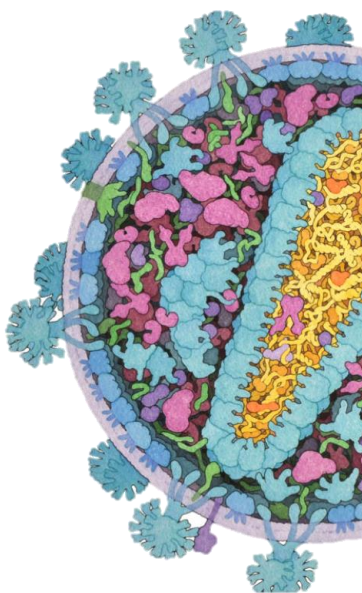




Nombre Consultor: Melchor Sánchez Martínez

Nombre Responsable Asociado: Israel Pagán

ABSTRACT

BACKGROUND

Molecular evolution speed of HIV-1 is commonly associated with HIV disease progression and ART viability. Knowing how HIV evolve under different regimens could help solving the eligibility criteria of the first line regimen of the paediatric patients.

METHODS

Forty-six patients with HIV-1 subtype B RT sequences available were enrolled in this study being classified in two groups according to their first line regimen (Group 1: 2NRTI + 1PI vs. Group 2: 2NRTI+1NNRTI). Phylogenetic trees were constructed in both groups by Bayesian and likelihood approaches. Temporal signal was analysed with TempEst by distance root-to-tip among time under treatment regression. Diversity comparisons were performed using HyPHY program in the complete sequence and in concatenated resistance positions (DRM) either in nucleotides sequences and codon analysis. Selection pressures were measured as the differences between non-synonymous mutation and synonymous.

RESULTS

Group 1 presented higher branches lengths in the complete RT sequence either nucleotides or synonymous mutations (LTR, $P < 0.001$) and similar trend in DRM sequence but with no statistical significance. Selection pressures was higher in Group 2 (0.146 vs. 0.165) in the complete sequence and in DRM sequences ((0.2 vs. 0.33).

CONCLUSIONS

When regimen ART targets a unique region of the virus as reverse transcriptase (Group 2) it provides higher selective pressure than targeting multiple regions as reverse transcriptase and protease (Group 1) and this could be translated in lower diversity outcomes either in total or resistance positions of HIV-1 reverse transcriptase.

SARA DOMÍNGUEZ

MASTER DE BIOINFORMÁTICA Y BIOESTADÍSTICA
(UOC)



Esta obra está sujeta a una licencia de Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada [3.0 España de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es/)

FICHA DEL TRABAJO FINAL

Título del trabajo:	HIV-1 subtype B molecular evolution across antiretroviral regimens
Nombre del autor:	Sara Domínguez Rodríguez
Nombre del consultor/a:	Melchor Sánchez Martínez
Nombre del PRA:	María Jesús Marco Galindo
Fecha de entrega (mm/aaaa):	26/12/2016
Titulación:	Máster Bioinformática y Bioestadística
Área del Trabajo Final:	Ad-Hoc
Idioma del trabajo:	Español
Palabras clave (max 3)	VIH, Tratamiento Antirretroviral, Diversidad
Resumen del Trabajo (máximo 250 palabras): Con la finalidad, contexto de aplicación, metodología, resultados y conclusiones del trabajo.	
CONTEXTO La velocidad de evolución del VIH-1 está directamente relacionada con la velocidad de progresión de la enfermedad y la viabilidad del TAR. En este trabajo se pretende conocer la evolución del virus en los diferentes regímenes de primera línea más comunes. MÉTODOLOGÍA Para este estudio se escogieron 46 pacientes con secuencia RT disponible tratados primariamente con uno de los dos regímenes (Grupo 1: 2ITIAN+1IP vs. Grupo 2: 2ITIAN+1ITINAN). Se construyeron árboles filogenéticos mediante aproximaciones bayesianas y de máxima verosimilitud. Se analizó la relación temporal entre el tiempo de tratamiento y diversidad y se comparó la diversidad genética en ambos grupos como proxy de velocidad de evolución. La presión de selección fue medida mediante la diferencia entre mutaciones no sinónimas y sinónimas. RESULTADOS A pesar de que el perfil inmunológico y virológico de los pacientes fue similar en ambos grupos ($P>0.05$), la diversidad fue mayor en el Grupo 1 ($P<0.001$, LTR) tanto en la secuencia de nucleótidos como en las mutaciones sinónimas. Cuando se analizaron las posiciones asociadas a resistencia a fármacos (DRM) se observó la misma tendencia que en la secuencia completa siendo mayor la longitud de las ramas en el Grupo 1 aunque no significativa ($P>0.05$). La presión de selección fue mayor en el Grupo 2. CONCLUSIONES La mayor presión de selección que existe en el Grupo 2 es debida a que existe una única diana en el virus (RT) dejando menos posibilidad al virus para su adaptabilidad lo que hace que tenga menor diversidad que en el grupo de pacientes con tratamiento dirigido a dos dianas virales diferentes PR y RT.	

Commented [SDR1]: ESTA ES LA FECHA DE ENTREGA DEL TRABAJO

Commented [SDR2]: SIGO DÁNDOLE VUELTAS PARA RESUMIRLO A 250 PALABRAS PERO ES UN HORROR

Abstract (in English, 250 words or less):

BACKGROUND

Molecular evolution speed of HIV-1 is commonly associated with HIV disease progression and ART viability. Knowing how HIV evolve under different regimens could help solving the eligibility criteria of the first line regimen of the paediatric patients.

METHODS

Forty-six patients with HIV-1 subtype B RT sequences available were enrolled in this study being classified in two groups according to their first line regimen (Group 1: 2NRTI + 1PI vs. Group 2: 2NRTI+1NNRTI). Phylogenetic trees were constructed in both groups by Bayesian and likelihood approaches. Temporal signal was analysed with TempEst by distance root-to-tip among time under treatment regression. Diversity comparisons were performed using HyPHY program in the complete sequence and in concatenated resistance positions (DRM) either in nucleotides sequences and codon analysis. Selection pressures were measured as the differences between non-synonymous mutation and synonymous.

RESULTS

Group 1 presented higher branches lengths in the complete RT sequence either nucleotides or synonymous mutations (LTR, $P < 0.001$) and similar trend in DRM sequence but with no statistical significance. Selection pressures was higher in Group 2 (0.146 vs. 0.165) in the complete sequence and in DRM sequences ((0.2 vs. 0.33).

CONCLUSIONS

When regimen ART targets a unique region of the virus as retrotranscriptase (Group 2) it provides higher selective pressure than targeting multiple regions as retrotranscriptase and protease (Group 1) and this could be translated in lower diversity outcomes either in total or resistance positions of HIV-1 retrotranscriptase.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 CONTEXTO Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	7
1.2 OBJETIVOS	10
1.3 ENFOQUE Y MÉTODO	10
1.4 PLANIFICACIÓN DE TRABAJO SEGUIDA	14
1.5 RESUMEN DE RESULTADOS	14
1.6 DESCRIPCIÓN DE OTROS CAPÍTULOS DE LA MEMORIA	15
2. RESULTADOS	16
POBLACIÓN DE ESTUDIO	16
ANÁLISIS DE TASAS DE SUSTITUCIÓN Y SEÑAL TEMPORAL	17
DIVERSIDAD GENÉTICA COMO PROXY DE VELOCIDAD EVOLUTIVA DEL VIH	17
PRESIONES DE SELECCIÓN	19
3. DISCUSIÓN	21
4. BIBLIOGRAFÍA	23

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CONTEXTO Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Epidemiología del VIH-1

La Organización Mundial de La Salud (OMS) en el último informe conjunto con Naciones Unidas publicado a principios de 2016, estima que cerca de 37 millones de personas estaban infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en el mundo (UNAIDS, 2016a, b). De ellos, casi 1.8 millones son niños menores de 15 años y 110 000 fallecieron a causa de la infección.

