

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

**ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA Y DE
RESISTENCIAS A ANTIRRETROVIRALES EN LA COHORTE
DE NIÑOS Y ADOLESCENTES INFECTADOS POR VIH-1 DE
LA COMUNIDAD DE MADRID**

TESIS DOCTORAL

Patricia Rojas Sánchez

Madrid, 2016

TESIS DOCTORAL

**ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA Y DE
RESISTENCIAS A ANTIRRETROVIRALES EN LA COHORTE
DE NIÑOS Y ADOLESCENTES INFECTADOS POR VIH-1 DE
LA COMUNIDAD DE MADRID**

Esta memoria ha sido presentada para optar al grado de Doctor en Biología Molecular por la Universidad Autónoma de Madrid por la Licenciada en Ciencias Biológicas:

Patricia Rojas Sánchez

Directora de Tesis:

Dra. África Holguín Fernández

Doctora en Biología. Investigadora del Sistema Nacional de Salud.
Responsable del Laboratorio de Epidemiología Molecular del VIH-1.
Servicio de Microbiología y Parasitología. IRYCIS-Hospital
Universitario Ramón y Cajal, Madrid.

V^oB^o de la Directora de Tesis:

“A mi abuela Mercedes, que no pudo ser eterna”

AGRADECIMIENTOS

Llegado este momento, son muchas las personas que han compartido conmigo estos años, prestándome su ayuda y apoyo y son muchas a las que me gustaría agradecer por ello..

Me gustaría agradecer al Dr. Rafael Cantón (Jefe del Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Universitario Ramón y Cajal) el permitirme formar parte de su equipo.

A mi directora de tesis, África Holguín, por darme la oportunidad de entrar en este mundo, confiar en mí desde el principio y prestarme su apoyo. Porque su capacidad de trabajo y sacrificio ha estado presente desde el principio hasta el fin. Porque sin ella esta Tesis no habría sido posible. A toda la gente que ha pasado por el grupo y que lo integra en la actualidad, porque todos sois parte de esta Tesis. En especial a Miguel y Gonzalo, por guiarme en el inicio de esta aventura, por su paciencia, consejos y ánimos. A Leticia, por ser el mejor ejemplo de compañerismo, por transmitirme su optimismo y su buen humor diario. A Patri A, porque hemos recorrido juntas este camino, atravesando momentos difíciles y otros muchos de los que hemos disfrutado juntas, porque juntas llegamos al fin y al fin... ¡lo hemos conseguido! Al equipo clínico y técnico de la Cohorte de niños y adolescentes infectados por VIH-1 de la Comunidad de Madrid. Sois un ejemplo de cómo deben hacerse las cosas y de cómo debe funcionar un equipo. Al Dr. José Tomás Ramos, por darme la maravillosa oportunidad de trabajar en la Cohorte pediátrica, por su interés y confianza.

Al Dr. Israel Pagán, por su disposición a enseñarme, por transmitirme su pasión por la ciencia y por sus sabios consejos.

A Carol, porque pasaste de compañera a amiga en un suspiro, por tu comprensión y amistad demostrada durante estos años. A Sara, por compartir tanto conmigo y por ser mi constante.

A mi hermano Álvaro, por estar a mi lado desde que nací, porque ha sido y será mi ejemplo a seguir y por ser el mejor hermano que se puede tener. A Belén, por ser una hermana para mí, por su generosidad y por todo su cariño. A Marina, porque haces que los días sean más felices. A mi madre y mi padre, por confiar siempre en mí, apoyarme de manera incondicional y enseñarme a luchar por aquello en lo que quería (y creía). Por ayudarme a levantarme y no permitir que me rinda.

A Guillermo, porque eres mi vida.

ABREVIATURAS



aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AF	Análisis filogenético
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARV	Antirretroviral(es)
CDC	Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de EE. UU.
céls	Células
CFS	<i>Correlation Feature Selection</i>
CoRISpe	Cohorte de la Red de Investigación en sida pediátrico
CRF	Forma(s) recombinante(s) circulante(s)
CV	Carga viral
<i>d</i>	Distancia genética
<i>d_N</i>	Tasa de sustitución no sinónima
<i>d_s</i>	Tasa de sustitución sinónima
<i>d_N/d_s</i>	Presión de selección
FDA	Food and Drug Administration
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
ES	Error estándar
E.E.U.U	Estados Unidos de América
HSH	Hombres que tienen sexo con hombres
IAS-USA	Sociedad Internacional sobre el Sida de EE. UU.
IC	Inhibidor del correceptor
IF	Inhibidor de la fusión
INI	Inhibidor integrasa
INT	Integrasa
IP	Inhibidores de la proteasa
ITIAN	Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleós(t)ido
ITINAN	Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleós(t)ido
kb	Kilobases
log	Logaritmo decimal
LTR	Repeticiones largas terminales
m	Minutos
MDR	Mutaciones de resistencia adquiridas
MDR-TC	MDR a las tres familias principales de fármacos (ITIAN, ITINAN e IP)
ml	Mililitros
MRT	Mutaciones de resistencia transmitidas
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica, EE. UU.
ND	Datos no disponibles
nt	Nucleótido
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
pb	Pares de bases

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PNS	Plan Nacional sobre el sida
PR	Proteasa
p-valor	Valor de probabilidad
RIQ	Rango intercuartílico
RIS	Red de investigación en sida
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
s	Segundos
sec	Secuencia(s)
SEIP	Sociedad Española de Infectología Pediátrica
Sida	Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida
TAM	Mutaciones de análogos de timidina
t	tiempo
TAR	Tratamiento antirretroviral
TARGA	Tratamiento antirretroviral de gran actividad
TI	Transcriptasa inversa
UDI	Usuarios de drogas inyectables
URF	Forma(s) recombinante(s) única(s)
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

FÁRMACOS ANTIRRETROVIRALES FRENTE AL VIH

Inhibidores de la proteasa (IP) (" /r" indica coadministración con ritonavir en baja dosis como potenciador farmacológico)

ATV/r	Atazanavir
DRV/r	Darunavir
FPV/r	Fosamprenavir
IDV/r	Indinavir
LPV/r	Lopinavir
NFV	Nelfinavir
SQV/r	Saquinavir
TPV/r	Tipranavir

Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleós(t)ido (ITIAN)

3TC	Lamivudina
ABC	Abacavir
AZT	Zidovudina
d4T	Estavudina
ddI	Didanosina
FTC	Emtricitabina
TDF	Tenofovir

**Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleós(t)ido
(ITINAN)**

EFV	Efavirenz
ETV	Etravirina
NVP	Nevirapina
RPV	Rilpivirina hidrocloreuro

**Potenciadores farmacocinéticos (de atazanavir, darunavir o elvitegravir;
se emplean en coadministración con los IP citados)**

RTV (/r)	Ritonavir
-----------------	-----------

Inhibidores de la integrasa (INI)

RAL	Raltegravir
EVG	Elvitegravir
DTG	Dolutegravir

Inhibidores CCR5 o inhibidores de la entrada

MVC	Maraviroc
------------	-----------

AMINOÁCIDOS

A	Alanina
C	Cisteína
D	Ácido aspártico
E	Ácido glutámico
F	Fenilalanina
G	Glicina
H	Histidina
I	Isoleucina
K	Lisina
L	Leucina
M	Metionina
N	Asparagina
P	Prolina
Q	Glutamina
R	Arginina
S	Serina
T	Treonina
V	Valina
W	Triptófano
Y	Tirosina

ÍNDICE



ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
Agradecimientos	vii
Abreviaturas	xi
Índice	xvii
Índice de Contenidos.....	xix
Índice de Tablas	xxi
Índice de Figuras.....	xxii
Resumen en Inglés	1
Introducción	5
Biología del VIH.....	7
Diversidad Genética y Evolución Molecular del VIH.....	8
Variantes del VIH.....	10
Diagnóstico de la Infección por VIH-1 en Pediatría	13
Curso Natural de la Infección por VIH-1.....	13
Particularidades de la Infección por VIH-1 en Pediatría.....	14
Parámetros para Guiar el Tratamiento Antirretroviral.....	15
Peculiaridades del Tratamiento Antirretroviral para Niños y Adolescentes.....	18
Tratamiento Antirretroviral de Inicio en Pediatría	19
Epidemiología de la Infección por VIH-1.....	20
Transmisión Vertical del VIH-1 en España.....	21
Cohorte Nacional de Pacientes Pediátricos con VIH-1.....	21
Cohorte de Niños y Adolescentes Infectados por VIH-1 de la Comunidad de Madrid.....	22
Objetivos	25
Capítulo 1	29
Antecedentes.....	31
Materiales y métodos.....	31
Resultados.....	33
Discusión.....	48
Capítulo 2.....	53
Antecedentes.....	55
Materiales y métodos.....	55

Resultados.....	56
Discusión.....	73
Capítulo 3.....	79
Antecedentes.....	81
Materiales y métodos.....	81
Resultados.....	82
Discusión.....	105
Capítulo 4.....	109
Antecedentes.....	111
Materiales y Métodos.....	111
Resultados.....	115
Discusión.....	131
Discusión integradora.....	135
Conclusiones.....	143
Bibliografía.....	149
Anexo I.....	169
Recursos en Internet.....	171
Algoritmos de Interpretación Genotípica de Resistencias.....	171
Anexo II.....	173
Material adicional.....	173
Anexo III.....	189
Publicaciones.....	191

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla I.1. Antirretrovirales autorizados en España con indicación en población pediátrica para el tratamiento del VIH.....	19
Tabla I.2. TAR de inicio en función de la edad del paciente.....	20
Tabla 1.1: Cebadores utilizados para la amplificación por PCR.....	32
Tabla 1.2. Características demográficas, clínicas y epidemiológicas de los 48 niños y adolescentes de la Cohorte de Madrid infectados VIH-1 con MDR-TC (2000-2011).	35
Tabla 1.3. Situación inmunológica y virológica de los 48 pacientes seleccionados con experiencia a MDR-TC en la última visita clínica hasta diciembre de 2013.....	37
Tabla 2.1. Características basales de los 199 niños y adolescentes con experiencia a LPV/r de la Cohorte de Madrid durante el periodo 2000-2014.....	58
Tabla 2.2. Estado virológico e inmunológico de la población de estudio con datos disponibles antes y después de la experiencia a LPV/r.....	60
Tabla 2.3. Cargas virales indetectables conseguidas durante el uso de LPV/r en la población pediátrica de estudio.....	62
Tabla 2.4. Presencia de MDR y susceptibilidad a fármacos en virus de niños expuestos a LPV/r con datos de resistencia.....	64
Tabla 2.5. MDR en 35 pacientes pediátricos infectados por VIH-1 con datos disponibles antes y después de tener experiencia a LPV/r.....	65
Tabla 2.6. Factores de riesgo para el desarrollo de MDR a IP.....	68
Tabla 3.1. Características basales de la población de estudio con MDR en comparación con la Cohorte completa hasta marzo 2016.....	83
Tabla 3.3. Características de los 34 niños y adolescentes infectados por VIH-1 infectados por variantes no B del VIH-1.....	99
Tabla 4.1. Principales características clínicas y epidemiológicas de los sujetos de estudio.....	115
Tabla 4.2. Características clínicas de los 24 pacientes con seguimiento longitudinal.....	116
Tabla 4.3. Evolución de las MDR en los 24 pacientes pediátricos con seguimiento longitudinal durante un tiempo medio de 7,7 años entre la primera y última secuencia disponible.....	123
Tabla 4.4. Parámetros evolutivos de la secuencia parcial del gen <i>pol</i> de los 24 pacientes infectados por VIH-1 subtipo B y seguimiento longitudinal.....	126
Tabla 4.5. Variables consenso calificadas como las que mejor predicen los parámetros evolutivos y mutaciones de resistencia.....	129
Tabla 4.6. Porcentaje de las instancias calificadas correctamente para cada modelo utilizando <i>wrapper</i> , Gain ratio y CFS para los parámetros de estudio.....	130

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura I.1. Estructura del virión (A) y genoma del VIH (B).....	7
Figura I.2. Ciclo replicativo del VIH.	9
Figura I.3. Esquema de la clasificación de las variantes del VIH.....	11
Figura I.4. Distribución global de los subtipos y algunas formas recombinantes del grupo M del VIH-1 en el periodo 2004-2007.....	12
Figura I.5. Curso natural de la infección por VIH.....	14
Figura 1.1. Prevalencia de MDR y porcentaje de pacientes con susceptibilidad predicha a cada ARV en los 48 pacientes cuando se detectó MDR-TC por primera vez.	38
Figura 1.2. Susceptibilidad a fármacos ARV del virus en 48 pacientes infectados por VIH con secuencia <i>pol</i> disponible cuando se detectó MDR-TC por primera vez.....	40
Figura 1.3. Susceptibilidad a los diferentes fármacos ARV en 35 niños infectados por VIH-1 cuando se detectó MDR-TC y en la última secuencia <i>pol</i> o perfil de resistencia disponible hasta diciembre de 2011.	44
Figura 2.1. MDR en 64 pacientes pediátricos con experiencia a LPV/r y predicción de susceptibilidad en esos pacientes con MDR.	69
Figura 3.1. Nuevos diagnósticos por VIH-1 y datos de resistencia genotípica disponibles en los 245 niños y adolescentes con VIH-1 de la Cohorte de Madrid. ..	88
Figura 3.2. Tendencias temporales de la prevalencia de MDR durante 1993-2016* en los 190 niños infectados por VIH-1 y tratados.....	91
Figura 3.3. Susceptibilidad predicha a cada ARV en el tiempo en 239 pacientes pretratados e infectados por VIH-1 con MDR.....	93
Figura 3.4. Prevalencia de las variantes del VIH-1 en 235 pacientes pediátricos con variante viral conocida durante 1993-2016.	102
Figura 4.1. Correlación entre valores de linfocitos, CV y parámetros genéticos del VIH-1 con el tiempo de exposición al virus.	118
Figura 4.2. Número de pacientes con MDR en la primera y última secuencia disponible para los 24 pacientes con seguimiento longitudinal.	120
Figura 4.3. Susceptibilidad predicha para los pacientes con MDR y seguimiento longitudinal.	122
Figura D.1. Datos de resistencia por países en población pediátrica infectada por VIH-1.....	138

RESUMEN EN INGLÉS

A total of 561 patients were registered from the beginning of the epidemic until December 2015, in the Madrid Cohort of HIV-infected children and adolescents ascribed to the National Pediatric Cohort with HIV (CoRISpe). Two hundred and eighty-nine of them were under current clinical follow-up in pediatric (43.9%) or adult units (56.1%). The Madrid Cohort includes almost all HIV-1-infected children and adolescents under clinical follow-up in 9 public hospitals in Madrid, and represents 57.3% of the infected pediatric population in Spain to date. Despite having a good clinical and immunological situation at sampling time, nearly all had a history of HIV-related symptoms, were heavily pretreated and had a long history of treatment combinations. We observed that the fixation of drug resistance mutation (DRM) is a major obstacle for an effective treatment.

