan, N., Price, N. & Fernández-Hernando, C. MicroRNAs and lipid metabolism. *Current Opinion in Lipidology* vol. 28 273–280 Preprint at <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000420> (2017).
224. Mujawar, Z. *et al.* Human immunodeficiency virus impairs reverse cholesterol transport from macrophages. *PLoS Biol* **4**, 1970–1983 (2006).
225. Canfrán-Duque, A., Ramírez, C. M., Goedeke, L., Lin, C. S. & Fernández-Hernando, C. MicroRNAs and HDL life cycle. *Cardiovascular Research* vol. 103 414–422 Preprint at <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu140> (2014).
226. Rayner, K. J. *et al.* MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science (1979)* **328**, 1570–1573 (2010).
227. Wagschal, A. *et al.* Genome-wide identification of microRNAs regulating cholesterol and triglyceride homeostasis. *Nat Med* **21**, 1290–1297 (2015).
228. Martínez-González, E. *et al.* Comparison of methods and characterization of small RNAs from plasma extracellular vesicles of HIV/HCV coinfecting patients. *Sci Rep* **10**, 11140 (2020).
229. 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).
230. Scarpelini, 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**, (2016).
231. Wang, F. *et al.* Interferon Gamma Induces Reversible Metabolic Reprogramming of M1 Macrophages to Sustain Cell Viability and Pro-Inflammatory Activity. *EBioMedicine* **30**, 303–316 (2018).
232. Grunfeld, C. *et al.* Resting energy expenditure, caloric intake, and short-term weight change in human immunodeficiency virus infection and the acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Clin Nutr* **55**, 455–460 (1992).

233. Munshi, S. U., Rewari, B. B., Bhavesh, N. S. & Jameel, S. Nuclear magnetic resonance based profiling of biofluids reveals metabolic dysregulation in HIV-infected persons and those on anti-retroviral therapy. *PLoS One* **8**, (2013).
234. Sharpstone, D. R. *et al.* Energy balance in asymptomatic HIV infection. *AIDS* **10**, 1377–1384 (1996).
235. Garcia-Lorda, P. *et al.* Cytokine-driven inflammatory response is associated with the hypermetabolism of AIDS patients with opportunistic infections. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **24**, 317–322 (2000).
236. Pearce, E. L. Metabolism in T cell activation and differentiation. *Curr Opin Immunol* **22**, 314–320 (2010).
237. Maciolek, J. A., Alex Pasternak, J. & Wilson, H. L. Metabolism of activated T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* **27**, 60–74 (2014).
238. Chi, H. Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions. *Nature Reviews Immunology* vol. 12 325–338 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nri3198> (2012).
239. Besnard, E. *et al.* The mTOR complex controls HIV Latency. *Cell Host Microbe* **20**, 785 (2016).
240. Durán, R. v. *et al.* Glutaminolysis Activates Rag-mTORC1 Signaling. *Mol Cell* **47**, 349–358 (2012).
241. Owen, O. E., Kalhan, S. C. & Hanson, R. W. The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *Journal of Biological Chemistry* vol. 277 30409–30412 Preprint at <https://doi.org/10.1074/jbc.R200006200> (2002).
242. Yang, C. *et al.* Glutamine oxidation maintains the TCA cycle and cell survival during impaired mitochondrial pyruvate transport. *Mol Cell* **56**, 414–424 (2014).
243. Chowdhury, F. Z. *et al.* Metabolic pathway activation distinguish transcriptional signatures of CD8 + T cells from HIV-1 elite controllers HHS Public Access. *AIDS* **32**, 2669–2677 (2018).
244. Turk, G. *et al.* A Possible Sterilizing Cure of HIV-1 Infection Without Stem Cell Transplantation. *Ann Intern Med* **175**, 95–100 (2022).
245. Loucif, H. *et al.* Autophagy-dependent glutaminolysis drives superior IL21 production in HIV-1-specific CD4 T cells. *Autophagy* 1–18 (2021) doi:10.1080/15548627.2021.1972403.
246. Loucif, H. *et al.* Lipophagy confers a key metabolic advantage that ensures protective CD8A T-cell responses against HIV-1. *Autophagy* **17**, 3408–3423 (2021).
247. Bowman, E. & Funderburg, N. T. Lipidome abnormalities and cardiovascular disease risk in HIV infection. *Curr HIV/AIDS Rep* **16**, 214 (2019).

248. Tall, A. R. & Yvan-Charvet, L. Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nature Reviews Immunology* vol. 15 104–116 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nri3793> (2015).
249. Funderburg, N. T. & Mehta, N. N. Lipid Abnormalities and Inflammation in HIV infection. *Curr HIV/AIDS Rep* **13**, 218 (2016).
250. Breen, E. C. Pro- and anti-inflammatory cytokines in human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *Pharmacol Ther* **95**, 295–304 (2002).
251. El-Far, M. *et al.* Proinflammatory isoforms of IL-32 as novel and robust biomarkers for control failure in HIV-infected slow progressors. *Sci Rep* **6**, 22902 (2016).
252. Giron, L. B. *et al.* Phospholipid metabolism is associated with time to hiv rebound upon treatment interruption. *mBio* **12**, 1–6 (2021).
253. Isnard, S. *et al.* Anti-cytomegalovirus Immunoglobulin G Is Linked to CD4 T-cell Count Decay in Human Immunodeficiency Virus (HIV) Elite Controllers. *Clin Infect Dis* **73**, 144–147 (2021).
254. Sarkar, S. & Brown, T. T. Lipid Disorders in People with HIV. *Endotext* (2021).