Como resultado de los servicios de prevención llevados a cabo por instituciones y gobiernos, la profilaxis en el parto y en el niño, el cuidado prenatal, alimentación artificial, la cesárea electiva y la monitorización del embarazo se ha observado un 70% menos de nuevas infecciones pediátricas entre 2000 y 2015. A pesar de este progreso tan significativo, el número de nuevas infecciones pediátricas por VIH permanece inaceptable llegando a ser de unas cifras de 150 000 infecciones en el 2015. A partir del 2015, la OMS revisó las recomendaciones para el inicio del tratamiento antirretroviral (TAR) indicando que todas las personas diagnosticadas de VIH iniciaran el tratamiento lo antes posible.

La terapia combinada TAR ha reducido la mortalidad y morbilidad asociada a la infección por VIH haciendo disminuir la replicación del virus y permitiendo que el sistema inmune recupere sus funciones normales y pueda crecer y desarrollarse, hecho particularmente importante en niños.

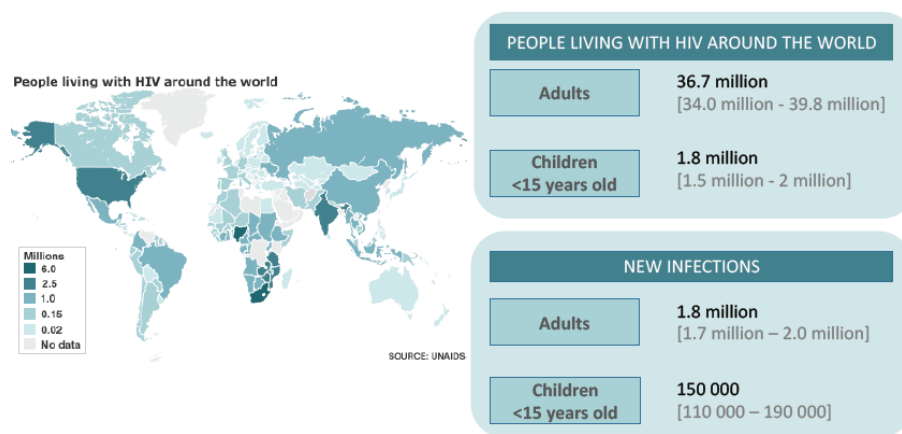


Figura.1: Datos epidemiológicos de la epidemia del VIH (UNAIDS 2015).

Biología del VIH-1

El VIH-1 es un virus ARN de la familia de los retrovirus (Retroviridae) perteneciente al género Lentivirus (Barré-Sinoussi et al., 1983). El virión maduro de VIH presenta dos copias de ARN de cadena simple de sentido positivo de aproximadamente 9.8Kb (Muesing et al., 1985) envueltas en una cápside de forma cónica, todo ello rodeado de una envuelta de membrana. El genoma del VIH contiene tres regiones codificantes principales: gag, pol y env, comunes a todos los retrovirus. El gen pol codifica las enzimas virales responsables de la maduración (proteasa, PR), síntesis de ADN a partir de ARN (retrotranscriptasa, RT) y de la integración del virus (integrasa, INT).

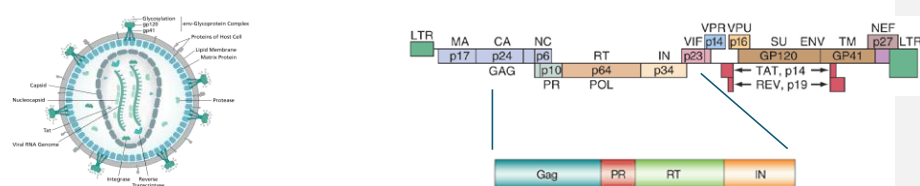


Figura 2. Representación de los componentes principales del virión de VIH y su genoma a la izquierda.

Tratamiento Antirretroviral (TAR)

El acceso al TAR ha cambiado radicalmente el curso de la infección por VIH-1, tanto en población adulta como pediátrica, reduciendo la mortalidad e incrementando la esperanza de vida de la población infectada por el virus (Sánchez et al., 2003; Judd et al., 2007). No obstante, el compromiso que exige la cronicidad del tratamiento y la selección de mutaciones de resistencia a los antirretrovirales, dificultan muchas veces el manejo de la infección, aumentando el riesgo de que existan eventos de fracaso terapéutico y/o virológico (WHO, 2016b). Al problema anterior, en pediatría se le añade la existencia de un menor número de fármacos aprobados, las formulaciones con mal sabor dificultando la administración (CEVIHP/SEIP/AEP/SPNS, 2015) y el retraso del desarrollo de nuevos ARV, cometiendo el error común de extrapolar los resultados y recomendaciones de adultos a población pediátrica.

El TAR está dirigido a las diferentes fases del ciclo de replicación del VIH y está distribuido en distintas clases en función del mecanismo molecular y perfil de resistencia. Los más comunes son los inhibidores de la retrotranscriptasa (Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósido, ITIAN; Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósido, ITINAN), inhibidores de la proteasa (IP) e inhibidores de la integrasa (INI).

Actualmente las guías de tratamiento frente al VIH recomiendan como terapia de inicio la combinación de dos ITIAN asociados a un tercer fármaco (CEVIHP/SEIP/AEP/SPNS, 2015). La elección de éste último, ya sea un ITINAN, un IP potenciado (IP/r) o un INI, se fundamenta sobre los datos de eficacia y seguridad de los ensayos clínicos, recomendaciones de las distintas guías y sobre varios factores clínicos específicos del paciente. En los últimos años, el aumento de la eficacia y mejora de la tolerabilidad han conseguido que la decisión acerca del tercer fármaco de inicio sea más discutida. Las guías actuales de inicio de TAR para niños con edad entre 3-10 años recomiendan utilizar 2ITIAN+1ITINAN (WHO, 2016) o utilizar 2ITIAN+1ITINAN/1IP/1INI en función

de factores clínicos e intrínsecos de las circunstancias del paciente como interacciones con otros fármacos o problemas de adherencia (AIDS.INFO.NIH, PENTA 2015, GESIDA 2016).

Diversidad genética y evolución molecular del VIH

De los virus descritos, el VIH es uno de los que presenta una mayor tasa evolutiva, es decir, un mayor número de cambios en el genoma por unidad de tiempo. Ello es resultado de sus elevadas tasas de replicación, mutación y recombinación (Perelson et al., 1996). Las mutaciones, incluyendo inserciones y deleciones, permanecen en el genoma debido a que la TI carece de actividad correctora de errores, siendo incapaz de eliminar los nucleótidos erróneamente incorporados durante la transcripción inversa. Las mutaciones sinónimas y no sinónimas se originan debido a la degeneración del código genético. Cuando la sustitución del nucleótido no produce un cambio de aminoácido el proceso recibe el nombre de mutación sinónima y si origina un cambio de aminoácido se denominará mutación no sinónima (Ross & Rodrigo, 2002).