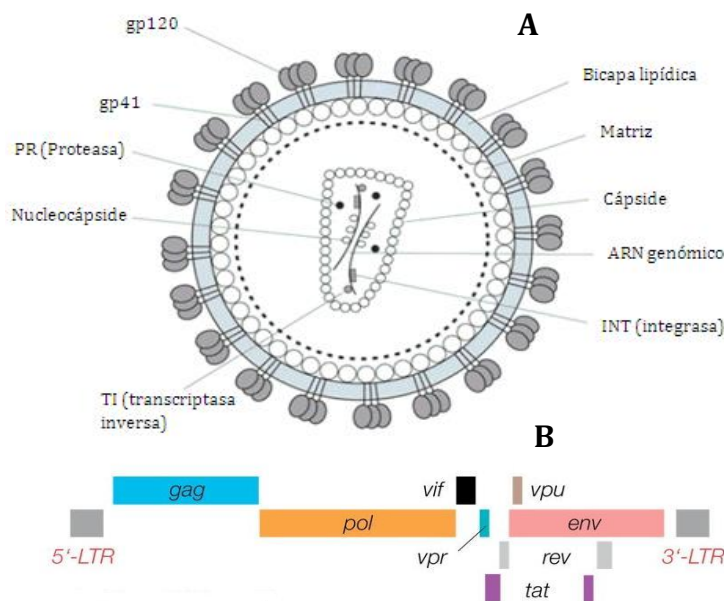
In 2011, twenty-four patients (9%) were infected by viruses harboring resistance to the main three drug families (TC-DRM) (protease inhibitor (PI), nucleoside retrotranscriptase inhibitors (NRTI) and non-NRTI (NNRTI)). This rose to 24.4% among those 197 patients with resistance data. Despite the presence of HIV-1 TC-DRM in our pediatric Cohort, some drugs maintained their susceptibility, mainly the new PI (tipranavir and darunavir (DRV)) and NNRTI (etravirine and rilpivirine). Additionally, we summarize data from the 199 patients exposed to lopinavir-ritonavir (LPV/r) as first or rescue therapy during 2000 to 2014 with data recorded before and during LPV/r treatment. We also present data from DRM and predicted susceptibility to PI among virus carrying DRM. Despite the selection of DRM, good clinical status at the last clinic visit during LPV/r treatment was observed in these patients. DRV/ritonavir presented the highest susceptibility and NFV the lowest. Considering the period 1993 to March 2016, we recorded the temporal trends of drug resistance and observed that more than half of the non-B variants infecting the pediatric Madrid Cohort were intersubtype recombinants. This reflects the increasing heterogeneity of the HIV epidemic in our country. Lastly, and applying multivariate models, we explored how 28 clinical parameters used to monitor disease progression were associated with within-host HIV-1 subtype B genetic diversity. The best-predictor variables for HIV-1B evolutionary parameters were: 1) for d : age of HIV-1 diagnosis; 2) for d_N : age at first antiretroviral therapy; and 3) for ds : year of HIV-1 diagnosis. The Thesis highlights the importance of an active and periodic surveillance of drug resistance prevalence among HIV-1 infected children who require lifelong treatment and of the HIV-1 diversity to study their impact on HIV infection outcome. The presented data will be useful not only for pediatricians, but also for clinicians attending adults, since a large number of perinatally infected children in Spain are reaching adulthood and being transferred to adult hospital units.

INTRODUCCIÓN

BIOLOGÍA DEL VIH

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es el agente infeccioso causante del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (sida). Es un virus ARN de la familia de los retrovirus humanos (*Retroviridae*) y del género *Lentivirus* (Barré-Sinoussi et al., 1983). El VIH tiene forma esférica con un diámetro de 100-120 nanómetros. Su estructura y organización genómica se muestran en la **Figura I.1**. El virión está constituido por una envoltura externa o bicapa lipídica tomada de la membrana de la célula humana infectada durante la salida de nuevas partículas virales por gemación. En la envoltura se insertan la glicoproteína de superficie Gp120 unida a la glicoproteína transmembrana Gp41 en forma de trímeros. Bajo la envoltura se sitúa la matriz proteica y en el interior se encuentra la cápside icosaédrica. Dentro de ésta, se localizan las enzimas virales y el material genético del virus formado por dos cadenas sencillas de ARN de polaridad positiva de aproximadamente 9,8kb (Muesing et al., 1985) asociadas a las proteínas de la nucleocápside.

Figura I.1. Estructura del virión (A) y genoma del VIH (B).



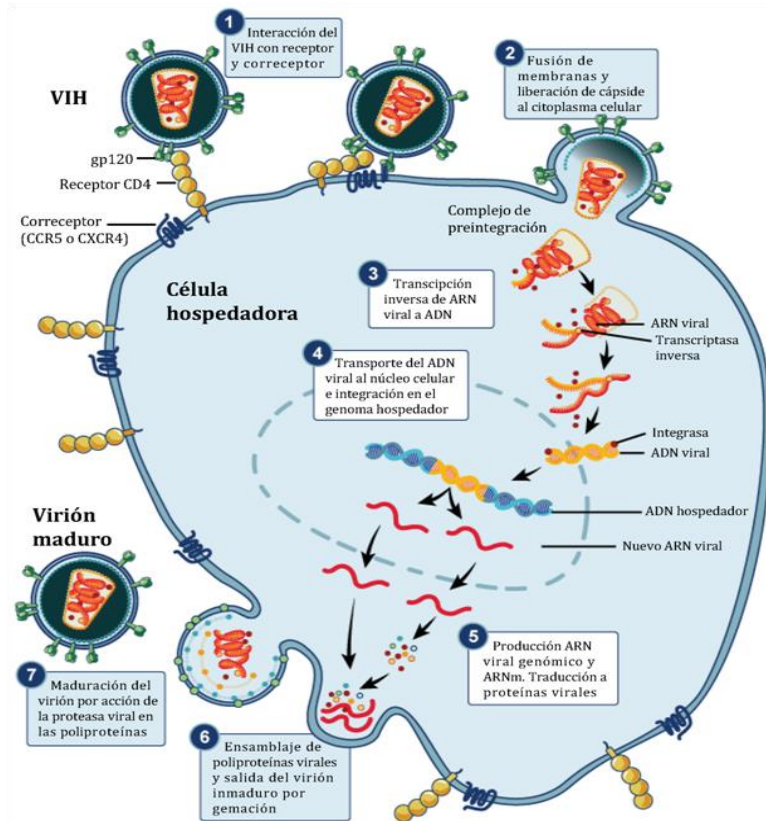
El genoma del VIH contiene tres regiones codificantes principales: *gag*, *pol* y *env*, comunes a todos los retrovirus. Adicionalmente, el VIH tiene genes encargados de codificar los componentes de la partícula vírica y de regular la expresión de los mismos. El gen *gag* codifica principalmente las proteínas estructurales que conforman la matriz, la cápside y la nucleocápside. El gen *pol*, codifica las enzimas virales responsables de la maduración (proteasa, PR), de la síntesis de ADN a partir del ARN (transcriptasa inversa, TI) y de la integración del virus en el genoma celular (integrasa, INT). El gen *env* codifica el precursor

de las glicoproteínas de la envoltura. Además, en el genoma del VIH hay otros seis genes adicionales (*tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* y *vpu*) con capacidad reguladora esencial para que se lleve a cabo el ciclo viral a través de las proteínas que codifican. En los extremos 5' y 3' del genoma se encuentran las secuencias largas repetidas (LTR) no codificantes, donde se ubican regiones reguladoras esenciales para la replicación del virus, permitiendo su circularización e integración en el genoma celular (Gallo et al., 1988; Emerman & Malim, 1998).

El ciclo infectivo y replicativo del VIH se resume en las siguientes etapas (**Figura I.2**) 1) interacción del virus con la célula diana (linfocitos T CD4 principalmente) por la unión de la glicoproteína viral Gp120 con el receptor celular CD4 y de otras proteínas de membrana celulares que actúan como correceptores de virus, entre las que destacan CCR5 y CXCR4; 2) fusión de las membranas viral y celular y liberación al citoplasma de la cápside viral; 3) transcripción inversa del ARN genómico viral y formación del ADN complementario de doble cadena mediado por la TI; 4) transporte del ADN al núcleo celular e integración en el genoma de la célula hospedadora por la acción de la integrasa viral; 5) transcripción de los genes virales y procesamiento de los transcritos para originar ARN genómico y ARN mensajero (ARNm) virales. Traducción de los ARNm a poliproteínas precursoras virales en el citoplasma; 6) ensamblaje de las proteínas virales y salida del virión por gemación arrastrando parte de la membrana de la célula huésped; 7) maduración por la acción de la proteasa viral que procesa las poliproteínas precursoras virales para formar el virión infectivo (Levy, 1993).

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 mutación y de recombinación, junto con su alta tasa de replicación. Se calcula que se producen y destruyen entre 10^{10} y 10^{12} nuevos viriones cada 2,5 días, que es el tiempo transcurrido entre generaciones virales (Perelson et al., 1996). Mientras tanto, por cada ciclo replicativo y cadena de ARN viral se producen, aproximadamente, de 1-10 cambios de media y de 2 a 3 eventos de recombinación (Jetzt et al., 2000; Zhuang et al., 2002). 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.

Figura I.2. Ciclo replicativo del VIH.

Adaptado de *National Institutes of Allergy and Infectious Diseases (NAID)*, E.E.U.U. *HIV Replication Cycle* <http://phil.cdc.gov/phil/details.asp ID#: 18162>.

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). 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. Estos procesos tienen como resultado la dominancia del genoma o genomas con mayor eficacia biológica o *fitness* (variante mayoritaria) rodeado de un amplio espectro de mutantes (variantes minoritarias) con un extenso rango de fenotipos. De hecho, todas estas variantes circulantes pueden integrarse en forma de provirus en las células y así estar representadas en el reservorio de linfocitos latentemente infectados. Si el medio que les rodea cambiase, por ejemplo, por la respuesta inmune o la exposición a fármacos antirretrovirales (ARV), se seleccionaría por selección positiva las variantes que llevara aquellos cambios que supusieran una ventaja competitiva en esa nueva situación (Briones & Domingo, 2008).

Para estudiar cómo evolucionan las poblaciones virales, es necesario medir la diversidad genética y la divergencia entre aislados o poblaciones. La medida más intuitiva es el porcentaje de diferencias nucleotídicas entre secuencias. Para determinar el grado de variabilidad de una población viral (población inter-huésped) o en cada paciente (población intra-huésped) es frecuente utilizarla distancia genética (d), que es el número medio de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias por sitio nucleotídico estudiado. La elevada diversidad genética es la responsable de generar virus con una alta capacidad de adaptación a nuevos entornos, dotándolos de ventajas evolutivas relacionadas con factores clínicos y epidemiológicos que se encuentran estrechamente relacionados con la progresión de la infección, con la transmisibilidad y con la respuesta al tratamiento antirretroviral (TAR) (Santoro & Perno, 2013).

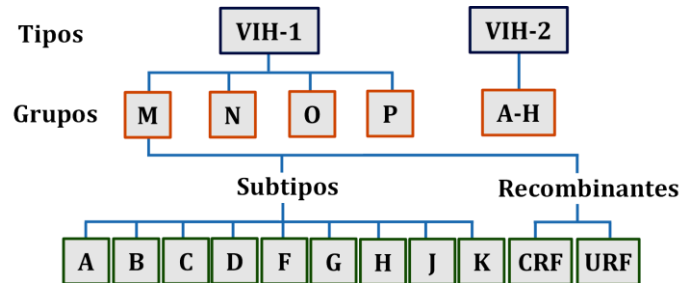
Se ha observado la existencia de factores clínicos tremendamente relacionados con la diversidad genética en la población viral intra-huésped del VIH. En más detalle, en pacientes *naive*, la mayor diversidad genética se ha asociado con niveles más bajos de recuento de linfocitos T CD4 (Markham et al., 1998), con carga viral (CV) más elevadas (Mani et al., 2002; Shriner et al., 2006), con un mayor tiempo de exposición al virus (Ryland et al., 2010; Maldarelli et al., 2013), y con la edad de los pacientes (Carvajal-Rodríguez et al., 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). Estudios previos han demostrado que los cambios en factores clínicos que se encuentran asociados con la progresión de la infección, están relacionados con la diversidad genética del VIH. Sin embargo, se puede ver simplificada la relación entre los factores clínicos y la diversidad genética del virus, ya que, durante el curso de la infección, las poblaciones virales se enfrentan a cambios constantes y simultáneos de CV, recuento de linfocitos T CD4 y experiencia a TAR.

VARIANTES DEL VIH

Los estudios de epidemiología molecular del VIH se centran en identificar las variantes del virus (**Figura I.3**). Basándose en su homología genética, el VIH se clasifica en dos tipos: 1 y 2 (Robertson et al., 2000; Clavel et al., 1986). El VIH-1 es el más extendido y responsable de la mayor parte de los casos de infección por VIH en el mundo. El VIH-1 ha sido clasificado en cuatro grandes grupos: grupo M (*main* o principal), grupo O (*outlier* o externo), grupo N (no-M, no-O) y el grupo P. Los grupos O, N y P presentan baja prevalencia y se encuentran restringidos a África subsahariana, occidental y central o a casos aislados originarios de esa

región. El grupo M se ha expandido desde África, el origen de la pandemia, al resto de continentes y son responsables del 97% de los cerca de 37 millones de infecciones a nivel mundial (UNAIDS, 2016a)

Figura I.3. Esquema de la clasificación de las variantes del VIH.

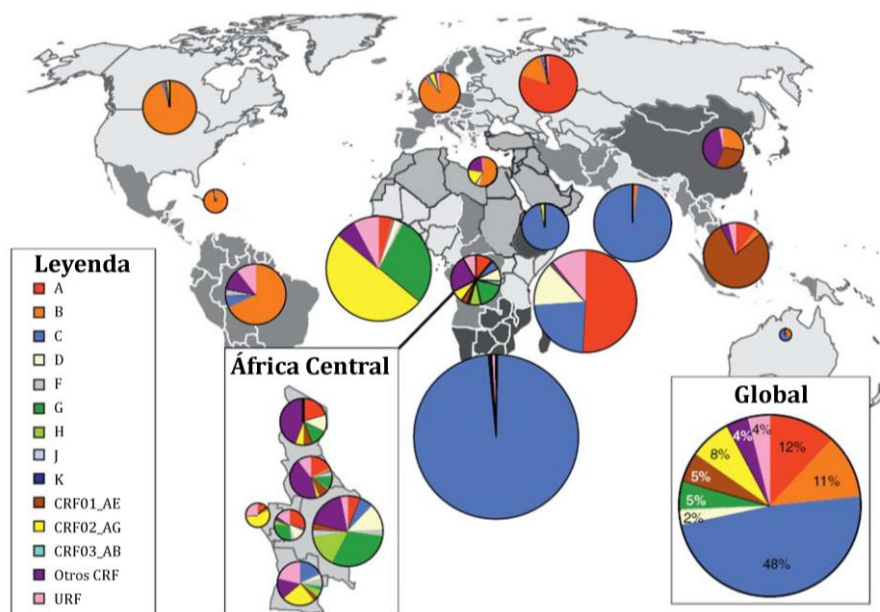


Los virus del grupo M se han subdividido en nueve subtipos denominados por letras (A, B, C, D, F, G, H, J, K) (Robertson et al., 2000), así como en recombinantes entre ellos. Estos últimos se originan por fenómenos de recombinación tras una coinfección viral (infecciones sucesivas) o una superinfección (infecciones simultáneas) por 2 o más subtipos diferentes del virus en un mismo hospedador, lo que ocurre en lugares donde hay una alta tasa de infección por VIH-1 y circulan a la vez múltiples cepas del virus. Estas formas recombinantes pueden ser circulantes (CRF, *circulating recombinant forms*) o únicas (URF, *unique recombinant forms*). Los CRF son recombinantes que aparecen, al menos, en tres pacientes no relacionados epidemiológicamente y presentan igual patrón de recombinación a lo largo de su genoma. Hasta el momento se han descrito 79 CRF (Cheong et al., 2015), cada uno designado por un número identificativo y por los subtipos genéticos presentes en su genoma. El resto de recombinantes, conocidos como URF, se encuentran aisladamente y sus puntos de recombinación a lo largo del genoma son diferentes de los encontrados en los CRF. Si los URF se transmiten sucesivamente y se extienden entre la población, pueden dar lugar a nuevos CRF. De hecho, ante el incremento exponencial en el número de CRF descritos, algunos autores han propuesto agrupar aquellos CRF similares en familias de recombinantes (Zhang et al., 2010).

La distribución mundial de las distintas variantes dentro del grupo M del VIH-1 es heterogénea (Hemelaar et al., 2011) y, poco a poco, los límites geográficos entre subtipos van desapareciendo (**Figura I.4**). En África central, por ser el epicentro de la pandemia, coexisten gran número de variantes. En el resto del mundo la distribución del VIH-1 es probablemente debida a diferentes fenómenos de efecto fundador, es decir, la expansión de una variante concreta por ser la primera en llegar. Así, el subtipo C predomina en África del sur y oriental y también en la India, el subtipo A en los países de la antigua Unión Soviética y el recombinante CRF01_AE en el sudeste asiático. En las áreas más industrializadas, como Europa occidental y Norteamérica, el subtipo B es el predominante. Este subtipo es la

variante más estudiada y utilizada como modelo para el diseño y desarrollo de fármacos, vacunas, ensayos diagnósticos, y gran parte de la investigación básica, aunque supone sólo el 11% de las infecciones por VIH-1 a nivel mundial. Al resto de subtipos del grupo M del VIH-1 y recombinantes les llamamos “variantes no-B” del VIH-1 y son las mayoritarias a nivel global y responsables de 30 de los 37 millones de infecciones en el mundo.