Todo ello produce una alta diversidad genética tanto a nivel de paciente como a nivel poblacional. De modo que, dentro de un individuo infectado, el virus se organiza como una población altamente heterogénea de distintas variantes con genomas íntimamente relacionados pero no idénticos. Esta estructura poblacional llamada “cuasiespecie viral”, se caracteriza por un proceso constante de generación de mutantes, por la competición entre ellos y por la acción de eventos de selección positiva y/o negativa en las variantes generadas. Existe un equilibrio poblacional entre los nuevos mutantes y la eliminación de los menos viables (Briones & Domingo, 2008).

Por otro lado, en pacientes tratados, el TAR ha demostrado que tiene efectos muy complejos sobre la diversidad genética del virus, ya que puede promover la evolución adaptativa y la fijación de mutaciones de resistencia (las cuales van a conferir resistencia a los ARV) (Pennings, 2012) y en otros casos, puede reducir la diversidad genética (Kearney et al., 2014).

Una rápida evolución es clave en el éxito del virus, siendo su arma más eficaz ya que le permite evadir el sistema inmune, resistir a los tratamientos y permanecer impasible frente a las vacunas. A pesar de ello, la evolución del virus también puede ser la llave del desarme. Un mayor conocimiento del comportamiento del VIH producirá una mayor capacidad para contener la pandemia, mejorar el diseño de fármacos y vacunas y generar nuevas formas de luchar contra el VIH.

Justificación del trabajo final de máster

La velocidad de evolución del VIH-1 está directamente relacionada con la frecuencia de aparición de mutaciones que confieren resistencia frente a terapias antirretrovirales, así como con la velocidad de progresión de la enfermedad. Por tanto, entender cuál es la velocidad de evolución de las posiciones del genoma viral relacionadas con esta resistencia, y cómo diferentes regímenes de fármacos afectan a dicha velocidad de evolución, podría ayudar a mejorar los tratamientos contra el SIDA.

Si se identifican cuáles son las posiciones del genoma viral que evolucionan más despacio, se podrían plantear a nivel clínico terapias antirretrovirales con una durabilidad potencialmente más larga. Sin embargo, muy pocos estudios han abordado esta cuestión. Es más, a pesar de que cerca

de 2 millones de niños viven con VIH-1/SIDA actualmente (Datos UNAIDS 2016), la mayoría de estos estudios se han realizado en pacientes adultos.

Este Trabajo Fin de Máster pretende contribuir a generar el conocimiento que permita entender este proceso a partir de herramientas bioinformáticas filogenéticas en una cohorte pediátrica infectada por VIH-1.

1.2 OBJETIVOS

Objetivos generales:

- **Objetivo 1.** Estudiar el efecto de diferentes regímenes de tratamientos antirretrovirales sobre la velocidad de evolución del VIH-1 en la RT del VIH-1, una de las proteínas diana de fármacos antirretrovirales en uso terapéutico.
- **Objetivo 2.** Identificar los regímenes antirretrovirales que inducen a una menor velocidad de evolución del VIH-1 en los aminoácidos de la RT viral relacionados con resistencia antirretroviral.

Objetivos específicos:

Objetivo 1.1. Obtener secuencias de nucleótidos de la RT del VIH-1 de pacientes pediátricos de la cohorte de estudio disponibles en el laboratorio de Epidemiología Molecular del VIH-1 en el Hospital Ramón y Cajal de Madrid, así como la información asociada a estas secuencias relativa a los tratamientos antirretrovirales a los que se ha sometido al paciente del que proceden.

Objetivo 1.2. Calcular y comparar la velocidad de evolución del VIH-1 en la RT viral en función del tipo de tratamiento antirretroviral dirigido frente a esa proteína.

Objetivo 1.3. Identificar las posiciones asociadas a resistencia a terapias antirretrovirales en la RT viral y analizar si la velocidad de evolución de estas posiciones difiere en función del tratamiento.

Objetivo 2.1. Simular la velocidad de evolución del VIH-1 bajo diferentes combinaciones de antirretrovirales utilizando los datos del Objetivo 1.

Objetivo 2.2. Realizar un análisis comparativo de las diferentes simulaciones del **Objetivo 2.1.** identificando la combinación de antirretrovirales que resulta en una menor velocidad de evolución del VIH-1.

Commented [SDR3]: AQUÍ AL FINAL NO HEMOS HECHO ESTO VERDAD? LO QUITO O LO DEJO?

1.3 ENFOQUE Y MÉTODO

Selección de grupos de estudio

Para la realización del trabajo se seleccionaron los pacientes en grupos de estudio que seguían los siguientes criterios de elegibilidad:

- Pacientes infectados por virus VIH-1 Subtipo B para minimizar posibles diferencias debidas a las propias características del subtipo del virus.
- Pacientes que tuvieran disponible una secuencia de retrotranscriptasa asociada registrada en el Laboratorio de Epidemiología Molecular del VIH-1 en el Hospital Ramón y Cajal
- Pacientes que tuvieran asociado a esa secuencia genética de la retrotranscriptasa viral un dato conocido del tiempo en tratamiento antirretroviral
- Pacientes que hubieran estado con uno de los dos regímenes a comparar siendo éstos usados como primera línea de tratamiento (no pretatados con regímenes diferentes)

Para evitar posibles interferencias que pudieran tener un efecto de confusión sobre nuestros resultados se excluyeron aquellos pacientes que presentaran coinfecciones con otros virus como Virus de la Hepatitis B o Virus de la Hepatitis C, que hubieran estado menos de un mes en tratamiento antirretroviral, que tuvieran indeterminaciones en bases nucleótidas debido a la técnica de secuenciación o recombinantes intrasubtipo B.

De esta manera se obtuvieron tres grupos de secuencias:

- GRUPO 1 (n=18): Secuencias RT con TAR 2NRTI+1PI
- GRUPO 2 (n=28): Secuencias RT con TAR 2NRTI+1NNRTI
- GRUPO 3 (n=46): Total de secuencias

Cada secuencia tenía asociado un tiempo en días correspondiente al tiempo que llevan en ese régimen de tratamiento. Este tiempo será calculado a partir de la fecha de toma de muestra para secuenciar y la fecha de inicio de tratamiento.

De cada grupo de secuencias se obtuvieron las secuencias completas y las secuencias concatenadas de nucleótidos codificantes para posiciones asociadas a mutaciones de resistencia a fármacos DRM).

Debido a la diferencia de tamaño muestral existente entre ambos grupos de estudio se realizaron remuestreos aleatorios con reposición (bootstrap) en el Grupo 2 creando diez remuestreos con 18 secuencias cada uno.

Alineamientos y edición de las secuencias

El alineamiento de las secuencias se realizó mediante alineamiento múltiple por MUSCLE implementado en el software MEGA 7.0, editando manualmente el alineamiento con el fin de que todas las secuencias tuvieran la región de la RT con misma longitud y múltiplo de tres en fase de lectura de la proteína.

Análisis filogenético

Con la información anterior se construyeron árboles filogenéticos de cada grupo mediante aproximaciones bayesianas basadas en teoría de coalescencia y mediante el método de máxima verosimilitud o Maximum likelihood.

a) Análisis filogenético Bayesiano

La inferencia bayesiana en filogenia genera la probabilidad posterior de un árbol filogenético basado en la probabilidad de ese parámetro y la función de verosimilitud de los datos. De forma contraria al método de máxima probabilidad, la inferencia bayesiana calcula la probabilidad de que el árbol sea correcto basándose en los parámetros poblacionales de tu población estableciendo así primero un criterio poblacional y luego un análisis y no al revés calculando la probabilidad de que nuestros datos se adapten al árbol.

La estadística bayesiana especifica a priori, sin conocer los parámetros que se utilizarán en el modelo, unas distribuciones para describir la población de secuencias y los valores que éstos pueden tomar. La probabilidad posterior de un árbol (probabilidad de que el árbol sea correcto dados unos datos y un modelo evolutivo) se calcula mediante el Teorema de Bayes, evaluando

todos los posibles árboles y, para cada árbol, investigando todas las posibles combinaciones de longitudes de ramas y parámetros evolutivos aproximándose a la distribución de la probabilidad posterior a través de algoritmos Markov Chain Monte Carlo (MCMC).

Los algoritmos MCMC se basan en cadenas con eslabones que parten de un árbol al azar (con una topología, longitudes de rama y parámetros del modelo) y realiza cierto número de cambios para generar nuevos árboles modificando ligeramente el árbol inicial. Tras cada generación, el cambio se acepta o se rechaza en función de la razón de probabilidades posteriores del nuevo y anterior árbol del que surgieron las modificaciones. Si esta razón es mayor que uno el nuevo árbol es más probable y el cambio se acepta, siguiendo la cadena MCMC.

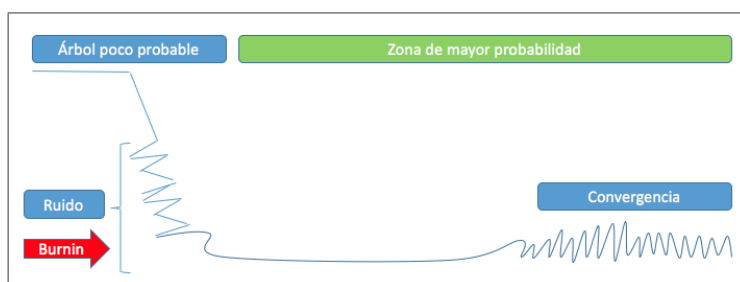


Figura.3: Representación de algoritmo Markov Chain Monte Carlo (MCMC). Durante las generaciones iniciales de las cadenas MCMC, los árboles tienen una probabilidad posterior muy baja, lo que conocemos como ruido, burnin o calentamiento. Tras esa fase inicial, las cadenas alcanzan una fase estacionaria donde los árboles alcanzan una probabilidad posterior elevada hasta que convergen en una zona de máxima probabilidad posterior (resumiendo en un árbol consenso).

La distribución que siguen estas probabilidades posteriores es una distribución gamma en el que existen pocos datos con un valor muy alto y todos los demás con un valor bajo. Esta distribución se puede definir por intervalos ("intervalos gamma") y por una forma de la curva ("valor alpha o gamma shape").

Para evitar que la cadena se quede atrapada, la inferencia bayesiana utiliza varias cadenas MCMC simultáneamente. El programa MrBayes generalmente implementa cuatro cadenas MCMC, una cadena "fría" y tres "calientes" (elevando la probabilidad posterior en una potencia entre 0 y 1 para dar saltos mayores). Durante el proceso las cadenas se intercambian para que ninguna quede atrapada en el bucle. El factor "temperatura de las cadenas" y "la convergencia de las cadenas/Average Standard Deviation of Split Frequencies" son variables importantes para saber si las cadenas MCMC de nuestro análisis han explorado de forma eficiente el conjunto de los datos. Una diferencia $<sd=0.05$ suele indicarnos que las cadenas han convergido.

b) Análisis filogenético por máxima verosimilitud

Este método infiere una distribución de probabilidad asignando probabilidades a los posibles árboles que se van generando. De esta manera, al contrario que el anterior, primero se generan los árboles y luego se les asigna una probabilidad. Una de las características de este método es que requiere un modelo de sustitución de bases nucleotídicas para estimar la probabilidad de cada tipo de mutación en las secuencias, el árbol que requiera más mutaciones en sus nodos internos para explicar los datos observados será menos verosímil.

Para elegir qué modelo se ajusta más a la población de secuencias se utiliza el programa JModeltest que implementa dos criterios (Criterio de información de Akaike (AIC) y Criterio de información bayesiano (BIC)).

- AIC es una medida de la calidad relativa de un modelo estadístico. Analiza la bondad de ajuste y complejidad del modelo basándose en la entropía de información “cuánta información perdería cuando se utiliza un modelo”.
- BIC se basa en la función de probabilidad. Introduce la penalización para el número de parámetros al igual que AIC pero menos flexible. El modelo con menor valor de BIC será el que menos información pierde.

Una vez seleccionado el mejor modelo, JModeltest nos da el nombre del modelo seleccionado por el criterio que hayamos elegido, el código del modelo/partition de seis dígitos enteros, el $-lnL$ que nos da idea de la información perdida, el valor kappa, la frecuencia de bases nucleotídica y de pares de bases y el valor alpha/gamma shape.

Para generar los árboles por análisis de máxima verosimilitud utilizamos PhyML, un paquete de programas que implementa diversas funciones y nos permite añadir el modelo customizado.

Se generarán los árboles de los tres grupos de secuencias, con las secuencias RT completas y con las posiciones de resistencia concatenadas.

Análisis de la señal temporal

A diferencia de la mayoría de los métodos de inferencia filogenética la aproximación utilizada en este trabajo incorpora una componente temporal a la reconstrucción filogenética. Para analizar si existe una señal temporal o temporalidad sincronizada (clocklikeness) de la filogenia molecular se utilizará la herramienta TempEst (antes denominada Path-O-Gen). Las secuencias, con un dato temporal diferente, en este caso el tiempo que llevan bajo un tratamiento antirretroviral en días, y los árboles que se han generado por inferencia bayesiana se introducirán en el programa. Se analizará la hipótesis de reloj-molecular de las secuencias.

Estimación las tasas de evolución del virus

Una vez validado que existe una cronología temporal de las secuencias o señal temporal, se procederá al análisis de divergencia y análisis de evolución.

El paquete “Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees- BEAST” implementa una serie de algoritmos MCMC para inferencia bayesiana filogenética molecular, integrando hipótesis evolutivas en el espacio y tiempo. Se obtendrán las tasas de sustitución/sitio/día de los diferentes grupos de secuencia en función de su régimen de tratamiento.

Para abordar el Objetivo 2, se realizarán simulaciones forward-in-time mediante programas informáticos usando la información obtenida en el Objetivo 1. Aunque hay un gran número de programas que puede realizar estas simulaciones, en este trabajo se utilizarán programas específicamente diseñados para simular la evolución de poblaciones virales.