Figura I.4. Distribución global de los subtipos y algunas formas recombinantes del grupo M del VIH-1 en el periodo 2004-2007.



Adaptado de (Hemelaar et al., 2011).

Una de las consecuencias de los movimientos poblacionales por intercambios comerciales, migración y turismo ha sido la introducción de variantes no-B del VIH-1 en pacientes inmigrantes y autóctonos de países desarrollados donde predominaba el subtipo B. La proporción de subtipos no-B y formas recombinantes del VIH-1 entre los nuevos diagnósticos está incrementando en Europa (Beloukas A et al., 2016) alcanzando incluso el 50% en Francia, Bélgica y Suecia (Frange et al., 2008; Vercauteren et al., 2009; Descamps et al., 2010; von Wyl et al., 2011; Neogi et al., 2014). En España, la proporción de variantes no-B también está en alza, y hoy suponen el 10-15% de las infecciones por VIH-1 (Holguín et al., 2008c; González Alba et al., 2011; Yebra et al., 2012). Aunque la variante no-B más frecuente en España es el CRF02_AG, se han detectado casos de infección por todos los subtipos no-B del VIH-1 y múltiples formas recombinantes incluyendo recombinantes complejos (Holguín et al., 2008c). De hecho, en España, una de cada 10 nuevas infecciones en adultos se debe a variantes no-B del VIH-1 y siete de cada 10 infecciones causadas por variantes no-B están causadas por cepas recombinantes (Yebra et al., 2012).

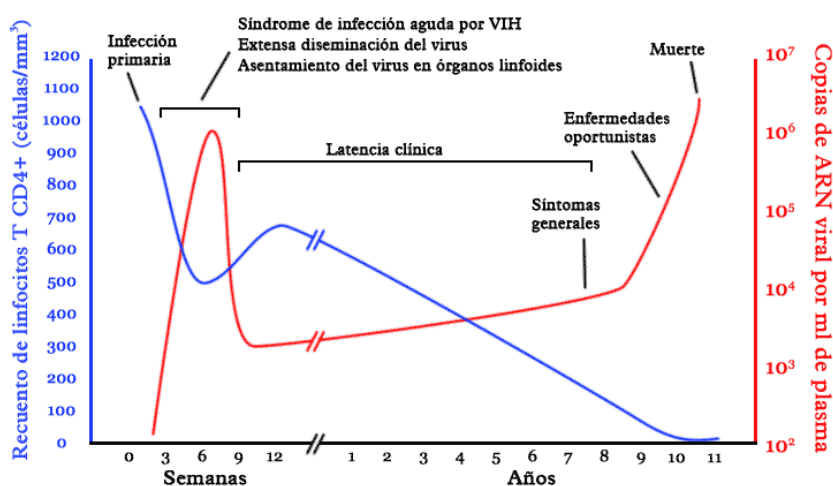
En pacientes pediátricos, la prevalencia de infección por variantes no-B del VIH-1 varía en función del país y del año de estudio, siendo más prevalentes en África subsahariana. En Francia se detectó un 36,4% de variantes no-B entre todos los nuevos diagnósticos de VIH-1 en recién nacidos entre 1994 y 1996 (Masquelier et al., 2001) y en Nueva York alcanzó el 16,7% entre 2001 y 2002 (Karchava et al., 2006). Los primeros estudios de identificación de variantes no-B en población pediátrica infectada en Madrid se realizaron en niños de procedencia no española infectados entre 1988 y 2006 (Piñeiro et al., 2009) y, posteriormente, por nuestro grupo hasta la actualidad (de Mulder et al.; 2011, de Mulder et al., 2012a; Rojas Sánchez et al., 2016a).

DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR VIH-1 EN PEDIATRÍA

La infección por VIH-1 es asintomática o cursa con sintomatología inespecífica durante los 2-3 primeros meses de vida. El diagnóstico del VIH-1 en niños mayores de 18 meses se realiza mediante serología como en el adulto, pero en niños menores de 18 meses e infectados por transmisión vertical, se deben usar pruebas virológicas que detecten directamente el virus, su genoma o sus proteínas. Ello se debe a que los anticuerpos específicos frente al VIH-1 transferidos por vía transplacentaria por su madre pueden interferir en la interpretación de las pruebas serológicas. Entre los ensayos virológicos se encuentra la amplificación del ADN proviral mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/o la amplificación por PCR del ARN viral libre en plasma (WHO, 2010b).

CURSO NATURAL DE LA INFECCIÓN POR VIH-1

La infección por VIH-1 se clasifica en diversas etapas inmunológicas (**Figura 1.5**), identificadas por un conjunto de síntomas e indicadores clínicos. La fase aguda se inicia en el momento del contagio. En un plazo de días, el VIH-1 infecta a las células expuestas y a los ganglios linfáticos, multiplicándose dentro del organismo hasta alcanzar niveles muy elevados. Después ocurre la fase crónica o de latencia clínica, donde el portador es asintomático porque su sistema inmune aún puede controlar la infección. En ausencia de TAR, la mayoría de los pacientes desarrollan sida en 5-10 años, aumentando la CV y disminuyendo la capacidad de recuperación del sistema inmune. En la etapa final de la infección o etapa sida el portador posee un sistema inmune muy debilitado y una reducida capacidad citotóxica hacia el virus, aumentando el riesgo de enfermedades e infecciones oportunistas. La mayoría de los pacientes que han desarrollado sida no sobreviven más de 3 años sin recibir TAR. La progresión de la enfermedad puede variar debido a factores asociados al virus y a factores genéticos e inmunológicos del hospedador, existiendo progresores rápidos y lentos (Rodríguez-Da Silva et al., 2015; Crowell & Hatano 2015).

Figura I.5. Curso natural de la infección por VIH.

PARTICULARIDADES DE LA INFECCIÓN POR VIH-1 EN PEDIATRÍA

El curso natural de la infección por VIH-1 en edad pediátrica tiene particularidades propias (European collaborative Study, 1991; Davies et al.; 2016):

- 1- La mayoría de niños se infectan por transmisión vertical, en una etapa de pleno desarrollo y diferenciación celular. El VIH-1 provoca un grave trastorno de la inmunidad, que se manifiesta clínicamente por infecciones graves y por una mayor predisposición para el desarrollo de algunas neoplasias.
- 2- En ausencia de TAR, la progresión de la enfermedad es más rápida en niños infectados por transmisión vertical que en adultos, adolescentes y que en niños infectados por otras vías como la transmisión sexual o parenteral (Blanche et al., 1990; Frederick et al., 1994). Entre el 15-25% de los niños con infección por VIH-1 adquirida por transmisión vertical presentan una forma de enfermedad con peor pronóstico, caracterizada por enfermedades definatorias de sida antes de cumplir los 12 meses de vida, con una supervivencia inferior a 2 años (Barnhart et al., 1996).
- 3- Los niños que adquieren la infección en las últimas semanas del embarazo o en el momento del parto son asintomáticos al nacer. Los recién nacidos con síntomas clínicos que sugieren infección por VIH-1 tienen un elevado riesgo (40%) de progresar a sida antes del año (Mayaux et al., 1996).
- 4- El periodo de incubación de la infección VIH-1 por transmisión vertical dura entre 4-5 meses de media. La sintomatología clínica es inespecífica y está asociada a una escasa ganancia de peso o detención del crecimiento (McKinney et al., 1994).
- 5- La edad media de progresión a sida en pacientes con infección VIH-1 por transmisión vertical en ausencia de TAR es de 4 a 6 años, frente a los 9,8-15 años de los adultos. El riesgo de progresar a sida es especialmente alto durante el primer año de vida (10-30%)

- y disminuye a partir de entonces al 2-3 % anual (Frederick et al., 1994; Newell et al., 1994; Shacker et al., 1996).
- 6- En ausencia de TAR, la mortalidad asociada al VIH-1 es elevada durante el primer año (6-16%), decreciendo un 3,5% anual hasta los 7 años, para incrementarse de nuevo a partir de esta edad. La mitad de los niños que nacen infectados morirá antes de los dos años de edad sin TAR (Obimbo et al., 2004). La supervivencia media de los pacientes pediátricos que no recibieron TAR se sitúa entre los 7 y los 8 años (Tovo et al., 1992; Blanche et al., 1997).
 - 7- El riesgo de padecer fracaso virológico a los cinco años de comenzar el TAR es el doble en niños que en adultos (Judd et al., 2011).
 - 8- La CV viral en niños menores de un año se mantiene elevada [entre 10^6 y 10^7 copias de ARN-VIH-1/ml (cop./ml)] hasta 6 meses tras la infección, a diferencia de lo que pasa en adultos durante la fase crónica (Prendergast et al., 2007).

PARÁMETROS PARA GUIAR EL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL

Los principales parámetros a evaluar durante el seguimiento del TAR son el número y porcentaje de linfocitos T CD4, la CV plasmática, la detección de mutaciones de resistencias, la concentración plasmática de fármacos ARV, la determinación del tropismo viral, la evaluación del nivel de adherencia al TAR y la caracterización de la variante genética infectante.

Linfocitos T CD4

La mayor caída de linfocitos T CD4 sucede en el primer año de vida (250 linfocitos/mm³/año), disminuyendo entre 1 y 6 años (73 linfocitos/mm³/año). A partir de los 6 años, el descenso de CD4 es similar al de adultos (60 células/mm³/año). El valor predictivo de los linfocitos T CD4 es menor en recién nacidos y niños pequeños, por el solapamiento entre progresores rápidos y lentos. Debido a las variaciones en el número total de linfocitos T CD4 en la infancia, hasta la edad de 6 años se debe utilizar el porcentaje de linfocitos T CD4 para monitorizar la progresión de la infección, aunque con recuentos de linfocitos T CD4 <3.000 se debe ser cauto en la interpretación. No hay un punto de corte del porcentaje de linfocitos T CD4 que determine la evolución a sida o muerte, especialmente en niños menores de 1 año, siendo el riesgo de progresión a sida superior que en los niños de mayor edad, independientemente del estadio inmunológico (CEVIHP/SEIP/AEP/SPNS, 2015).

Monitorización de la carga viral

La determinación de la CV plasmática es esencial para evaluar la respuesta al TAR, cuyo objetivo es alcanzar la supresión de la replicación viral y valores indetectables de viremia en las primeras 24 semanas de inicio del tratamiento (<50 cop./ml) o menos, según las técnicas. Se debe realizar una primera determinación de carga viral a las 2-4 semanas del inicio del tratamiento, posteriormente cada 3-4 meses o con más frecuencia si se sospecha deterioro clínico, inmunológico o virológico (CEVIHP/SEIP/AEP/SPNS, 2015).

Estudio de resistencias a fármacos antirretrovirales

Las variantes del VIH-1 resistentes son aquellas que han perdido parcial o totalmente la susceptibilidad a uno o varios TAR. Se seleccionan si la supresión de la replicación viral por TAR es incompleta por mala adherencia, por una pauta inadecuada o por niveles insuficientes de fármacos en los regímenes (CEVIHP/SEIP/AEP/SPNS, 2015). La detección de virus resistentes a los fármacos puede realizarse por técnicas genotípicas o fenotípicas (Hirsch et al., 2008). Los ensayos genotípicos detectan cambios específicos en la región genética viral que codifica las proteínas diana de los fármacos ARV (PR, TI, INT y proteínas de la envoltura) y se usan en la rutina clínica al ser más rápidas y accesibles. También permiten caracterizar la variante del VIH. Las fenotípicas determinan la respuesta de la población viral mayoritaria a concentraciones crecientes de los distintos fármacos ARV. Ambas técnicas presentan dificultad para detectar variantes resistentes con frecuencias menores del 15-20% en la población viral o con viremia menor de 1.000 cop./ml. Actualmente existen métodos que detectan mutaciones en niveles de hasta 0,1-1%. Se recomienda realizar un estudio genotípico de resistencias del VIH-1 en todos los pacientes pediátricos en el momento del diagnóstico de la infección por el VIH-1, antes de iniciar TAR si éste se difiere y cuando se requiere cambiar el TAR por fracaso virológico confirmado. La no detección de mutaciones no descarta la presencia de virus resistentes que pueden ser seleccionados posteriormente (CEVIHP/SEIP/AEP/SPNS, 2015).

No todas las mutaciones de resistencia tienen la misma importancia. Existen mutaciones de resistencia “primarias o principales”, que determinan resistencia farmacológica y suelen disminuir la capacidad replicativa (*fitness*) del virus. También pueden existir mutaciones de resistencias secundarias (minoritarias o *minor*) en ciertas familias de fármacos, que contribuyen a la resistencia en menor medida, estando alguna de ellas presentes de manera natural en ciertas variantes del VIH-1 (CEVIHP/SEIP/AEP/SPNS, 2015). La interpretación apropiada de los estudios genotípicos se desarrolla mediante algoritmos computarizados que requieren una actualización continua (**Anexo I**). También se han identificado las mutaciones más relevantes asociadas a resistencia para pacientes no expuestos (*naive*)

(Bennet et al., 2009), conocidas como mutaciones de resistencia transmitidas (MRT). Para aquellos pacientes en tratamiento, se consideran mutaciones de resistencias adquiridas (MDR) (Wensing et al., 2015) (**Anexo II**). La transmisión de variantes del VIH-1 resistentes a ARV se ha asociado a fracaso al TAR (Kuritzkes et al., 2008). Las mutaciones de resistencia pueden quedar archivadas por meses o años en el ADN proviral en el genoma de la célula hospedadora y emerger después al ser seleccionadas por el TAR (Persaud et al., 2007). Actualmente la monitorización de resistencias a nivel mundial es un tema prioritario para la Organización Mundial de la Salud (OMS) (WHO, 2016a, b).

Identificación de la variante viral infectante

La correcta identificación de subtipos y formas recombinantes del VIH-1 es de gran relevancia para entender problemas potenciales en el diagnóstico genético y serológico (Aghokeng et al., 2009), en la eficacia de terapia ARV (Holguín et al., 2006a), en la cuantificación de la viremia (Holguín et al., 2008a), en la interpretación genotípica de las mutaciones de resistencia (Yebra et al., 2010), para comprender la prognosis de la enfermedad (Paint Pai et al., 2012) o fallos en la eficacia de vacunas (Korber & Gnanakaran, 2009). Los subtipos no-B y recombinantes del VIH-1 poseen de manera natural polimorfismos en posiciones concretas de la PR, TI e INT asociados a resistencia a los ARV. Estos polimorfismos pueden modular la capacidad replicativa del virus (Baeten et al., 2007), conducir a una sensibilidad reducida a esos compuestos (Holguín et al., 2004), seleccionar nuevas vías de adquisición de resistencia (Grossman et al., 2004), o una adquisición más rápida de la misma (Brener et al., 2003), modificar la interpretación de los algoritmos de interpretación de resistencia genotípica (Yebra et al., 2010), reducir la barrera genética para seleccionar resistencia a ciertos fármacos ARV (Van de Vijver et al., 2005), modificar las afinidades de unión a los fármacos (Kinomoto et al., 2005) o conferir una gran susceptibilidad a inhibidores de la proteasa (IP) en subtipos no-B del VIH-1 (Santos et al., 2012). Por ello, la presencia de subtipos no-B del VIH-1 no sólo tiene implicaciones en el ámbito epidemiológico, sino también posiblemente importantes repercusiones clínicas y biológicas. La caracterización de la variante viral infectante debe realizarse mediante análisis filogenético (AF) de secuencias genéticas virales, ya que las técnicas de subtipaje *online* pueden presentar importantes limitaciones a la hora de identificar algunas variantes distintas del subtipo B, principalmente ciertos recombinantes (Yebra et al., 2011).

PECULIARIDADES DEL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL PARA NIÑOS Y ADOLESCENTES

Los objetivos del TAR son conseguir una supresión completa y duradera de la replicación viral, preservar o restaurar la función del sistema inmunológico, minimizar la toxicidad a corto y largo plazo, minimizar la selección de resistencias, reducir la morbilidad y mortalidad asociada a la infección y mejorar la calidad de vida. En niños el TAR conlleva a aumento de peso, disminución de infecciones bacterianas y oportunistas, disminución de ingresos hospitalarios, menor progresión a sida y mortalidad (Dollfus et al., 2010; Goetghebuer et al., 2009). Por ello, muchos niños que nacen infectados, llegan a la adolescencia y a la edad adulta con una adecuada situación inmunológica y virológica (Judd et al., 2007; COHERE, 2008). Sin embargo, hay menos fármacos aprobados para niños y el mal sabor y formulación de muchos de ellos dificultan su administración y la adherencia (CEVIHP/SEIP/AEP/SPNS, 2015). El desarrollo de nuevos ARV en niños sufre retraso respecto a los de adultos. Los resultados de ensayos clínicos en adultos no son extrapolables a niños, existiendo diferencias en tolerancia, ya que los pacientes pediátricos presentan farmacocinéticas diferentes que varían con la edad. En niños la adherencia es más difícil de mantener y deben atravesar etapas críticas como la adolescencia. Por otro lado, dado la cronicidad del tratamiento en pacientes VIH-1, los niños infectados van a recibir a lo largo de su vida múltiples tratamientos debido a la aparición de efectos secundarios, toxicidad, resistencia virológica y falta de adherencia. Ello aumenta el riesgo de que sufran eventos de fracaso terapéutico virológico por la aparición de virus resistentes a los ARV (WHO, 2016b).