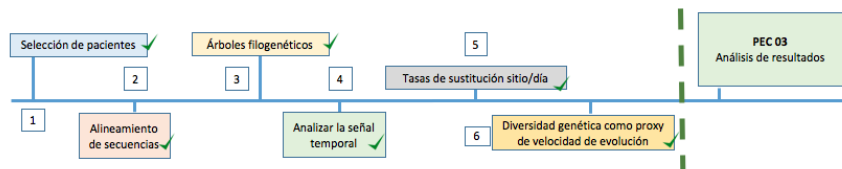
Comparación de diversidad genética

Tomando la diversidad genética como *proxy* de velocidad de evolución, se compararon las longitudes de las ramas de los árboles filogenéticos construidos a partir de las secuencias nucleotídicas y codones de los grupos de estudio. Para establecer una comparación ajustada por el tiempo en tratamiento se concatenaron las secuencias siguiendo un orden de tiempo en días de tratamiento. El análisis se realizó a partir de los árboles de dos particiones, cada una correspondiente un grupo de estudio, estableciendo una hipótesis nula con una constricción de la longitud de las ramas (longitud de las ramas grupo 1 = longitud de las ramas grupo 2) y una hipótesis alternativa (longitud de las ramas grupo 1 $\neq$ longitud de las ramas grupo 2). El análisis se realizó para cada replicado del grupo 2 y para las secuencias completa y secuencias de posiciones asociadas a mutaciones de resistencia.

Análisis Estadístico

Las diferencias en las frecuencias de datos clínicos epidemiológicos de ambos grupos fueron analizadas mediante un test chi cuadrado o Fisher cuando fue necesario con un nivel de significación del 95%. Los test no paramétricos para la comparación de medianas fueron realizados por la prueba U de Mann-Whitney mediante el paquete de programas R (www.r-project.org). La comparación de longitud de las ramas de los árboles filogenéticos fue realizada por un test de cociente de verosimilitud o Likelihood Test Ratio (LTR) con un nivel de significación del 95% implementado en HyPHY (*Hypothesis testing using phylogenies*) (Sergei L., 2004).

1.4 PLANIFICACIÓN DE TRABAJO SEGUIDA



codones. Analizando únicamente las posiciones asociadas a resistencia el Grupo 1 presentó la misma tendencia anterior aunque sin significación, probablemente por el escaso tamaño muestral. La presión de selección medida como la diferencia entre mutaciones no sinónimas (dN) y mutaciones sinónimas (dS) fue mayor en el Grupo 2.

1.6 DESCRIPCIÓN DE OTROS CAPÍTULOS DE LA MEMORIA

- I. INTRODUCCIÓN
- II. RESULTADOS
- III. DISCUSIÓN
- IV. CONCLUSIONES

2. RESULTADOS

POBLACIÓN DE ESTUDIO

Los pacientes de ambos grupos presentaron una distribución en género similar y una edad media a la fecha de toma de muestra mayor en el Grupo 2 ($P=0.039$). La mayoría de los pacientes fueron de nacionalidad española en el Grupo 1 y de nacionalidad hondureña en el Grupo 2. La mediana de edad a toma de la muestra fue de 3.98 en el Grupo 1 y 7.29 en el Grupo 2 ($P>0.05$) y a fecha de diagnóstico fueron los pacientes del Grupo 2 los diagnosticados más tardíamente con una mediana de edad de 0.54 para el Grupo 1 y 1.75 en el Grupo 2 ($P=0.035$, Wilcoxon=165).

La transmisión fue vertical en todos los pacientes teniendo un perfil inmunológico (número de linfocitos T CD4+) similar con una mediana de 1255 (IQR: 679.9-1943) en el Grupo 1 y de 889.1 (IQR: 469-1320) en el Grupo 2. La carga viral de VIH en plasma en ambos grupos de pacientes fue también parecido ($P=0.485$).

Como cabía esperar, aquellos pacientes del Grupo 1, tratados con el tercer fármaco del régimen a inhibidores de la proteasa presentaron mayor número de mutaciones de resistencia a estos fármacos ($P=0.04$) y aquellos pacientes del Grupo 2, tratados con el tercer fármaco a NNRTI, presentaron mayor número de mutaciones de resistencia a NNRTI ($P=0.001$).

Los datos clínico inmunológicos se resumen en la Tabla 1.

Características epidemiológicas y virológicas de la población de estudio			
	Grupo 1 [Régimen 2ITIAN + 1 IP] n=18	Grupo 2 [Régimen 2ITIAN+ 1 ITINAN] n=28	P-valor
Características demográficas			
Género Femenino	9 (50%)	12 (42.9%)	0.768 ^F
Edad en años (IQR)	3.98 [2.2-8.21]	7.29 (5.52-11.41)	0.079 ^W
Edad al diagnóstico en años (IQR)	0.54 [0.14-2.1]	1.75 [1-3.76]	0.035 ^{*W}
Origen			
España	14 (77.8%)	4(13.8%)	<0.001 ^{F****}
Honduras	2 (11.1%)	21(72.4%)	<0.001 ^{F****}
Otros	2(11.1%)	4(13.8%)	1 ^F
Ruta de transmisión del VIH			
Perinatal	18 (100%)	29 (100%)	-
Características clínicas			
CD4 (mm ³)	1255[27, 2936]	827.4 [111, 1590]	0.227 (T=1.25)
Tiempo en tratamiento (días)	1202,7[27, 2723]	1724.8 [19, 4090]	0.058 (T=-1.95)
Características virológicas			
Carga viral (cp/mL)	110 364 [50, 250 000]	59 552 [1010, 750 000]	0.485 (T=0.71)
Pacientes con MDR a ITIAN	7 (38.9%)	12 (42.9%)	1 ^F
Pacientes con MDR a ITINAN	3 (16.7%)	19 (67.9%)	0.001 ^{F****}
Pacientes con MDR a IP	5 (27.8%)	2 (0.7%)	0.04 ^{F*}

Tabla 1. Características basales epidemiológicas, clínicas y virológicas de los pacientes incluidos en el estudio. MDR: Mutaciones de resistencia a fármacos; ITIAN: Inhibidores de la RT análogos de nucleósido; ITINAN: Inhibidores de la RT no análogos de nucleósido; IP: Inhibidores de la PR; F: Test de Fisher; T: Test de Student; W: Wilcoxon Rank Sum Test; * P-valor<0.05; ** P-valor<0.01; *** P-valor<0.001

ANÁLISIS DE TASAS DE SUSTITUCIÓN Y SEÑAL TEMPORAL

Se contrastó la existencia de una relación entre el tiempo en tratamiento y la distancia a la raíz del árbol. La pendiente en todos los grupos fue cercana a cero y el coeficiente de determinación muy bajo por lo que no se aceptó la hipótesis de una señal temporal fiable en estos árboles (Tabla 2).

	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3 (total)	
	Sec. total	Sec. MDR	Sec. total	Sec. MDR	Sec. total	Sec. MDR
Pendiente (Tasa de sustitución)	0	0	0	5.18e-8	0	1.02e-7
Coefficiente de correlación	-0.57	-0.012	-0.52	2.52e-2	-0.52	3.66e-2
R ²	0.32	1.44e-4	0.27	6.36e-4	0.27	1.35e-3
Mínimos cuadrados de residuos	2.07e-3	1.46e-4	5.53e-4	2.03e-4	2.68e-4	2.36e-4

Tabla 2. Resultados obtenidos de análisis de señal temporal en los árboles filogenéticos del Grupo 1, Grupo 2 y Grupo 3 que contiene el total de secuencias analizadas. No existe relación entre el tiempo de tratamiento y la distancia genética medida como la longitud de las ramas.

DIVERSIDAD GENÉTICA COMO PROXY DE VELOCIDAD EVOLUTIVA DEL VIH

El Grupo 1 (2NRTI+1PI) presentó una longitud de las ramas mayor (LTR, $P < 0.001$) tanto cuando se comparaban los árboles filogenéticos construidos a partir de las secuencias de nucleótidos como la secuencia de mutaciones sinónimas analizando aminoácidos (Tabla 3, Figura 1).

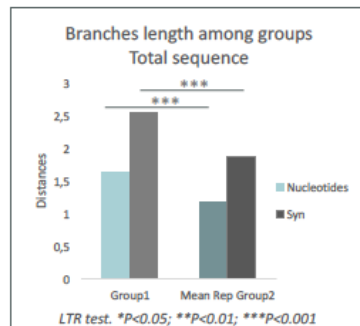


Figura 4. Longitud de las ramas total del Grupo 1 comparada con la media de las longitudes totales de las ramas de los replicados del Grupo 2 tanto en los árboles construidos a partir de nucleótidos como para secuencias de aminoácidos.

θ (Branches Length)				
STUDY GROUPS	Nucleotide sequence		Synonymous mutation	
	Branches	Comparison with Group1	Branches	Comparison with Group1
Group 1	1.62	-	2.54	-
Comparison Rep- 2.1	1.51	LR=111.35 P=1.05e-10***	2.19	LR=102.31 P=7.38e-11***
Comparison Rep- 2.2	0.86	LR=115 P=2.72e-11***	2.26	LR=113.3 P=5.11e-11***
Comparison Rep- 2.3	1.15	LR=196.24 P<0.001***	1.65	LR=193.66 P<0.001***
Comparison Rep- 2.4	0.97	LR=197.17 P<0.001***	1.43	LR=196.77 P<0.001***
Comparison Rep- 2.5	1.07	LR=234.21 P<0.001***	1.62	LR=232.43 P<0.001***
Comparison Rep- 2.6	1.08	LR=165.15 P<0.001***	1.61	LR=165.35 P<0.001***
Comparison Rep- 2.7	1.59	LR=181.18 P<0.001***	2.09	LR=116.36 P=1.64e-11***
Comparison Rep- 2.8	1.56	LR=117.5 P<1.07e-11***	2.22	LR=116.36 P=1.64e-11***
Comparison Rep- 2.9	1.01	LR=213.48 P<0.001***	1.58	LR=213.86 P<0.001***
Comparison Rep- 2.10	1.01	LR=234.13 P<0.001***	1.62	LR=213.86 P<0.001***

LTR test. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001

Tabla 3. Longitud de las ramas total del Grupo 1 comparada con las longitudes totales de las ramas de los replicados del Grupo 2 tanto en los árboles construidos a partir de nucleótidos como para secuencias de aminoácidos.

Analizando únicamente las posiciones asociadas a resistencia a fármacos inhibidores de la RT, el grupo 1 presentó una tendencia a tener una longitud mayor de las ramas tanto para la secuencia de nucleótidos como para mutaciones sinónimas como pasaba para la secuencia total de todas las posiciones. A pesar de ello, esta tendencia no es significativa probablemente debido a obtener poca potencia estadística por el número de muestra y el tener pocos nucleótidos a comparar (48 nucleótidos).

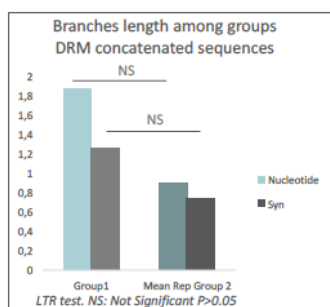


Figura 5. Longitud de las ramas de las posiciones de resistencia del Grupo 1 comparada con la media de las longitudes totales de las ramas de las posiciones de resistencia de los replicados del Grupo 2 tanto en los árboles construidos a partir de nucleótidos como para secuencias de aminoácidos.

θ (Branches length)				
STUDY GROUPS	Nucleotide sequence		Synonymous mutation	
	Branches	Comparison with Group1	Branches	Comparison with Group1
Group 1	1.88	-	1.26	
Comparison Rep- 2.1	0.84	LR=36.05 P=0.285	0.94	LR=36.17 P=0.28
Comparison Rep- 2.2	0.79	LR=40.76 P=0.138	0.76	LR=36.3 P=0.275
Comparison Rep- 2.3	1.15	LR=48.88 P=0.028*	0.66	LR=37.52 P=0.231
Comparison Rep- 2.4	0.72	LR=46.34 P=0.049*	0.62	LR=38.45 P=0.201
Comparison Rep- 2.5	0.98	LR=54.66 P=0.008**	0.83	LR=54.66 0.089
Comparison Rep- 2.6	1.02	LR=37.53 P=0.237	0.96	LR=33.01 P=0.418
Comparison Rep- 2.7	1.06	LR=37.33 P=0.237	0.94	LR=29.67 P=0.586
Comparison Rep- 2.8	0.98	LR=55.44 P=0.006**	0.68	LR=55.44 P=0.105
Comparison Rep- 2.9	0.69	LR=42.16 P=0.108	0.53	LR=42.16 P=0.108
Comparison Rep- 2.10	0.69	LR=42.16 P=0.108	0.53	LR=42.16 P=0.108

LTR test. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001

Tabla 4. Longitud de las ramas de las posiciones de resistencia del Grupo 1 comparada con la media de las longitudes totales de las ramas de las posiciones de resistencia de los replicados del Grupo 2 tanto en los árboles contruidos a partir de nucleótidos como para secuencias de aminoácidos.

Para determinar si esta mayor diversidad del Grupo 1 se debía a un efecto aditivo de las posiciones de resistencia y el resto de la proteína o se trataba de un efecto global se realizó el mismo análisis utilizando las posiciones de RT excluyendo aquellas posiciones conocidas asociadas a resistencia a ITIAN. El mismo efecto fue observado, tanto en la secuencia de nucleótidos como en mutaciones sinónimas el Grupo 1 presentó mayor longitud de las ramas (P<0.001***).

PRESIONES DE SELECCIÓN

Se calcularon las presiones de selección en ambos grupos de estudio, medida como la diferencia entre el número de mutaciones no sinónimas (dN) y número de mutaciones sinónimas (dS). El grupo 1 presentó un valor dN-dS mayor que el grupo 2 en la totalidad de la proteína (0,146 vs. 0.165) y en las posiciones asociadas a resistencia a fármacos (0.2 vs. 0.33) representado en la Figura 6.

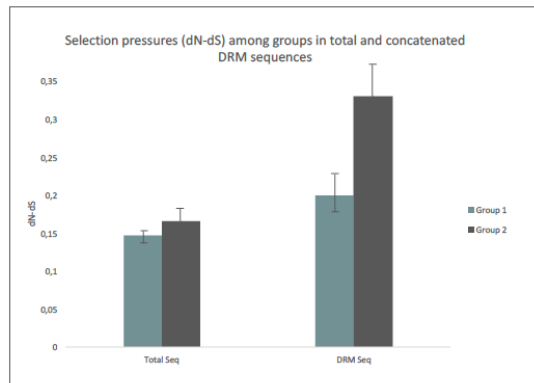


Figura 6. Presión de selección (dN-dS) de los dos grupos de estudio en el total de la secuencia para retrotranscriptasa (Total Seq) y en las posiciones asociadas a mutaciones de resistencia (DRM seq).