La actividad de la TI es inhibida por dos grupos de fármacos: los inhibidores de la TI análogos de los nucleós(t)idos (ITIAN), que actúan como terminadores de cadena, y los inhibidores de la TI no análogos de los nucleós(t)idos (ITINAN), que inhiben específicamente a la TI del VIH-1. Los IP son fármacos muy potentes que pueden ser potenciados con dosis bajas de Ritonavir (RTV). El tratamiento de elección de la infección por el VIH-1 en niños en el momento actual consiste en una combinación de tres fármacos que incluyan dos ITIAN asociado a un ITINAN o un IP potenciado (CEVIHP/SEIP/AEP/SPNS, 2015). También existen o se están desarrollando nuevas familias de fármacos cuya diana son otras enzimas o fases del ciclo biológico del VIH-1. Entre ellos, los inhibidores de la INT, los inhibidores de la entrada (maraviroc o MRV y enfuvirtida) y los de maduración (Palladino et al., 2010; Wiznia et al., 2007). La **Tabla I.1** resume los fármacos actualmente disponibles en España para tratar la infección por VIH-1 en pediatría.

Tabla I.1. Antirretrovirales autorizados en España con indicación en población pediátrica para el tratamiento del VIH.

Medicamentos nombrados por Principio Activo	Abreviatura	Tipo de Agente
Abacavir	ABC	
Emtricitabina	FTC	
Lamivudina	3TC	ITIAN
Zidovudina	AZT, ZDV	
Tenofovir	TDF, TNF	
Efavirenz ^{1,2}	EFV	
Nevirapina	NVP	ITINAN
Etravirina	ETV, ETR	
Atazanavir ¹	ATV	
Darunavir ¹	DRV	
Fosamprenavir ¹	FPV	IP
Lopinavir	LPV	
Tipranavir ¹	TPV	
Ritonavir	RTV	
Enfuvirtida ¹	T-20	Inhibidor entrada
Raltegravir		
Dolutegravir ¹	RAL	Inhibidor INT

¹Indicado sólo para pacientes de determinada edad. ²Solución sólo disponible por uso compasivo o ensayo clínico.

El fracaso terapéutico se define como una respuesta inadecuada al TAR ya sea clínica, inmunológica o virológica. Se sospechará fracaso terapéutico si tras alcanzar la supresión viral la CV vuelve a ser detectable o si una vez iniciado el TAR se dan dos determinaciones consecutivas detectables. En caso de aparecer virus con mutaciones de resistencia, el fracaso terapéutico se considerará virológico, que viene definido por la respuesta virológica incompleta o rebrote de la CV persistente o repetido después de haber conseguido una CV indetectable.

TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL DE INICIO EN PEDIATRÍA

Actualmente existen diferentes guías para el tratamiento del VIH-1 pediátrico disponibles: la Guía del Departamento de Sanidad y Servicios Sociales de E.E.U.U (DHHS) (AIDS info, 2011), la de la Red Europea para el Tratamiento del sida Pediátrico (PENTA) (Welch et al., 2009), la OMS (WHO, 2010a) y la de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) (OPS, 2008). Existen también guías nacionales, como la del grupo de expertos de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica (SEIP) y del Plan Nacional sobre el SIDA (PNS) (CEVIHP/SEIP/AEP/SPNS, 2015). Todas ellas proponen iniciar el TAR con dos ITIAN y un ITINAN o como alternativa un IP con distintas pautas de elección, según la edad del niño (Tabla I.2).

Tabla I.2. TAR de inicio en función de la edad del paciente.

Edad del paciente	Pautas de elección
Desde los 14 días a los 3 años	2 ITIAN + LPV/r
≥ 3 años	2 ITIAN + LPV/r 2 ITIAN + EFV
≥ 6 años	2 ITIAN + LPV/r 2 ITIAN + EFV 2 ITIAN + ATV/r
≥ 12 años	2 ITIAN + LPV/r 2 ITIAN + EFV 2 ITIAN + ATV/r 2 ITIAN + DRV/r

Todos los infectados por VIH-1 deben comenzar con el TAR en el momento de ser diagnosticados por VIH-1, independientemente de la cifra o porcentaje de CD4 o de la CV (WHO, 2015), ya que el riesgo de progresión y de mortalidad es menor cuanto antes se comience con el TAR (Goetghebuer et al., 2009). Sin embargo, siempre habrá que considerar las características de cada paciente y la presencia de resistencias previas para elegir uno u otro ARV.

EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR VIH-1

El último informe conjunto de la Naciones Unidas y de la OMS publicado a principios de 2016, calcula que cerca de 37 millones de personas estaban infectadas por VIH-1 en el mundo (UNAIDS, 2016a, b). De ellos 1,8 millones son niños menores de 15 años. En 2015 se infectaron 150.000 jóvenes menores de 15 años por VIH-1 y 110.000 fallecieron a causa de la infección. En África subsahariana viven el 90% de los pacientes diagnosticados de infección por VIH-1 en el mundo y se infectan la mayoría de los niños (UNAIDS, 2016a).

En España, desde el inicio de la epidemia hasta 2014 se han notificado un total de 84.679 casos de sida, de los cuales 915 han sido declarados en pacientes pediátricos (SINIVIH, 2015). La proporción de casos de sida en personas de origen no español ha ido subiendo progresivamente desde el año 1998 hasta alcanzar el 28,6% en 2014. En ese mismo año, se diagnosticaron en España 3.366 nuevos casos de VIH-1, representando una tasa para 2014 de 9,34 por 100.000 habitantes. La principal transmisión se vio en hombres que mantienen relaciones sexuales con hombres (HSH; 53,9%), seguida de la heterosexual (26%) y de la de usuarios de drogas inyectables (UDI; 3,4%). El 46,2% global de los nuevos diagnósticos presentaron diagnóstico tardío. En España sólo se diagnosticaron 2 casos (0,1%) de infección por VIH-1 en pacientes pediátricos por transmisión materno-fetal en 2014, último año con datos publicados (de Jose et al., 2013).

En 2014 se diagnosticaron en la Comunidad de Madrid 570 casos de infección por VIH-1, siendo la ruta mayoritaria HSH (63,3%) seguida de la heterosexual (22,1%), no notificándose ningún caso de infección por VIH-1 por transmisión materno-infantil. Hasta 1997 la proporción de nuevos diagnósticos en personas nacidas fuera de España estuvo por debajo del 3%, pero desde entonces ha subido progresivamente hasta alcanzar el 32% en 2014. Durante 2014, el 47,1% de estas personas extranjeras procedía de Latinoamérica y el 17,1% de África Subsahariana (AIDS info, 2015)

TRANSMISIÓN VERTICAL DEL VIH-1 EN ESPAÑA

Desde que en 1997 se instauró la administración del tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) en las madres durante el embarazo, la profilaxis en el parto y en el niño, el diagnóstico temprano, el cuidado prenatal, la alimentación artificial, la cesárea electiva y la monitorización del embarazo también han reducido las tasas de transmisión vertical del VIH-1 en países industrializados hasta el 1-2%, incluyendo España (AIDS info, 2015). En España, las tasas de nuevos diagnósticos han seguido la tendencia de otros países de Europa occidental y siguen existiendo casos de transmisión vertical del VIH-1, sobre todo en el colectivo de inmigrantes infectados originarios de países con altas prevalencia de la infección y en grupos sociales que rechazan la monitorización del embarazo (Guillen et al., 2011). El aumento de la inmigración también ha traído consigo nuevos diagnósticos de infección VIH-1 en niños en España, a pesar de las medidas de prevención encaminadas a evitar nuevos casos de VIH-1 pediátrico (Guillen et al., 2011). Además, debido al alto impacto que tuvo durante la década de los 80 y 90 el abuso de drogas por vía parenteral que impactó especialmente en la población femenina, se alcanzaron los valores más altos de incidencia de VIH-1 de toda Europa occidental, causando una alta incidencia de transmisión vertical del VIH-1 en nuestro país.

COHORTE NACIONAL DE PACIENTES PEDIÁTRICOS CON VIH-1

La Cohorte de la Red de Investigación en sida pediátrico (CoRISpe) es una cohorte nacional de carácter prospectiva-retrospectiva, nacional y multicéntrica de niños y adolescentes infectados por VIH-1 (**Anexo I**). Su objetivo es conocer la situación epidemiológica del VIH-1 pediátrico en España, diseñar estudios para mejorar la situación clínica, inmunológica y virológica de los pacientes y aumentar su calidad de vida. Actualmente la mayoría de estos pacientes son adolescentes que han sobrevivido a la era previa al TARGA, presentando unas características clínicas, inmunológicas, virológicas y tratamiento diferentes a las del paciente VIH-1 de la misma edad e infectados por otra vía. CoRISpe sólo incluye pacientes que hayan estado en seguimiento a partir del 1 de enero de

1995. Registraba 1.206 niños y adolescentes repartidos en 74 hospitales de todo el territorio nacional en diciembre de 2015. El 41,8% de la Cohorte ha alcanzado la mayoría de edad y ha sido transferida a unidades adultos. De los pacientes en seguimiento en unidades pediátricas (34,1%), el 93,2% fueron infectados verticalmente, más de la mitad (76,2%) no muestran actualmente síntomas clínicos de progresión a sida, el 87,6% mantienen un nivel de linfocitos T CD4 >25% y el 78% presentan supresión viral (CV <50 cop./ml). La mayoría (73%) son de origen español, pero un 15,6% tiene origen subsahariano o tiene otras nacionalidades (11,4%). La mayoría recibe un tratamiento combinado basado en ITIAN+IP (44,2%) o en ITINAN+ITIAN (36%). El 82,5% de ellos comenzaron TAR con TARGA.

COHORTE DE NIÑOS Y ADOLESCENTES INFECTADOS POR VIH-1 DE LA COMUNIDAD DE MADRID

La Cohorte de Madrid está integrada en la red de seguimiento de niños con infección VIH de España (CoRISpe), formando parte del Nodo I. Está relacionada con otras cohortes europeas de niños (Red PENTA, Cohorte CHIPS, Encuesta Perinatal Francesa, Registro Italiano (Whelche et al., 2009; Chakrabortt et al., 2008; Frage et al., 2010; Giaquinto et al., 2010), y de adultos (COHERE, 2008). La infección por el VIH-1 en niños comenzó a diagnosticarse en la Comunidad de Madrid a principios de los años 80. Se estima que 561 (46,5%) niños de los 1.206 infectados por VIH-1 en España incluidos en la Cohorte CoRISpe han estado bajo seguimiento clínico en la Cohorte de niños y adolescentes infectados por VIH-1 de la Comunidad de Madrid desde 1995 hasta el 31 de diciembre de 2015. La Cohorte de Madrid, establecida en 2003, es una Cohorte retrospectiva-prospectiva y multicéntrica en la que participan 9 hospitales públicos de la Comunidad de Madrid. Incluye los nuevos diagnósticos pediátricos y registra los datos clínicos, epidemiológicos, analíticos, el TAR y la evolución clínica, inmunológica y virológica de los niños, entre otros. A diciembre de 2015, 289 pacientes estaban en seguimiento clínico en unidades pediátricas (43,9%) o de adultos (56,1%). La mayor parte de los nuevos infectados son niños de procedencia extranjera (Guillen S et al., 2011). Alrededor del 90% de los niños reciben TARGA actualmente, la mayoría tienen buena situación clínica e inmunológica y las dos terceras partes han alcanzado CV indetectable en la última determinación disponible. La Cohorte de Madrid dispone de más 3.000 muestras biológicas secuenciales de los niños infectados por VIH-1 en la Comunidad de Madrid almacenadas en el BioBanco-VIH pediátrico integrado en la Red de investigación en SIDA (RIS), ubicado en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

OBJETIVOS

Los objetivos de esta Tesis fueron:

- 1- Analizar la evolución clínica y virológica en niños y adolescentes de la Cohorte de Madrid perinatalmente infectados por VIH-1 con cepas resistentes a las tres familias principales de fármacos antirretrovirales durante el periodo 2000-2011. Evaluar la eficacia del tratamiento antirretroviral en estos pacientes y determinar qué opciones terapéuticas presentan tras el triple fracaso terapéutico.
- 2- Analizar el efecto de la experiencia al inhibidor de la proteasa Lopinavir potenciado con ritonavir (LPV/r) en niños y adolescentes infectados por VIH-1 en Madrid, España, durante más de una década (2000-2012).
- 3- Analizar las características clínicas y epidemiológicas basales, la evolución del perfil de resistencias y de las variantes virales del VIH-1 en la Cohorte de niños y adolescentes infectados por VIH-1 de la Cohorte de Madrid durante casi 25 años (1993-2015).
- 4- Evaluar el impacto de los parámetros clínicos en la evolución intra-huésped del subtipo B del VIH-1 en pacientes pediátricos infectados de la Cohorte de Madrid.

CAPÍTULO 1

**EVOLUCIÓN CLÍNICA Y VIROLÓGICA EN NIÑOS Y ADOLESCENTES
PERINATALMENTE INFECTADOS POR VIH-1 CON CEPAS RESISTENTES
A TRES FAMILIAS DE FÁRMACOS ANTIRRETROVIRALES DE LA
COHORTE DE MADRID (2000-2011)**

ANTECEDENTES

El acceso al TAR ha cambiado radicalmente el curso de la infección por VIH-1, tanto en población pediátrica como adulta, reduciendo la morbilidad e incrementando la esperanza de vida de la población infectada por el virus (Sánchez et al., 2003; Judd et al., 2007). No obstante, se han identificado en el genoma del virus alrededor de 130 cambios de aminoácidos diferentes, en 40 posiciones de la PR del VIH-1 y en 32 posiciones de la RT viral, que pueden conferir diferentes niveles de resistencia a uno o más fármacos ARV (Wensing et al., 2014). Tal y como se expuso previamente en la Introducción de esta Tesis, el TAR de primera línea más empleado para la población pediátrica y adulta infectada por VIH-1, incluye dos ITIAN y un tercer fármaco ITINAN o un IP potenciado con ritonavir (IP/r). Sin embargo, el fracaso terapéutico con la combinación ITIAN/ITINAN ocurre con una periodicidad anual y frecuencia del 15%, asociándose principalmente a la selección de MDR a ARV de esas dos familias (WHO, 2016b; Aghokeng et al., 2014; Stadelin et al., 2013). En este primer capítulo, se describen y analizan las características clínicas y epidemiológicas de los pacientes pediátricos infectados por VIH-1 con cepas resistentes a tres familias principales de fármacos ARV (MDR-TC) durante un periodo de 12 años (2000-2011) en la Cohorte pediátrica de la Comunidad de Madrid. Evaluándose la eficacia del TAR en estos pacientes y determinando que opciones terapéuticas son las más adecuadas en estos pacientes tras la selección de MDR-TC.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

En este estudio se identificaron los pacientes pediátricos de la Cohorte que presentaban MDR-TC. Se recopilaron las secuencias parciales del gen *pol* y/o los perfiles genotípicos de resistencia disponibles para cada paciente, desde marzo de 2000 hasta diciembre de 2011. Además, se recogió la información disponible sobre datos epidemiológicos, clínicos y virológicos (CV, variantes del VIH-1 y MDR) en el momento en que se detectó MDR-TC. Se comparó la evolución de los valores de CV, los recuentos de linfocitos T CD4 y la experiencia y susceptibilidad de fármacos ARV en la muestra basal (momento en el que se detectó MDR-TC por primera vez) y en la última muestra disponible a diciembre de 2013.

Las muestras de los pacientes fueron cedidas por el BioBanco de VIH integrado en la Red española de Investigación de Sida (RIS) (García Merino et al., 2010, **Anexo I**). Todos los pacientes o tutores legales dieron su consentimiento informado y los protocolos fueron aprobados por el comité ético.

Selección de muestras y secuencias

Se seleccionaron aquellos pacientes de los que se disponía secuencias parciales del gen *pol*, perfiles de resistencia genotípicos o muestras de plasma hasta diciembre de 2013. La mayoría (89,2%) de las secuencias y perfiles de resistencia habían sido previamente publicados (de Mulder et al., 2012a) o se recuperaron de test de resistencia procedentes de la rutina clínica de los hospitales de seguimiento y cedidos para el estudio por los responsables de los laboratorios.

Amplificación y secuenciación del gen *pol* del VIH-1 en nuevas muestras

El Biobanco disponía de 9 muestras nuevas de plasma infectado tomadas durante el seguimiento clínico de pacientes pediátricos con MDR-TC. Las alícuotas de plasma fueron congeladas a -80°C hasta el momento del análisis. A partir de las muestras de plasma, se llevó a cabo la extracción automatizada de ARN viral por sílice magnética (NucliSENS® easyMAG® Biomerieux). A partir del ARN se sintetizó ADNc y amplificó usando el Kit One-Step RT-PCR (Quiagen). Se emplearon las combinaciones de *primers* o cebadores: OPR1/ORT2, OPR1/OPR2 y/o ORT1/ORT2. Las condiciones de amplificación por RT-PCR fueron: incubación a 50°C durante 30m y a 95°C durante 15m, 35 ciclos a 94°C durante 30s, 53°C durante 30s y 72°C durante 1m, con una extensión final a 72°C, 10m. El amplicón generado por la RT-PCR se usó como molde para amplificar el ADN por PCR anidada o PCR *nested* de las regiones codificantes de *pol* del VIH-1, incluyendo la PR completa (codones 1-99) y parte de la TI (codones 1-232) usando el kit PHUSION High Fidelity Master Mix (Fermentas). Se emplearon la combinación de primers: OPR3/ORT4, OPR3/OPR4 y/o ORT3/ORT4 (**Tabla 1.1**).

Tabla 1.1. Cebadores utilizados para la amplificación por PCR.

Cebador	Posición ¹	Secuencia (5'-3')
Ida		
OPR1	2057-2085	TGAARGAITGYACTGARAGRCAGGCTAAT
OPR3	2135-2159	YTCAGRCAGRCCRGARCCAACAGC
ORT1	2777-2803	TTTTYAGRGARCTYAATAARAGAACTCA
ORT3	2808-2833	TTYTG GGARGTYCARYTAGGRATACC
Vuelta		
OPR2	2995-2979	AYCTIATYCCTGGTGTATCATTRTT
OPR4	2945-2950	CTGGTGTATCATTRTTKRTACTAGGT
ORT2	3599-3623	CCTCITYTTGCATAYTTYCCTGTT
ORT4	3558-3593	GGYTCTTGRTAAATTTGRTATGTCCA

¹ Posición en el genoma VIH-1 de acuerdo con la secuencia de referencia HXB2 (número de acceso K03455).

Los cebadores usados para las amplificaciones y secuenciación fueron los recomendados por la OMS (WHO, 2010c). Las condiciones de amplificación por PCR *nested* fueron: incubación a 98°C durante 30s, 35 ciclos a 98°C durante 10s, 53°C durante 30s y 72°C durante 45s, con una extensión final a 72°C, 10m, como se describió previamente (Holguín et al., 2003). Los amplicones se purificaron con *illustra ExoProStar* (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Reino Unido) y fueron secuenciados por MacroGen Inc. (Gasan-dong, Geumchun-gu, Seúl, Corea del Sur) para el posterior análisis de resistencias y variantes.

Análisis de mutaciones de resistencias

Las MDR en población pediátrica infectada pretratada con ARV se definieron de acuerdo con el listado la Sociedad Internacional de Sida de los E.E.U.U. (IAS-USA-2015) (**Anexo I**). La susceptibilidad de cada fármaco ARV se predijo utilizando el algoritmo de *Stanford HIVdb* (**Anexo I**) y en base a la calificación recibida para cada mutación de resistencia fijada en el virus, se establecieron cuatro categorías de susceptibilidad para cada fármaco: 1) susceptible, 2) nivel bajo de resistencia, 3) nivel intermedio de resistencia y 4) nivel alto de resistencia.

Análisis estadístico

La distribución de las variables se describió como mediana y rango intercuartílico (RIQ).

RESULTADOS

Datos demográficos de pacientes infectados por virus con MDR-TC

Se identificaron 48 niños infectados por VIH-1 y con virus resistentes a las tres familias de fármacos, entre 2000 y 2011, lo que representa un 9% del total de los 534 niños y adolescentes infectados por VIH-1 incluidos en la Cohorte de Madrid. Esta proporción se vio incrementada a un 24,4% cuando se estimó la prevalencia de estos 48 pacientes frente a los pacientes pediátricos con mutaciones de resistencia registrados en la Cohorte pediátrica (n = 197). Se recopilaron un total de 158 secuencias parciales del gen *pol* y 62 perfiles de resistencia genotípicos (rango de 1-24 secuencias y/o perfiles de resistencia genotípico por paciente) para los 48 pacientes con MDR-TC, pero solamente se seleccionaron las secuencias o perfiles de resistencia genotípicos basales y correspondientes a la última muestra disponible, a diciembre de 2011. En total, se emplearon 63 secuencias parciales del gen *pol* y 18 perfiles de resistencia genotípico disponibles hasta dicha fecha. Se observó un decrecimiento en la prevalencia de MDR-TC en pacientes infectados con virus a lo largo del tiempo: 70,8% (2000-2004) vs. 29,2% (2005-2011).

Características clínicas de la población de estudio

La información disponible y relacionada con las características clínicas y epidemiológicas de los 48 pacientes pediátricos infectados perinatalmente por VIH-1 y con MDR-TC fue recogida hasta diciembre de 2013 y se muestra en la **Tabla 1.2**. Según el origen o lugar de nacimiento de los pacientes, 44 (91,6%) eran españoles, 2 (4,2%) africanos y 2 (4,2%) latinoamericanos. La mayoría (89,6%) de los pacientes se encontraban infectados por VIH-1 subtipo B y el 95,8% habían sido diagnosticados antes del año 2003. El 75% de la población había recibido monoterapia o biterapia y un 25% triple terapia como primer régimen ARV. Entre los pacientes incluidos en el último grupo, uno de ellos (8,3%), recibió triple terapia con ITIAN y 11 (91,7%) recibieron triple terapia con IP, incluyendo NFV no potenciado con ritonavir en 4 casos y LPV/r en un caso. Ninguno de los niños restantes recibió IP potenciado con ritonavir cuando fueron tratados con IDV, SQV, APV, FPV, TPV y/o DRV. La edad media de los pacientes cuando se detectó MDR-TC por primera vez fue de 10,5 años y la mayoría de ellos (87,5%) desarrollaron MDR-TC antes del año 2009. Todos los pacientes habían recibido TAR cuando la primera secuencia *pol* del VIH-1 estaba disponible. La edad media al inicio del TAR fue cercana a los 3 años y más del 50% de los pacientes habían recibido ZDV como terapia de primera línea, usando 16 combinaciones diferentes de fármacos y siendo la combinación más frecuente 2ITIAN+1IP (**Tabla 1.2**).

Hasta diciembre de 2013, los pacientes con experiencia a fármacos de las tres familias principales de ARV habían estado en TAR durante una media de 13 años, con cambios frecuentes de regímenes (4,3 regímenes diferentes de media). Se encontraban muy pretratados, habiendo recibido 9,5 fármacos de media por paciente (con un rango de 3-18 fármacos diferentes) (**Tabla 1.2**). Más del 80% de los pacientes habían recibido al menos un fármaco prescrito como *off-label* de acuerdo con la Agencia Europea del Medicamento (EMA) (**Anexo I**).

A diciembre de 2013, 21 (43,8%) de los 48 pacientes pediátricos con MDR-TC habían sido transferidos a unidades de adultos: 2 pacientes fueron transferidos antes de que se detectase MDR-TC, 2 en momento exacto de la detección de MDR-TC y 17 tras la identificación de MDR-TC en sus virus. De los 25 niños aún en seguimiento en unidades pediátricas, uno falleció y de otro se perdió su seguimiento clínico.

Tabla 1.2. Características demográficas, clínicas y epidemiológicas de los 48 niños y adolescentes de la Cohorte de Madrid infectados VIH-1 con MDR-TC (2000-2011).

Características	Número de pacientes (%)
Origen^a	
España	44 (91,6)
África	2 (4,2)
América	2 (4,2)
Variantes VIH-1	
Subtipo B	43 (89,6)
Año de diagnóstico	
1987-1993	20 (43,5)
1994-2004	26 (56,5)
Primer régimen ARV	
ITIAN	28 (58,3)
2ITIAN+IP	11 (22,9)
2ITIAN	8 (16,7)
2ITIAN + ITINAN	1 (2,1)
2ITIAN+ITINAN+IP	0
Año de aparición de MDR-TC^d	
2000	11 (22,9)
2001-2004	23 (47,9)
2005-2008	8 (16,7)
2009-2011	6 (12,5)
Experiencia ARV	
ITIAN	37 (100)
ITINAN	31 (83,8)
IP	37 (100)
Número de TAR previos^h	
1-2	8 (21,6)
3-6	24 (64,9)
7-12	5 (13,5)
Número de ARV previos	
<3	0
3-6	7 (18,9)
7-13	25 (67,6)
>13	5 (13,5)
Edad media al diagnóstico	
	20 meses (rango: 0-122)
Edad media a la toma del primer TAR^d	
	37,7 meses (rango 0-122)
Edad media cuando se detectó MDR-TC	
	10,5 años (rango 1-26)
Media de CV (cop./ml)^c	
	42.028 cop./ml (RIQ : 4.574 -98.250)
Media de CD4^e	
	25,5% (RIQ: 18-33%)
Media de CD8^f	
	43,5% (RIQ 34-52%)
Media del ratio CD4/CD8^g	
	0,5 (RIQ 0,3-0,7)

ARV, antirretroviral; MDR, mutaciones de resistencia; MDR-TC, MDR triple clase; TAR, tratamiento antirretroviral; RIQ, rango intercuartílico; CV, carga viral.^a Países de origen; España (44), Guinea Ecuatorial (1), Mozambique (1), Guatemala (2). Porcentajes calculados con los siguientes datos disponibles: 46^c, 40^d, 44^e, 42^f, 28^g y 37^h niños infectados por VIH-1 con MDR-TC.

A diciembre de 2013 se disponía de los últimos datos clínicos y virológicos recopilados de los informes de los 48 pacientes pediátricos infectados por VIH-1 y con MDR-TC. En el 50% de ellos, el último seguimiento clínico se encontraba disponible únicamente hasta el año 2012 (**Tabla 1.3**). A esta fecha, la mayoría (47,9%) de los pacientes eran adultos jóvenes (> de 18 años) y 17 (73,9%) se encontraban en seguimiento clínico en unidades de adultos. Veintiocho pacientes (58,3%) con MDR-TC presentaron viremia indetectable ($CV \leq \text{cop./ml}$). De los 44 pacientes con datos disponibles de recuento de linfocitos T CD4, 36,4% presentaron un número superior a 750 céls/mm³ y 65,9% presentaron un recuento superior a 500 céls/mm³. Además, entre los 39 pacientes con datos disponibles de recuento de linfocitos T CD4 y T CD8, el 20,9% consiguieron normalizar el ratio CD4/CD8, siendo éste ≥ 1 (**Tabla 1.3**), sugiriendo un buen estadio inmunológico en la última visita clínica.

Prevalencia de las mutaciones de resistencias asociadas a VIH-1 y análisis de susceptibilidad a fármacos ARV

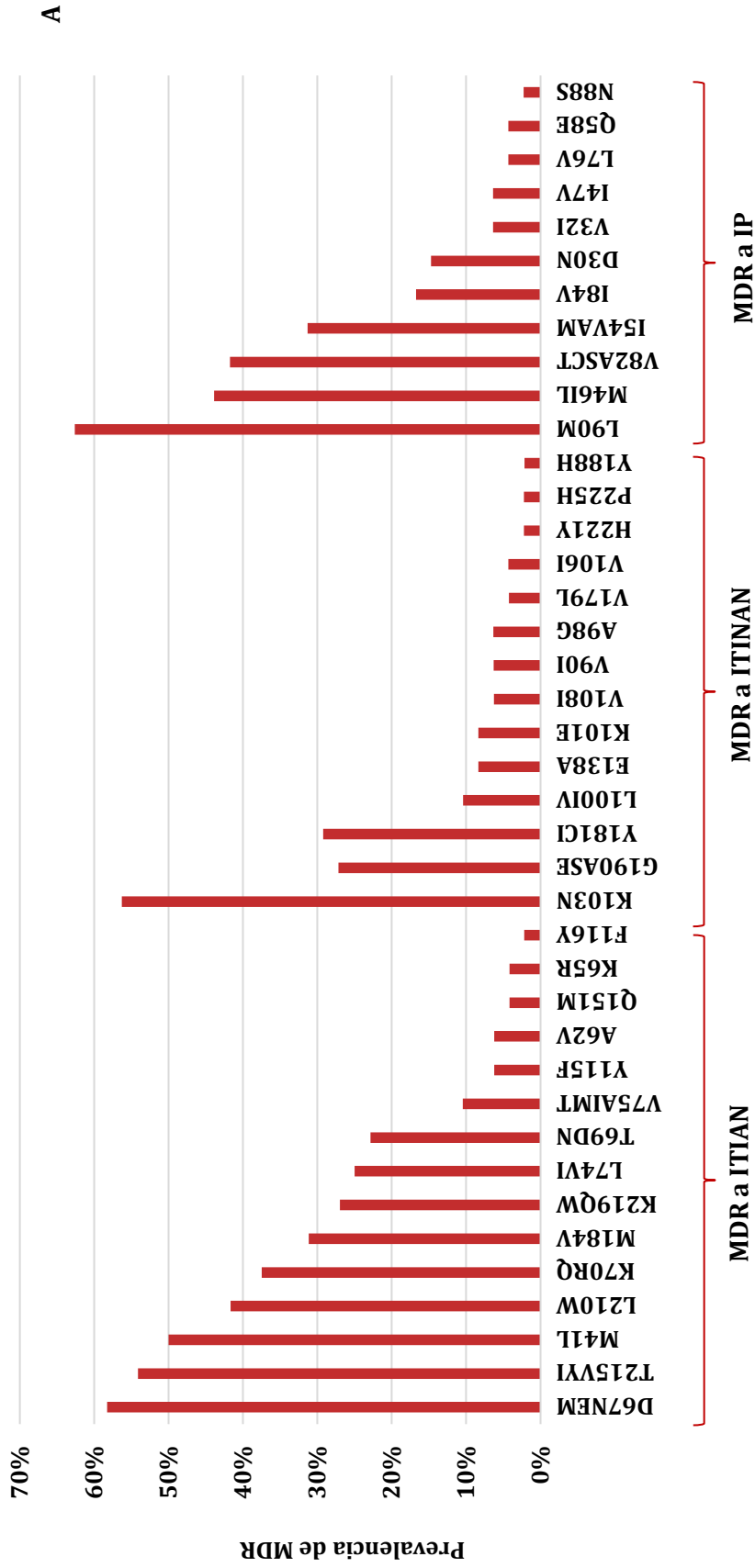
Se identificaron un total de 378 MDR primarias en los virus que infectaban a los 48 pacientes cuando se detectó MDR-TC. La tasa de MDR asociada a ITIAN (48,4%) fue casi el doble que la encontrada para IP (29,6%) e ITINAN (21,9%). Las MDR detectadas con una mayor frecuencia (considerando una prevalencia $\geq 50\%$) en esta población fueron las siguientes: D67NME, T215FVY y M41L para ITIAN y K103N para ITINAN en la TI viral. En la PR únicamente se observó la sustitución L90M (**Figura 1.1A**). No obstante, a pesar de que los pacientes pediátricos presentaron MDR-TC, se pudo observar que sus virus aún eran susceptibles a algunos fármacos pertenecientes a las tres familias principales de ARV. En más detalle, el algoritmo de *Stanford HIVdb* predijo susceptibilidad conservada a DRV en 32 (66,7%) de los 48 pacientes pediátricos con MDR-TC, a TPV en 21 (43,7%), a ETV en 16 (33,3%) y a RPV en 16 (33,3%) pacientes (**Figura 1.1B**). Sin embargo, sólo un 2,1% de los pacientes presentaron susceptibilidad a ABC y ddI y todos los 48 niños reportaron un alto grado de resistencia a NFV. Entre los pacientes con secuencia parcial del gen *pol* y/o perfiles de resistencia genotípico disponibles, el 54% de ellos presentaron la mutación T215Y y resistencia a ABC, además de un alto nivel de resistencia a AZT y d4T cuando la sustitución M41L estaba presente. Más de la mitad de los 48 niños presentaron la sustitución K103NS, habiendo tenido experiencia todos ellos a EFV y NVP. Para los IP, las mutaciones L90M y M46L presentaron un bajo nivel de resistencia LPV. El 45,8% de los 48 pacientes habían sido infectados con virus que presentaban 5 o más mutaciones de resistencia minoritarias a IP (rango: de 2-10) (**Figura 1.2**).