3. DISCUSIÓN

Múltiples estudios han abordado la comparación de posibles terceros fármacos asociados a los dos ITIAN en el tratamiento inicial para el VIH-1. A pesar de que ensayos clínicos pediátricos como PENPACT-1/PENTA9 (Babiker, A., 2011) y PROMOTE-pediatrics-trial (Achan J., 2012) exponen una eficacia inmunológica, virológica y clínica parecida utilizando IPs o ITINANs como tercer fármaco de elección, existen estudios con resultados diferentes para estos dos posibles regímenes. El estudio IMPAACT P1060 (Palumbo P., 2011) muestra un mayor fallo terapéutico a nevirapina (ITINAN) en niños menores de 3 años comparado con lopinavir/ritonavir (IP) mientras que en el estudio NEVEREST (Coovadia A., 2015) se observan mejores resultados en estatus inmunológico y crecimiento de los pacientes con nevirapina. Las guías actuales de tratamiento recomiendan la elección del tercer fármaco basándose en datos clínicos particulares de los pacientes como adherencia, interacción con otros fármacos y preferencias del paciente si existieran (PENTA 2015, GESIDA 2016, AIDS NIH, 2015).

A pesar de la gran cantidad de trabajos relacionados con la elección del régimen de tercer fármaco, la mayoría se basan en perfiles inmunológicos y eficacia de tratamiento y muy pocos tienen en cuenta el comportamiento evolutivo del virus en los diferentes regímenes. Un estudio reciente en adultos ha relacionado la efectividad de los diferentes fármacos antirretrovirales y sus combinaciones con la diversidad genética medida como *p-thinning* en las posiciones asociadas a mutaciones de resistencia concluyendo que los regímenes basados en 2ITIAN+1ITINAN presentaron menor cambio de diversidad comparado con los regímenes 2ITIAN+1PI y en menor medida con 2ITIAN+1PI con potenciadores (Feder A., 2016).

Los dos grupos de pacientes incluidos en nuestro estudio presentaron perfiles inmunológicos y cargas virales sin diferencias significativas, por lo que de forma global se podría decir que ambos tratamientos están siendo igualmente eficaces para similares tiempos en ellos y edad de los niños. Atendiendo a la evolución molecular del virus, nuestros resultados muestran una mayor diversidad genética, y por tanto velocidad de evolución, en el grupo de pacientes tratados con 2ITIAN+1PI, tanto en secuencia nucleotídica como cuando se comparaba la secuencia traducida a amino ácidos para mutaciones sinónimas. Cuando comparamos únicamente las posiciones asociadas a resistencia se pudo observar el mismo resultado por lo que parece existir el mismo fenómeno observado previamente en adultos (Feder A., 2016). Por tanto, parece observarse que esta mayor diversidad no es solo en las posiciones de resistencia asociadas a ITIAN sino que es un efecto global en toda la RT.

Cuando se analizó la presión de selección se pudo observar que el grupo de secuencias procedentes de los pacientes tratados con ITINAN como tercer fármaco de inicio presentaban mayor dN-dS. Este resultado concuerda con lo esperado ya que el régimen basado en una única diana en el virus es aquel que tiene mayor presión de selección sobre ella. Este hecho podría explicar el efecto de una menor diversidad genética puesto que cualquier posible cambio podría conllevar una pérdida de fitness viral.

La asociación de la diversidad genética con la progresión a la enfermedad es un tema de controversia. En niños existen estudios que han asociado una mayor diversidad genética con una

lenta progresión en la enfermedad (Williammson S, 2003; Halapi E., 1997) mientras que otros no han encontrado dicha relación (Zhang H, 2010).

Feder A. et al. descubrieron que pacientes VIH+ tratados con regímenes y combinaciones de éstos muy eficaces tenían poblaciones de VIH que evolucionaban bajo una deriva muy estricta teniendo menor probabilidad de ocurrir mutaciones de resistencia en la población VIH intrahuesped. Derivas genéticas fuertes reducen notablemente la diversidad genética en las poblaciones de forma similar a un cuello de botella (Kaplan et al., 1989).

El resultado clave de este estudio es que a pesar de existir resultados clínicos parecidos en ambos regímenes demostrado en estudios anteriores y en nuestros resultados, el VIH-1 no evoluciona de la misma forma ni con la misma velocidad en ellos, siendo mayor cuando los tratamientos tienen dianas del ciclo viral diferente.

Aunque nuestros resultados parecen ser robustos por la cantidad de criterios de inclusión y exclusión de los pacientes y por la realización de replicados para generar los análisis, este estudio tiene la limitación de cualquier estudio observacional. Futuros análisis de posibles combinaciones dentro del mismo régimen serían necesarios para determinar si se trata de un fenómeno asociado a la familia de fármaco o bien al fármaco en sí mismo.

4. BIBLIOGRAFÍA

Achan J, Kakuru A, Ikilezi G, Ruel T, Clark TD, Nsanzabana C, et al. Antiretroviral agents and prevention of malaria in HIV-infected Ugandan children. *N Engl J Med* [Internet]. 2012 Nov 29 [cited 2016 Dec 11];367(22):2110–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23190222>

Bamford A, Turkova A, Lyall H, Foster C, Klein N, Bastiaans D, et al. Paediatric European Network for Treatment of AIDS (PENTA) guidelines for treatment of paediatric HIV-1 infection 2015: optimizing health in preparation for adult life. *HIV Med* [Internet]. 2015 Feb [cited 2016 Nov 24];n/a-n/a. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/hiv.12217>

Bamford A, Turkova A, Lyall H, Foster C, Klein N, Bastiaans D, et al. Paediatric European Network for Treatment of AIDS (PENTA) guidelines for treatment of paediatric HIV-1 infection 2015: optimizing health in preparation for adult life. *HIV Med* [Internet]. 2015 Feb 3 [cited 2016 Nov 24]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25649230>

Barlow-Mosha L, Angelidou K, Lindsey J, Archary M, Cotton M, Dittmer S, et al. Nevirapine-Versus Lopinavir/Ritonavir-Based Antiretroviral Therapy in HIV-Infected Infants and Young Children: Long-term Follow-up of the IMPAACT P1060 Randomized Trial.

Barlow-Mosha L, Angelidou K, Lindsey J, Archary M, Cotton M, Dittmer S, et al. Nevirapine- Versus Lopinavir/Ritonavir-Based Antiretroviral Therapy in HIV-Infected Infants and Young Children: Long-term Follow-up of the IMPAACT P1060 Randomized Trial. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2016 Oct 15 [cited 2016 Dec 11];63(8):1113–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27439527>

Barre-Sinoussi F, Chermann J, Rey F, Nugeyre M, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* (80-). 1983;220(4599).

Briones C, Domingo E. Minority report: hidden memory genomes in HIV-1 quasispecies and possible clinical implications. *AIDS Rev* [Internet]. [cited 2016 Dec 11];10(2):93–109. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18615120>

Chamberland A, Sylla M, Boulassel MR, Baril J-G, Cote P, Thomas R, et al. Effect of antiretroviral therapy on HIV-1 genetic evolution during acute infection. *Int J STD AIDS* [Internet]. 2011 Mar 1 [cited 2016 Nov 24];22(3):146–50. Available from: <http://std.sagepub.com/lookup/doi/10.1258/ijsa.2010.010292>

Chen I, Khaki L, Lindsey JC, Fry C, Cousins MM, Siliciano RF, et al. Association of pol Diversity with Antiretroviral Atment Outcomes among HIV-Infected African Children. Barbour JD, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Nov 27 [cited 2016 Nov 23];8(11):e81213. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0081213>

Coovadia A, Abrams EJ, Strehlau R, Shiao S, Pinillos F, Martens L, et al. Efavirenz-Based Antiretroviral Therapy Among Nevirapine-Exposed HIV-Infected Children in South Africa: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* [Internet]. 2015 Nov 3 [cited 2016 Dec 11];314(17):1808–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26529159>

Feder AF, Rhee S-Y, Holmes SP, Shafer RW, Petrov DA, Pennings PS. More effective drugs lead to harder selective sweeps in the evolution of drug resistance in HIV-1. *Elife* [Internet]. 2016 Feb 15 [cited 2016 Nov 24];5. Available from: <http://elifesciences.org/lookup/doi/10.7554/eLife.10670>

Feder AF, Rhee S-Y, Holmes SP, Shafer RW, Petrov DA, Pennings PS, et al. More effective drugs lead to harder selective sweeps in the evolution of drug resistance in HIV-1. *Elife* [Internet]. 2016 Feb 15 [cited 2016 Nov 3];5:1161–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26882502>

GESIDA. DOCUMENTO DE CONSENSO SOBRE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL EN ADULTOS, NIÑOS Y ADOLESCENTES. 2016.