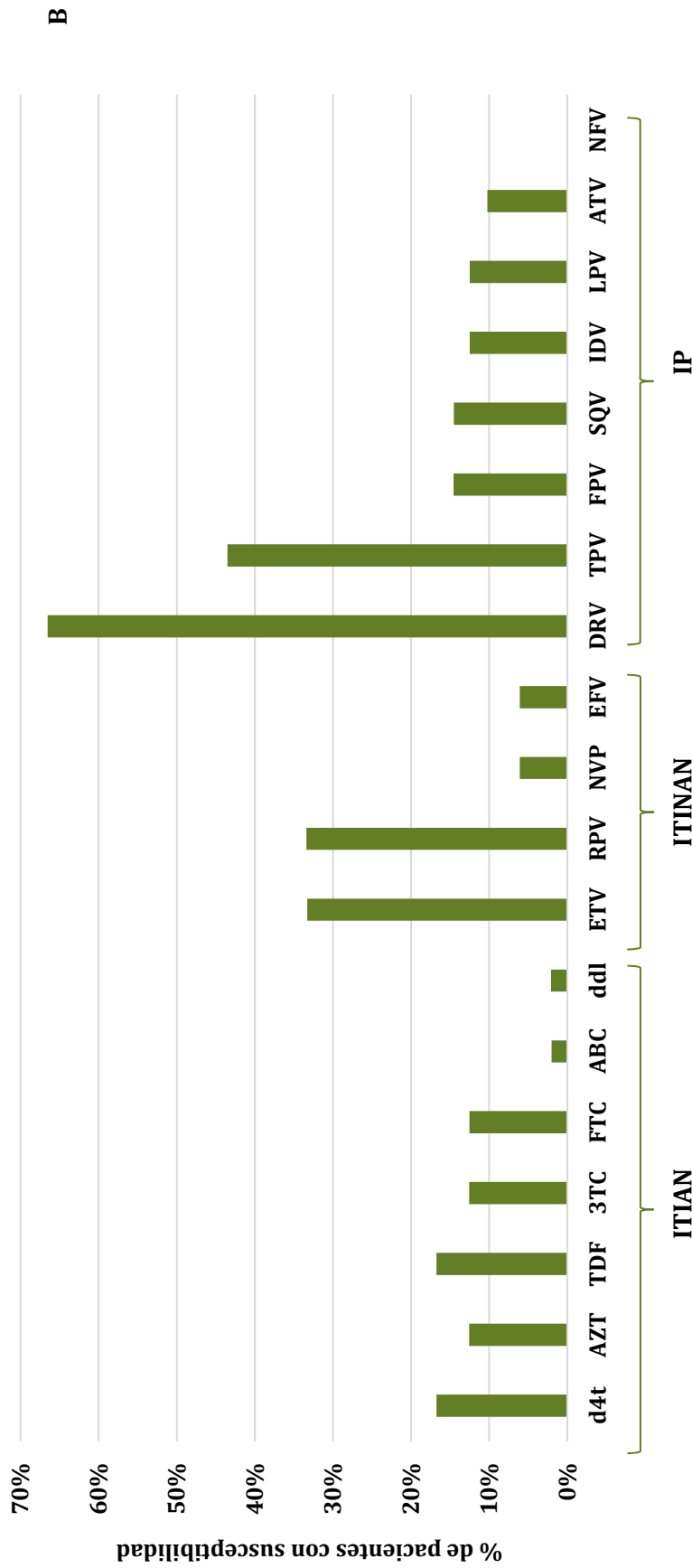
Tabla 1.3. Situación inmunológica y virológica de los 48 pacientes seleccionados con experiencia a MDR-TC en la última visita clínica hasta diciembre de 2013.

Año	Nº de pacientes	Edad media [Rango]	Media CV [Rango cop./ml]	Nº de pacientes			Ratio CD4/CD8 ^c	
				Con ≤50 cop./ml	Con fracaso virológico (cop./ml) >10 ³ -10 ⁴ >10 ⁴ -10 ⁵ >10 ⁵	con ≥500 CD4 céls/mm ^{3a}		
2013	12	19,2 [14-29]	21 [20-12.1.635]	9	1	1	4	0,87
2012	8	17,9 [9-25]	30,5 [20-29.400]	5	2	1	6	1,8
2011	8	19,1 [15-24]	41,5	5	1	2	4	0,65
2010	5	17,2 [15-19]	19.552 [50-150.000]	2	0	1	2	0,50
2008	4	11,5 [6-19]	50 [50-90.375]	3	1	0	2	0,45
2007	3	19,7 [18-21]	50 [50]	3	0	0	3	1
2006	1	15	247.948	0	0	1	1	0,24
2005	2	18,9 [16-21]	23.632 [34.742-12.5	0	0	2	1	0,54
2004	1	8	11.000	0	0	1	0	0,33
2003	2	6,4 [2-12]	420.104 [100.000-7,	0	0	2	1	0,04
2000	2	4,7 [3-7]	2.975 [50-5.900]	1	1	0	2	ND
2000-2013	48 (100%)	16,5 [2-29]	50 [20-740.208]	28 (58,3%)	6 (12,5%)	8 (16,7%)	29 (65,9%)	0,89

CV, carga viral; ND, dato no disponible.^a Valores calculados entre 44 pacientes con datos disponibles de células T CD4; rango de %T CD4: 1%-53%; rango de n° de células T CD4: 19-2578.^b Media calculada entre los 43 pacientes con datos disponibles de células T CD8; rango de %T CD8 22%-80%; rango de n° de células T CD8: 108-2204.^c Media calculada entre los 39 pacientes con datos CD4/CD8 disponibles. Rango del ratio CD4/CD8: 0,01 - 8,58.

Figura 1.1. Prevalencia de MDR y porcentaje de pacientes con susceptibilidad predicha a cada ARV en los 48 pacientes cuando se detectó MDR-TC por primera vez.





A) Prevalencia de MDR a las diferentes familias de fármacos ARV; **B)** porcentaje de pacientes con susceptibilidad predicha a cada ARV en los 48 pacientes pediátricos infectados por VIH-1 con secuencia *pol* disponible cuando se detectó MDR-TC por primera vez. MDR, mutaciones de resistencia; ITIAN, inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleós(t)idos; ITINAN, inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleós(t)idos; IP, inhibidores de la proteasa; d4T, estavudina; AZT, zidovudina; TDF, tenofovir; 3TC, lamivudina; FTC, emtricitabina; ABC, abacavir; ddl, didanosina; ETV, etravirina; RPV, rilpivirina; NVP, nevirapina; EFV, efavirenz; DRV, darunavir; TPV, tipranavir; FPV, fosamprenavir; SQV, saquinavir; IDV, indinavir; LPV, lopinavir; ATV, atazanavir; NFV, nelfinavir.

Figura 1.2. Susceptibilidad a fármacos ARV del virus en 48 pacientes infectados por VIH-1 con secuencia *pol* disponible cuando se detectó MDR-TC por primera vez.

Pacientes	ITIAN								ITINAN							IP							MDR			
	AZT	ddI	d4T	3TC	ABC	TDF	FTC	NVP	EfV	ETV	RPV	SQV	IDV	NFV	LPV	ATV	FPV	TPV	DRV	ITIAN	ITINAN	IP	ITINAN	IP	ITINAN	IP
P1	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	D67N, T69D, K70KR, T215FV, K219Q	G190A, K103S	L90M (4)				
P2	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	M41L, D67N, T69D, L74I, V75A, L210W, T215Y	G190S	V82A, L90M, I54V (6)				
P3	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	M41L, D67N, T69D, L210W, T215Y	Y181C, G190A	M46L, V82A, L90M				
P4	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	M41L, D67N, T69D, K70R, L74V, L210W, T215F, K219W	L100I, K103N	M46I, I84V, L90M				
P5	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	M41L, D67N, L210W, T215Y	V108I, Y181C	V32I, M46I, V82A, L90M				
P6	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	M41L, T215Y	K103N	V82A				
P7	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	K65R, K70R, V75I, Q151M	G190A	D30N				
P8	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	M41L, D67N, L210W, T215Y	K103N	M46I, L90M				
P9	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	M41L, L74V, M184V, L210W, T215Y	L100I, K103N	V32I, M46I, V82A, L90M				
P10	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	M41L, D67N, T69D, L210W, T215Y	K103N, Y181C	D30N, L90M				
P11	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	M184V	K103N	V82A				
P12	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	M41L, D67N, L74V, L210W, T215Y	K103N	D30N				
P13	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	M41L, D67N, L74V, L210W, T215Y	L100I, K103N	M46I, I84V, L90M				
P14	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	M41L, D67N, K70R, T215F, K219Q	K103N, Y181C, G190A	V82A				
P15	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	D67N, K70R, M184V, K219Q	K103N	M46I, V82A, I54V (6)				
P16	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	M41L, M184V, L210W, T215Y	K103N, Y181C	M46I, I84V, L90M				
P17	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	K219EQ	E138K	D30N				

Pacientes	ITIAN										ITINAN							IP							MDR		
	AZT	ddI	d4T	3TC	ABC	TDF	FTC	NVP	EFV	ETV	RPV	SQV	IDV	NFV	LPV	ATV	FPV	TPV	DRV	ITIAN	ITINAN	IP (nº de minor)					
P18	Green	Blue	Green	Red	Blue	Green	Red	Green	Green	Red	Red	Yellow	Yellow	Red	Blue	Yellow	Yellow	Green	Green	M184V,A62V	V90I	M46I, L90M (4)					
P19	Red	Red	Red	Yellow	Red	Red	Yellow	Red	Red	Green	Green	Yellow	Yellow	Red	Blue	Yellow	Yellow	Green	Green	M41L, D67N, L210W, T215Y	K103N	M46I, L90M (5)					
P20	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Blue	Blue	Blue	Blue	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	K65R, K70R, V75I, F116Y, Q151M	V90I, H221Y	D30N					
P21	Blue	Blue	Green	Red	Blue	Green	Red	Blue	Green	Green	Green	Yellow	Yellow	Red	Blue	Yellow	Yellow	Green	Green	K70R, M184V	V108I	L90M					
P22	Red	Red	Red	Yellow	Red	Yellow	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	M41L, D67N, K70R, K219E	K103N, Y181C	I84V, L90M (7)					
P23	Blue	Blue	Green	Red	Blue	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	K70R, M184V	K101E, K103N, G190S	I84V, I90M (6)					
P24	Red	Red	Red	Blue	Red	Red	Blue	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	M41L, D67N, L74LV, Y115FY, L210W, T215Y	K101P, K103N	M46L, I54V, V82A, L90M (7)					
P25	Red	Red	Red	Yellow	Red	Red	Yellow	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	M41L, D67N, T69D, L210W, T215Y	K103N	I47V, V82T, L90M, I54A (10)					
P26	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Blue	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Red	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	M41L, L210W, T215Y	K103N	L90M (3)					
P27	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Blue	Red	Red	Red	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y	E138A	D30N, M46I (2)					
P28	Yellow	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Blue	Yellow	Yellow	Green	Green	K70R	Y181I, V179L	M46IM, L90M (5)					
P29	Yellow	Yellow	Blue	Red	Blue	Blue	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Red	K70R, M184MV, T69N	Y181CY	I47V, I54M (6)					
P30	Yellow	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	K70R, A62V	Y181C	D30N (4)					
P31	Red	Red	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Red	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	D67N, K70R, K219EQ	K103N, Y181C	L90M					
P32	Red	Red	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	D67N, T69N, K70R, K219E, T215I	Y181C	I54V, V82AV, I84V (9)					
P33	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Blue	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Blue	Blue	M41L, L210W, T215Y, K219N	E138A, G190E	V82A, L90LM, I54V (8)					
P34	Green	Red	Green	Yellow	Yellow	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	L74V	L100I, K103N (3)	M46I, V82S, L90M (3)					
P35	Red	Red	Red	Yellow	Red	Red	Yellow	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Red	Red	Red	Red	Red	Red	M41L, L74V, L210W, T215Y, D67E, V75M	A98G, Y181C, G190A, K101E	M46I, I54V, L76V, V82A (8)					
P36	Red	Yellow	Red	Blue	Yellow	Yellow	Blue	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	D67N, K70R, T215Y, K219Q	K103N, G190A	I54V, V82C, L90M (6)					

Pacientes	ITIAN								ITINAN								IP								MDR		
	AZT	d4T	3TC	ABC	TDF	FTC	FTC	FTC	NVP	EFV	ETV	RPV	SQV	IDV	NFV	LPV	ATV	FPV	TPV	DRV	ITIAN	ITINAN	IP (nº de minor)				
P37	12,5	16,7	12,5	2,1	16,7	12,5	12,5	6,2	6,2	33,3	33,3	33,3	14,6	12,5	0	12,5	10,4	14,6	43,7	66,7	M184V, L210W, T215Y	G190S	I54V, V82A, L90M, Q58E (5)				
P38	12,5	16,7	12,5	2,1	16,7	12,5	12,5	6,2	6,2	33,3	33,3	33,3	14,6	12,5	0	12,5	10,4	14,6	43,7	66,7	D67N, T69D, K70R, L74V, Y115F, M184V, K219Q	A98G, K103N, Y181C, G190A	M46I, V82A, L90M, I54V (9)				
P39	12,5	16,7	12,5	2,1	16,7	12,5	12,5	6,2	6,2	33,3	33,3	33,3	14,6	12,5	0	12,5	10,4	14,6	43,7	66,7	D67N, M184V	A98AG, L100V	V82A, I54V (6)				
P40	12,5	16,7	12,5	2,1	16,7	12,5	12,5	6,2	6,2	33,3	33,3	33,3	14,6	12,5	0	12,5	10,4	14,6	43,7	66,7	V90I	V90I	L90M (4)				
P41	12,5	16,7	12,5	2,1	16,7	12,5	12,5	6,2	6,2	33,3	33,3	33,3	14,6	12,5	0	12,5	10,4	14,6	43,7	66,7	M41L, D67N, K70Q, V75M, M184V	K101E, V106M, E138A, G190S	M46L, I54V, L76V, V82C, L90M (8)				
P42	12,5	16,7	12,5	2,1	16,7	12,5	12,5	6,2	6,2	33,3	33,3	33,3	14,6	12,5	0	12,5	10,4	14,6	43,7	66,7	D67N, T69N, K219Q	P225H	Q58E (6)				
P43	12,5	16,7	12,5	2,1	16,7	12,5	12,5	6,2	6,2	33,3	33,3	33,3	14,6	12,5	0	12,5	10,4	14,6	43,7	66,7	M41L, D67N	K103N, V106I	M46I (4)				
P44	12,5	16,7	12,5	2,1	16,7	12,5	12,5	6,2	6,2	33,3	33,3	33,3	14,6	12,5	0	12,5	10,4	14,6	43,7	66,7	M41L, D67DN, L74LV, M184MV	K103N	I84IV, L90LM (7)				
P45	12,5	16,7	12,5	2,1	16,7	12,5	12,5	6,2	6,2	33,3	33,3	33,3	14,6	12,5	0	12,5	10,4	14,6	43,7	66,7	D67N, T69D, T215V, K219Q	V108I	V32I, I47V, I54IM, L90M(5)				
P46	12,5	16,7	12,5	2,1	16,7	12,5	12,5	6,2	6,2	33,3	33,3	33,3	14,6	12,5	0	12,5	10,4	14,6	43,7	66,7	L74V, L210W, T215Y	K103N, Y181C	M46I, N88S (4)				
P47	12,5	16,7	12,5	2,1	16,7	12,5	12,5	6,2	6,2	33,3	33,3	33,3	14,6	12,5	0	12,5	10,4	14,6	43,7	66,7	L74V, Y115F, M184V	K103N, G190A, V179E	M46L, I84V (7)				
P48	12,5	16,7	12,5	2,1	16,7	12,5	12,5	6,2	6,2	33,3	33,3	33,3	14,6	12,5	0	12,5	10,4	14,6	43,7	66,7	M41L, D67N, L210W, T215Y	K103N, Y188H	M46L, I54V, V82A, L90M (6)				

ARV, antirretrovirales; MDR-TC mutaciones de resistencia triple clase; ITIAN, inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleós(t)idos; ITINAN, inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleós(t)idos; IP, inhibidores de la proteasa; MDR, mutaciones de resistencia. AZT, zidovudina; ddi, didanosina; d4T, estavudina; 3TC, lamivudina; ABC, abacavir; TDF, tenofovir; FTC, emtricitabina; NVP, nevirapina; EFV, efavirenz; ETV, etravirina; RPV, rilpivirina; SQV, saquinavir; IDV, indinavir; NFV, nelfinavir; LPV, lopinavir; ATV, atazanavir; FPV, fosamprenavir; TPV, tipranavir; DRV, darunavir; nº, número *minor*, mutaciones de resistencia secundaria a IP. Código de colores: verde, susceptible; azul, nivel bajo de resistencia; amarillo, nivel intermedio de resistencia; rojo, alto nivel de resistencia.