Granados J, Sánchez M, Ramos Amador JT, Fernández de Miguel S, González Tomée MI, Rojo Conejo P, et al. Impact of highly active antiretroviral therapy on the morbidity and mortality in Spanish human immunodeficiency virus-infected children. *Pediatr Infect Dis J* [Internet]. 2003 Oct [cited 2016 Dec 11];22(10):863–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14551485>

Halapi E, Leitner T, Jansson M, Scarlatti G, Orlandi P, Plebani A, et al. Correlation between HIV sequence evolution, specific immune response and clinical outcome in vertically infected infants. *AIDS* [Internet]. 1997 Nov 15 [cited 2016 Dec 11];11(14):1709–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9386805>

Kaplan NL, Hudson RR, Langley CH. The “hitchhiking effect” revisited. *Genetics* [Internet]. 1989 Dec [cited 2016 Dec 11];123(4):887–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2612899>

Kearney MF, Spindler J, Shao W, Yu S, Anderson EM, O’Shea A, et al. Lack of detectable HIV-1 molecular evolution during suppressive antiretroviral therapy. Siliciano RF, editor. *PLoS Pathog* [Internet]. 2014 Mar 20 [cited 2016 Dec 11];10(3):e1004010. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1004010>

Kolber MA, Buendia P, Degruittola V, Moore RD. HIV-1 diversity after a class switch failure. *AIDS Res Hum Retroviruses* [Internet]. 2010 Nov [cited 2016 Nov 23];26(11):1175–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20854203>

Langs-Barlow A, Paintsil E. Impact of human immunodeficiency virus type-1 sequence diversity on antiretroviral therapy outcomes. *Viruses* [Internet]. 2014 Oct 20 [cited 2016 Nov 23];6(10):3855–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25333465>

Langs-Barlow A, Paintsil E. Impact of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Sequence Diversity on Antiretroviral Therapy Outcomes. *Viruses* [Internet]. 2014 Oct 20 [cited 2016 Nov 23];6(10):3855–72. Available from: <http://www.mdpi.com/1999-4915/6/10/3855/>

Muesing MA, Smith DH, Cabradilla CD, Benton C V., Lasky LA, Capon DJ. Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature* [Internet]. 1985 Feb 7 [cited 2016 Dec 11];313(6002):450–8. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/313450a0>

Navarro M, Saavedra J, Neth O, Falcón L, Moreno D. Documento de consenso sobre tratamiento antirretroviral en niños y adolescentes con infección por el VIH Comité de Redacción.

Palumbo P, Violari A, Lindsey J. NVP-vs LPV/r-based ART among HIV+ infants in resource-limited settings: the IMPAACT P1060 trial [abstract no. 129LB]. In Boston (MA); 2011.

Pennings PS. Standing Genetic Variation and the Evolution of Drug Resistance in HIV. De Boer RJ, editor. PLoS Comput Biol [Internet]. 2012 Jun 7 [cited 2016 Dec 11];8(6):e1002527. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22685388>

PENPACT-1 (PENTA 9/PACTG 390) Study Team, Babiker A, Castro nee Green H, Compagnucci A, Fiscus S, Giaquinto C, et al. First-line antiretroviral therapy with a protease inhibitor versus non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor and switch at higher versus low viral load in HIV-infected children: an open-label, randomised phase 2/3 trial. Lancet Infect Dis [Internet]. 2011 Apr [cited 2016 Dec 11];11(4):273–83. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309910703133>

Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. Science [Internet]. 1996 Mar 15 [cited 2016 Dec 11];271(5255):1582–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8599114>

Pond SLK, Frost SDW, Muse S V. HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. Bioinformatics [Internet]. 2005 Mar 1 [cited 2016 Dec 9];21(5):676–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15509596>

Rosenbloom DIS, Hill AL, Rabi SA, Siliciano RF, Nowak MA. Antiretroviral dynamics determines HIV evolution and predicts therapy outcome. Nat Med [Internet]. 2012 Sep [cited 2016 Nov 3];18(9):1378–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22941277>

Ross HA, Rodrigo AG. Immune-mediated positive selection drives human immunodeficiency virus type 1 molecular variation and predicts disease duration. J Virol [Internet]. 2002 Nov [cited 2016 Dec 11];76(22):11715–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12388731>

UNAIDS. Global AIDS Update 2016 | UNAIDS [Internet]. 2016. Available from: <http://www.unaids.org/en/resources/documents/2016/Global-AIDS-update-2016>

UNAIDS. On the Fast-Track to an AIDS-free generation | UNAIDS [Internet]. 2016. Available from: <http://www.unaids.org/en/resources/documents/2016/GlobalPlan2016>

Viciano P, Ocampo A, Hevia H, Palazuelos M, Ledesma F. Tratamiento antirretroviral de inicio en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana en España: decisiones con relación a características inmunoviroológicas específicas (estudio PERFIL-es). Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet]. 2014 Feb [cited 2016 Dec 11];32(2):93–5. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0213005X13002449>

Wattanutchariya N, Sirisanthana V, Oberdorfer P. Effectiveness and safety of protease inhibitor-based regimens in HIV-infected Thai children failing first-line treatment. HIV Med [Internet]. 2013 Apr [cited 2016 Nov 24];14(4):226–32. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1468-1293.2012.01061.x>

Williamson S. Adaptation in the env Gene of HIV-1 and Evolutionary Theories of Disease Progression. Mol Biol Evol [Internet]. 2003 Apr 25 [cited 2016 Dec 11];20(8):1318–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12777505>

World Health Organization. WHO | Antiretroviral therapy for HIV infection in infants and children. WHO. World Health Organization; 2010. 206 p.

Zhang H, Hoffmann F, He J, He X, Kankasa C, West JT, et al. Characterization of HIV-1 subtype C envelope glycoproteins from perinatally infected children with different courses of disease. *Retrovirology* [Internet]. 2006 Oct 20 [cited 2016 Dec 11];3(1):73. Available from: <http://retrovirology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-4690-3-73>

Panel on Antiretroviral Therapy and Medical Management of HIV-Infected Children. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Pediatric HIV Infection. [cited 2016 Dec 11]; Available from: <http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/pediatricguidelines.pdf>

First-line antiretroviral therapy with a protease inhibitor versus non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor and switch at higher versus low viral load in HIV-infected children: an open-label, randomised phase 2/3 trial. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2011 Apr [cited 2016 Dec 11];11(4):273–83. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309910703133>

WHO | Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection. WHO. 2016;

WHO | Development of the Global Action Plan on HIV drug resistance, 2017-2021. WHO. 2016;