Seguimiento longitudinal de las MDR-TC

De los 48 pacientes pediátricos infectados por VIH-1 y con MDR-TC, 35 (72,9%) presentaron secuencias parciales del gen *pol* y/o perfiles de resistencia genotípicos adicionales, es decir, después de que se detectase MDR-TC hasta diciembre de 2013 (**Figura 1.3**). El tiempo medio entre estas secuencias fue de 51,7 meses. Durante este periodo, se detectaron MDR a al menos una familia de ARV que revirtió a genotipo *wild type* (wt) en 15 (42,8%) pacientes (P3, P9, P10, P11, P12, P15, P17, P27, P28, P34, P36, P37, P42, P44 y P47) entre los 35 niños con MDR-TC y seguimiento longitudinal.

Por otro lado, cuando se detectaron MDR a ITIAN se observó reversión a wt en 9 niños (P3, P9, P10, P15, P17, P34, P36, P42 y P44) y todos ellos recuperaron completamente su susceptibilidad a diferentes fármacos, como NVP y EFV, según la predicción de *Stanford HIVdb* (**Figura 1.3**). Adicionalmente, dos pacientes (P25 y P33) recuperaron susceptibilidad completa a NVP y EFV, a pesar de presentar infección por virus con las sustituciones V90I y E138A, respectivamente. Todas las mutaciones de resistencia a ITIAN revirtieron a wt en 4 niños (P3, P11, P28 y P36) que recuperaron la susceptibilidad a todos los ARV de la familia de ITIAN. El paciente P16 recuperó la susceptibilidad a 3TC y FTC, a pesar de que la mutación M41L fuese detectada en sus virus. Las MDR a IP revirtieron en 9 pacientes (P3, P10, P12, P17, P27, P28, P34, P37 y P47) que experimentaron una mejora en la susceptibilidad a la mayoría de los fármacos pertenecientes a la familia de los IP (**Figura 1.3**).

Figura 1.3. Susceptibilidad a los diferentes fármacos ARV en 35 niños infectados por VIH-1 cuando se detectó MDR-TC y en la última secuencia *pol* o perfil de resistencia disponible hasta diciembre de 2013.

Pacientes	ITIAN							MDR a ITIAN				ITINAN				MDR a ITINAN								IP								MDR a IP primarias	t. medio entre sec (meses)	Fecha de secuencia
	AZT	DDI	d4T	3TC	ABC	TDF	FTC	MDR a ITIAN	NVP	EfV	ETV	RPV	MDR a ITINAN	SQV	IDV	NFV	LPV	ATV	FPV	TPV	DRV	MDR a IP primarias	t. medio entre sec (meses)	Fecha de secuencia										
P3								M41L, D67N, T69D, L210W, T215Y					Y181C, G190A										M46L, V82A, L90M	59	03/04/2000									
P3*								ND					ND										Ninguna		10/03/2005									
P4								M41L, D67N, T69D, K70R, L74V, L210W, T215F, K219W					L100I, K103N										M46I, I84V, L90M	23	01/12/2000									
P4*								M41L, D67N, T69D, K70R, L74V, V75M, L210W, T215F, K219W					L100I, K103N										M46I, I47V, I54V, I84V, L90M		20/11/2002									
P5								M41L, D67N, L210W, T215Y					V108I, Y181C										V32I, M46I, V82A, I84V, L90M	112	16/11/2000									
P5*								M41L, D67N, L210W, T215Y, K219NRS					K101H, Y108I, Y181C, G190A, H221Y										V32I, M46I, I54V, V82A, I84V, L90M		01/03/2010									
P7								K65R, K70R, V75I, Q151M					G190A										D30N	152	29/06/2000									
P7*								M41L, K65R, K70R, V75I, Y115F, F116Y, Q151M, K219E					K101PQ, G190A										D30N, I54V, V82A, I84V		27/02/2013									
P8								M41L, D67N, L210W, T215Y					K103N										M46I, L90M	155	28/11/2000									
P8*								M41L, L210W, T215Y					Y181S, Y188C										M46I, L90M		09/10/2013									
P9								M41L, L74V, M184V, L210W, T215Y					L100I, K103N										V32I, M46I, V82A, L90M	55	29/06/2000									
P9*								M41L, D67N, L210W, T215Y					Ninguna										V32I, M46I, I47V, I54V, V82A, L90M		10/01/2005									
P10								M41L, D67N, T69D, L210W, T215Y					K103N, Y181C										D30N, L90M	145	09/05/2000									
P10*								M41L, L210W, T215S					Ninguna										Ninguna		25/07/2012									
P11								M184V					K103N										V82A	6	21/06/2000									
P11*								Ninguna					K103N										V82A		21/12/2000									
P12								M41L, D67N, L74V, L210W, T215Y					K103N										D30N	50	08/05/2001									

Pacientes	ITIAN							MDR a ITIAN				ITINAN				MDR a ITINAN	IP							MDR a IP primarias	t. medio entre sec (meses)	Fecha de secuencia				
	AZT	DDI	D4T	3TC	ABC	TDF	FTC	MDR a ITIAN				NVP	EFV	ETV	RPV	MDR a ITINAN				SQV	IDV	NFV	LPV				ATV	FPV	TPV	DRV
P40								A62V, M184V								V90I												L90M	1	09/05/2006
P40*								A62V, M184V								V90I												M46IM, L90M		13/06/2006
P41								M41L, D67N, K70Q, V75M, M184V								K101E, V106MV, E138A, G190S												M46L, I54V, L76V, V82C, L90M	14	21/02/2007
P41*								M41L, D67N, K70Q, V75M, L210W, T215Y								K101E, V106M, E138A, G190A, F227FL												M46I, I50V, I54V, L76V, V82C, L90M		30/04/2008
P42								D67N, T69N, K219Q								P225H												Q58E	21	27/04/2007
P42*								D67N, T69N, K219Q								Ninguna												Q58E		16/01/2009
P44								M41L, D67DN, L74LV, M184MV								K103N												I84IV, L90LM	10	16/04/2009
P44*								M41L, D67N, M184V, T215Y								Ninguna												I84IV, L90M		09/02/2010
P45								D67N, T69D, T215V, K219Q								V108I												V32I, I47V, I54M, L90M	44	20/01/10
P45*								M41L, D67E, V75IM, M184V, L210W, T215Y								A98G, K101E, V179D, Y181C, G190A												M46I, I54V, V82A		25/09/2013
P47								L74V, Y115F, M184V								K103N, G190A, V179E												M46L, I84V	ND	08/06/2010
P47*								ND								ND												Ninguna	ND	ND

MDR, mutaciones de resistencia; ITIAN, inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos; ITINAN, inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleósidos; IP, inhibidores de la proteasa; t, tiempo; sec, secuencias. AZT, zidovudina; ddI, didanosina; d4T, estavudina; 3TC, lamivudina; ABC, abacavir; TDF, tenofovir; FTC, emtricitabina; NVP, nevirapina; EFV, efavirenz; ETV, etravirina; RPV, rilpivirina; SQV, saquinavir; IDV, indinavir; NFV, nelfinavir; LPV, lopinavir; ATV, atazanavir; FPV, fosamprenavir; TPV, tipranavir; DRV, darunavir. La numeración de los pacientes se ha establecido de acuerdo a la numeración dada en la **Figura 1.2**, siguiendo el mismo código de colores: verde, susceptible; azul, nivel bajo de resistencia; amarillo, nivel intermedio de resistencia; rojo, alto nivel de resistencia; gris, dato no disponible por ausencia de secuencia y/o perfil de resistencia; ND, datos no disponibles.

DISCUSIÓN

En este capítulo se describen y analiza las características clínicas y epidemiológicas, de los niños y adolescentes infectados por VIH-1 de la Cohorte pediátrica de Madrid que habían sido infectados por cepas de virus que presentaban MDR-TC durante 2000-2011, con datos clínicos asociados hasta diciembre de 2013. Este estudio reveló que, hasta diciembre de 2013, cerca de 1 de cada 4 niños y adolescentes infectados por VIH-1 de la Cohorte de Madrid estuvo infectado por virus con MDR-TC y había sido expuesto a las tres familias principales de ARV. La mayoría de ellos habían recibido terapias subóptimas o dosis de fármacos inadecuadas, al igual que se ha reportado en otras cohortes de estudio (Riordan et al., 2009). La prevalencia de MDR-TC encontrada (24,4%) fue superior a las reportadas en otras cohortes pediátricas, tanto a nivel mundial (exceptuando Brasil) (Rojas & Holguín, 2014), como europeas (Castro et al., 2011), que oscilaron entre 14,1% y 3,3%. El porcentaje mayor de niños y adolescentes que presentaban virus con MDR-TC se encontró durante el periodo 2000-2004, probablemente debido al elevado número de diagnósticos pediátricos por VIH-1 durante este periodo y al reducido número de fármacos ARV aprobados para el uso terapéutico en niños, en comparación con los fármacos disponibles en los últimos años (Castro et al., 2011; Miller et al., 2001; Hammer et al., 2002). La mayoría de estos pacientes pediátricos habían sido tratados con monoterapia o biterapia, lo que pudo conducir al fracaso terapéutico debido a la incompleta supresión viral y a la reducida eficacia de los TAR después de la selección de MDR (Ammaranod et al., 2012). Con los nuevos ARV aprobados para uso pediátrico tales como enfuvirtida (inhibidor de la fusión, aprobado en 2003) ATV, FPV, TPV, DRV (aprobados en 2004), MRV (*off-label*) y RAL (aprobado en 2013) se pudo observar una reducción de los niños que presentaban virus con MDR-TC.

Nuestro estudio desveló que las MDR pueden revertir si se emplean nuevos regímenes ARV potentes en niños infectados previamente por virus con MDR-TC, mejorando la susceptibilidad de los mismos. No obstante, y debido a que las MDR pueden quedar almacenadas en el ADN proviral manteniendo niveles indetectables de virus resistentes en plasma (Dahl et al., 2009), no podemos excluir la posibilidad de que dichos virus portadores de MDR-TC puedan persistir a niveles indetectables y reaparecer si la supresión viral no es completa, volviendo a aparecer MDR-TC en nuevas secuencias virales, incluso después de su reversión previa. Todos los 48 pacientes que presentaron MDR-TC habían recibido TAR y ninguno era *naive* en el momento de la aparición de MDR-TC. Así, el 72,9% de la población de estudio había recibido de 3 a 12 TAR diferente cuando la MDR-TC apareció. Todos los 48 pacientes presentaron una buena situación inmunológica y clínica en la última visita clínica; el 65,9% de los pacientes presentaron un recuento de linfocitos T CD4 \geq a 500 céls/mm³ y

en el 58,3% de los niños se detectó supresión viral. Cabe destacar que, en comparación con los 534 pacientes de la Cohorte pediátrica completa a diciembre de 2013, nuestra Cohorte de estudio con 48 pacientes con MDR-TC presentó un menor número de niños con recuento de linfocitos de T CD4 ≥ 500 céls/mm³ (65,9% vs. 81,3%), un menor número de niños con viremia indetectable con ≤ 50 cop./ml (58,3% vs. 82,6%) y un mayor número de niños expuestos a un mayor número de regímenes ARV diferentes [media de 4,3 (rango 1-12) vs. 4 (rango 2,5-7)].

Las MDR más frecuentes en nuestra Cohorte de estudio asociadas a ITIAN fueron T215YFVI, D67N, M41L y L210W. De hecho, la sustitución T215Y causa resistencia intermedia a AZT y es un marcador de inmunodeficiencia en pacientes infectados por VIH-1 en la década de los años 90 (Lohse et al., 2007; de Mulder et al., 2012a; Novitsky et al., 2007). La mutación M41L causa resistencia a AZT y d4T. La sustitución K103N fue la más predominante a los fármacos de la familia de los ITINAN, presentando un efecto bajo o nulo en la capacidad replicativa del virus (Saravanan et al., 2012). La sustitución K103N es una mutación no polimórfica, seleccionada en esos pacientes que han sido tratados previamente con NVP o EFV (Bachelier et al., 2000), fármacos aprobados en España en 1998 y 1999 respectivamente. Las sustituciones L90M, M46I y V82A fueron las más prevalentes, asociadas a IP. La mutación L90M reduce la susceptibilidad a la mayoría de los IP exceptuando TPV y DRV. Las sustituciones V82AC se encuentran asociadas con mutaciones en la posición 46 y 48 de la PR (Lohse et al., 2007) y relacionadas con la resistencia a RTV e IDV (Lohse et al., 2007). En nuestro estudio, a pesar de que algunos niños recuperaron la susceptibilidad a fármacos como EFV y NVP, no podemos excluir la posibilidad de que las variantes resistentes del virus se encuentren a niveles indetectables por técnicas de secuenciación estándar, siendo seleccionadas nuevamente si estos niños vuelven a ser expuestos a EFV y NVP y seleccionando resistencias de nuevo.

El fracaso virológico es frecuente en niños que se encuentran bajo TAR, como resultado de cambios de terapias y una gran experiencia a diferentes fármacos (más que en población adulta infectada por VIH-1) (de Mulder et al., 2012b). Un mayor porcentaje (80%) de estos niños con MDR-TC, habían sido expuestos a fármacos *off-label* durante su seguimiento clínico, en comparación con el total de la Cohorte pediátrica (69%) (Fernandez-Cooke et al., 2016). Esto es debido al retraso que existe entre el desarrollo y la implementación de los ARV, lo que contribuye a aumentar el riesgo de administrar una dosis inadecuada, que tiene como consecuencia la selección de MDR. A pesar de la selección de MDR-TC en nuestra Cohorte pediátrica, algunas drogas mantuvieron susceptibilidad (con porcentajes mayores al 30%), perteneciendo siendo ARV nuevos de la familia de los IP (TPV y DRV) y a la familia

de los ITINAN (ETV y RPV). Esperamos que estos resultados puedan ayudar a mejorar el manejo clínico de la población pediátrica infectada por VIH-1 con MDR-TC en España, ayudando así al desarrollo de nuevas opciones terapéuticas y diferentes combinaciones de fármacos personalizadas. No obstante, para ello es fundamental continuar el buen seguimiento clínico y virológico de esta Cohorte y la completa monitorización del VIH-1 como se está haciendo en la actualidad.

Los resultados del trabajo descrito en este capítulo fueron publicados como artículo de investigación, incluido en el **Anexo III**: Rojas Sánchez P, de Mulder M, Fernandez-Cooke E, et al. (2015) Clinical and virological follow-up in perinatally HIV-1infected children and adolescents in Madrid with triple-class antiretroviral drug resistant viruses. *Clin Microbiol Infect*; 21:605.e1-9.

CAPÍTULO 2

**EFFECTO DE LA EXPERIENCIA A LOPINAVIR/RITONAVIR EN NIÑOS Y
ADOLESCENTES INFECTADOS POR VIH-1 EN MADRID DURANTE EL
PERIODO 2000-2014**

ANTECEDENTES

El uso de LPV/r ha sido aceptado como profilaxis post-parto en niños (Penazzato et al., 2015) y fue aprobado en el año 2001 por la EMA (**Anexo I**) para niños menores de 2 años de edad, y por la administración de los fármacos y alimentos de E.E.U.U (*Food and Drug Administration*, FDA) (**Anexo I**) en el año 2000 para niños mayores de 14 días de edad (Abbott, 2010). En 2013, LPV/r era el régimen de primera línea preferido, incluso por delante del NVP, (Cvetkovi et al., 2003; Penazzato et al., 2014), a pesar de tener un sabor desagradable que puede comprometer la adherencia al tratamiento con LPV/r. No obstante, a pesar de estas recomendaciones, más de la mitad (370.00 de 661.550) de la población pediátrica a nivel mundial recibió tratamiento de primera línea con NVP (WHO, 2016b). El objetivo principal de este segundo capítulo consistió en describir las características clínicas-epidemiológicas basales de la población pediátrica así como los cambios inmunoviroológicos (incluyendo resistencias, CV y linfocitos TCD4) antes y durante la experiencia a LVP/r. Con tal fin, se analizó el efecto de LPV/r como parte de regímenes de diferente líneas de TARGA durante 15 años (2000-2014) en los niños y adolescentes infectados por VIH-1 de la Cohorte de Madrid, que representaba el 36% de la población pediátrica infectada por VIH-1 en España hasta diciembre de 2014, fecha fin de este estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

Se seleccionaron los pacientes de la Cohorte de niños y adolescentes infectados por VIH-1 de Madrid que habían sido expuestos a LPV/r en diferentes líneas de terapia durante el periodo 2000-2014. Se recopiló toda la información epidemiológica (vía de transmisión del VIH-1, origen, año de diagnóstico, edad media al diagnóstico), clínica (seguimiento clínico en unidades pediátricas o de adultos, primer TAR en uso y familias de fármacos a las que se ha expuesto, número y porcentaje de linfocitos T CD4 y T CD8 y coinfecciones) y virológica (CV, subtipo del VIH-1 y MDR) en el momento basal, es decir, antes de la exposición a LPV/r. Se estudiaron los cambios en la viremias, así como el recuento de linfocitos T CD4 y T CD8 y las MDR, comparando el momento basal y la última determinación durante la experiencia a LPV/r, hasta diciembre de 2014. Se identificaron también los pacientes que habían sido tratados con LPV/r cuando estaba prescrito como fármaco *off-label* es decir, antes de su aprobación para su uso pediátrico en España (año 2000 por la FDA y año 2001 por la EMA).

Identificación genotípica de la resistencia a fármacos ARV

Para el análisis de MDR se seleccionaron los pacientes de acuerdo a la disponibilidad de secuencia parcial del gen *pol*, perfiles de resistencia genotípico o muestras disponibles hasta el año 2011. La mayoría de las secuencias habían sido previamente publicadas (de Mulder et al., 2011). Para este estudio, emplearon 2 nuevas muestras de plasmas cedidas por el BioBanco del VIH integrado en la RIS (**Anexo I**) (García Merino et al., 2010), se obtuvieron dos nuevas secuencias parciales del gen *pol* 1.121 pb) del VIH-1. Éstas incluían la región codificante de la PR completa (297 pb) y una región parcial de la TI. La extracción, amplificación y secuenciación del ARN viral de esas dos nuevas muestras se realizó como se ha descrito previamente en nuestro laboratorio (de Mulder et al., 2011) y previamente descrita en los Métodos del capítulo anterior de esta Tesis. Los padres o tutores legales de todos los pacientes que participaron en este estudio dieron su consentimiento informado y los protocolos fueron aprobados por la institución del Comité Ético del Hospital Ramón y Cajal.

Las MDR, en población pediátrica infectada por VIH-1, se definieron de acuerdo con el listado estadounidense IAS-USA-2015 (**Anexo I**) y el resultado se expresó en porcentaje. Se predijo la susceptibilidad de los 19 fármacos ARV disponibles para uso en población pediátrica hasta el momento, utilizando para ello el algoritmo de *Stanford HIVdb* (**Anexo I**). Para este análisis, se empleó la última secuencia *pol* disponibles de la PR, en los pacientes que presentaban alguna MDR primaria. En base a la calificación que recibió cada MDR mediante el algoritmo de *Stanford HIVdb*, se establecieron cuatro categorías de susceptibilidad para cada fármaco: 1) Susceptible, 2) nivel bajo de resistencia, 3) nivel intermedio de resistencia y 4) nivel alto de resistencia.

Análisis estadístico

Para la comparación de las variables continuas se utilizó la prueba chi-cuadrado (χ^2). Se estableció el límite de significación en 0,05 para los valores de p (p -valor). La distribución de las variables se describió como mediana y RIQ. Los análisis univariantes y multivariantes para la identificación de los factores de riesgo para la aparición de MDR asociados a IP en la PR se llevaron a cabo utilizando el software Weka (Hall et al., 2009).

RESULTADOS

Experiencia a LPV/r en la población pediátrica

Un total de 199 (37,3%) de los 534 pacientes que conforman la Cohorte de Madrid de niños y adolescentes infectados por VIH-1) niños habían sido expuestos a LPV/r, durante el

periodo 2000-2014. Se recopilaron las características clínicas y epidemiológicas antes de la primera exposición a LPV/r (**Tabla 2.1**). La mayoría (81,9%) de los pacientes incluidos en el estudio habían nacido en España, el 67,8% se diagnosticó antes del año 2000 y un 96,5% se infectó perinatalmente con cepas del subtipo B del VIH-1. Tras el último seguimiento clínico, de los pacientes expuestos a LPV/r, se pudo observar que el 85,4% se encontraban en seguimiento clínico en unidades pediátricas o de adultos y que un porcentaje muy bajo estaban infectados con virus de hepatitis C (5%) o hepatitis B (2,5%). Además, los 199 pacientes de estudio tenían una edad media de 3,2 años cuando los pacientes se trataron por primera vez con mono o biterapia, mientras que la edad media de la población cuando se expuso a LPV/r por vez primera fue igual o superior a 9,4 años. La duración de la experiencia a este fármaco se prolongó durante un tiempo medio de 4,2 años en los pacientes pediátricos de estudio.

LPV/r se prescribió como TARGA en los 199 pacientes. Se establecieron 3 grupos diferentes, según LPV/r se incluyera como tratamiento de primera línea o en sucesivas líneas de rescate. El Grupo 1 (TARGA con LPV/r incluido en tratamientos de primera línea) formado por el 16,6% de los pacientes. El Grupo 2 (TARGA con LPV/r en tratamientos de segunda línea) representado por el 18,6% y el Grupo 3 (TARGA con LPV/r en tratamientos de tercera línea o superiores) formado por el 63,3% de la población pediátrica infectada por VIH-1. La línea de rescate en la que se había incluido LPV/r se desconocía en el 1,5% de los pacientes. El tiempo medio de exposición a LPV/r fue mayor en los pacientes incluidos en el Grupo 3 (media de 4,8 años de exposición a LPV/r) en comparación con los pacientes del Grupo 2 (media de 3,5 años de exposición a LPV/r) o Grupo 1 (media de 3,1 años de exposición a LPV/r). Se identificaron 64 pacientes con MDR que mostraron un mayor tiempo de exposición a LPV/r (media de 5,8 años) que el resto de los grupos previamente descritos. Entre esos 64 pacientes, 8 pertenecían al Grupo 1, 10 pacientes al Grupo 2 y 46 pacientes al Grupo 3.

Tabla 2.1. Características basales de los 199 niños y adolescentes con experiencia a LPV/r de la Cohorte de Madrid durante el periodo 2000-2014.

Características	Nº pacientes con experiencia a LPV/r (2000-2014)	LPV/r en TAR de 1º línea Grupo 1	LPV/r en TAR de 2º línea Grupo 2	LPV/r en TAR de ≥ 3º línea Grupo 3	Con datos de MDR
Uso de LPV/r ^a	199	33	37	126	64
Mujeres	108	15	21	72	34
Riesgo					
Perinatal	192	29	37	123	63
Transfusión	6	3	0	3	1
Desconocido	1	1	0	0	0
Origen					
España	163	19	27	117	57
Resto de Europa	2	0	1	1	0
África	20	13	3	3	5
Norteamérica	1	0	0	0	0
Latinoamérica	13	1	6	5	2
Periodo de diagnostico de VIH-1					
1980-1989	16	0	0	16	8
1990-1999	119	0	16	102	39
2000-2013	64	33	21	8	17
Edad media al diagnóstico (meses)	24,2 Rango:0-144,9 RIQ [2,9-36]	31,9 Rango:0-136,2 RIQ [2,3-48,8]	35,1 Rango:0-144,5 RIQ [2,2-59,1]	19,4 Rango :0-144,5 RIQ [3,1-27,1]	26,7 Rango: 0-303 RIQ [2,9-30,5]
Variantes VIH-1					
Subtipo B	130	13	17	99	56
Formas no-B	18	11	3	4	7
A1	1	1	0	0	0
A2	1	0	0	1	0
C	3	2	0	1	2
F1	1	1	0	0	0
G	1	0	1	0	0
CRF02_AG	9	6	2	1	5
CRF08_BC	2	1	0	1	0
Desconocidos	51	9	17	23	10
Seguimiento Clínico					
Unidades pediátricas	90	26	21	41	31
Unidades de adultos	80	0	8	72	24
Pérdida de seguimiento	26	7	8	10	7
Fallecidos	3	0	0	3	2
Coinfecciones					
VHC	10	0	1	9	3
VHB	5	2	0	3	1

Características	Nº pacientes con experiencia a LPV/r (2000-2014)	LPV/r en TAR de 1º línea Grupo 1	LPV/r en TAR de 2º línea Grupo 2	LPV/r en TAR de ≥ 3º línea Grupo 3	Con datos de MDR
Edad media al 1º TAR (meses)	38,8 Rango: 0-166,4 RIQ [6,7-59,9]	35,2 Rango: 0,9-137,7 RIQ [3,3-50,6]	42,5 Rango: 0,5 -166,5 RIQ [6,2-79,5]	40,1 Rango: 0-300,5 RIQ [7,9-59,4]	41,28 Rango: 0,9-172 RIQ[6,6-6,2]
Primer TAR					
Monoterapia	67	0	0	67	24
Biterapia	43	0	3	40	16
TARGA	86	33	34	19	24
Desconocido	3	0	0	0	0
TAR incluyendo LPV/r					
ITIAN+IP	143	32	32	79	44
ITINAN+IP	3	1	0	2	20
ITIAN+ITINAN+IP	48	0	5	43	0
ITIAN+IP+IC	1	0	0	1	0
Desconocido	4	0	0	0	0
Primera experiencia a LPV/r					
Edad media (meses)	113 Rango: 0,9-232 RIQ [60,4-162]	35,2 Rango: 0,9-137,7 RIQ [3,3-50,1]	101,8 Rango: 2,6 193,7 RIQ [49,5-163,1]	136,8 Rango: 10,8-232 RIQ [107,6 178,8]	104,5 Rango: 0,9-207,5 RIQ [54,05-152,7]
Uso de LPV/r en 2000-2007 ^b	164	18	28	118	59
Uso de LPV/r en 2008-2014 ^{a,b}	35	15	9	8	5
Tiempo medio de exposición a LPV/r (meses)	50,9 Rango: 0,1-106,5 RIQ [19,2-80,5]	37,3 Rango: 0,9-106,5 RIQ [14,7-56,4]	41,9 Rango: 0,1-138,7 RIQ [13,8-64,7]	57,5 Rango: 0,1-151 RIQ [26,6-87,8]	70,3 Rango: 0,06-180 RIQ [28,5-97,5]
Con datos de MDR	64	8	10	46	64
LPV/r como <i>off-label</i>	31	14	4	13	7

LPV/r, lopinavir/ritonavir; TAR, tratamiento antirretroviral, MDR, mutaciones de resistencia; VHC, virus de la hepatitis C; VHB, virus de la hepatitis B; TARGA, Tratamiento antirretroviral de gran actividad; ITIAN, inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleós(t)idos; IP, inhibidores de la proteasa ITINAN, inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleós(t)idos; IC, inhibidor del correceptor; RIQ, rango intercuartílico.

^aUso desconocido de LPV/r en 3 pacientes. ^bAño en el que se usó LPV/r por primera vez en la Cohorte de estudio (número de pacientes): 2000 (5), 2001 (32), 2002 (21), 2003 (23), 2004 (13), 2005 (20), 2006 (11), 2007 (39), 2008 (14), 2009 (5), 2010 (6), 2011 (2), 2012 (6), 2013 (2), 2014 (0).

Se observó que el uso de LPV/r, en los pacientes, decreció a lo largo del tiempo ya que el 82,4% de la población había sido expuesto a LPV/r durante los años 2000-2007 y el 17,6% durante los años 2008-2014 (**Tabla 2.1**). No obstante, LPV/r fue prescrito con mayor

frecuencia como parte del primer TARGA durante el periodo 2008-2014 que durante el periodo 2000-207 (11% vs. 42,5%). Además, el uso de LPV/r como fármaco *off-label* fue frecuente (15,6%) en nuestra Cohorte de estudio, tal y como se describió su uso en la Cohorte completa (Fernández Cooke et al., 2016)

Reducción de la CV después de la exposición a LPV/r

En la **Tabla 2.2** de este capítulo se muestran los valores para los parámetros clínicos (CV, linfocitos T CD4 y T CD8) disponibles en 181 (90,9%) pacientes antes de haber sido expuestos a LPV/r y en 195 (97,5%) pacientes durante la exposición a dicho fármaco. Se recopilaron un total de 3.117 determinaciones de CV antes de la primera experiencia a LPV/r (con un rango de 1-48 determinaciones por paciente) (**Tabla 2.3**).

Tabla 2.2. Estado virológico e inmunológico de la población de estudio con datos disponibles antes y después de la experiencia a LPV/r.

	Valores medios	A niveles basales (Antes de 1º experiencia a LPV/r)	Durante experiencia a LPV/r (Último dato clínico)	Δ	p-valor
Grupo 1	CV (log)	5,8 RIQ [4,9-5,7] ^a	4,7 RIQ [2,2-3,7] ^b	-1,1	0,03
	T CD4 (cél/mm³)	1280,1 RIQ [265-1906,2] ^b	1258,5 RIQ[860,5-1692,7] ^c	-21,6	ND
	% T CD4	23,2 RIQ [9-34] ^b	31,4 RIQ [24,4-38,3] ^d	+8,2	0,03
	% T CD8	33,7 RIQ [25,9-38,4] ^b	37,8 RIQ [37,8-46] ^e	+4,1	0,03
Grupo 2	CV (log)	4,7 RIQ [2,5-4,7] ^f	3,8 RIQ [1,7- 3,4] ^g	-0,9	0,02
	T CD4 (cél/mm³)	1220,1 RIQ[604,5-1621,5] ^f	928,8 RIQ [647,8-1194,1] ^b	-291,3	ND
	% T CD4	28,9 RIQ [20,2-37,7] ^f	33 RIQ [25,5-39,4] ^h	+4,1	ND
	% T CD8	38,4 RIQ [30,1-45,9] ^f	40,8 RIQ [27-49] ⁱ	+2,4	ND
Grupo 3	CV (log)	4,7 RIQ [2,6-4,6] ^j	4,5 RIQ [2-3,8] ^k	-0,2	ND
	T CD4 (cél/mm³)	733,8 RIQ [426,5-952] ^l	790,7RIQ [551,7-1000,8] ^m	+56,9	ND
	% T CD4	26,3 RIQ [18,1-35] ⁿ	30 RIQ [23,9-36,65] ^o	+3,7	0,005
	% T CD8	43,4 RIQ [34,9-51,1] ⁿ	45,5 RIQ [34,5-55,2] ^p	+2,1	ND
Total	CV (log)	5,2 RIQ [2,7-4,8] ^q	4,5 RIQ [1,9-3,7] ^r	-0,7	0,009
	T CD4 (cél/mm³)	898,5 RIQ [438,7-1121,5] ^s	910,8 RIQ [608,1-1186,6] ^t	+12,3	ND
	% T CD4	26,4 RIQ [17-35] ^u	30,7 RIQ [23,99-37,59] ^v	+4,3	0,0001
	% T CD8	40,8 RIQ [32,5-48] ^w	43,7 RIQ [32-53,7] ^x	+2,9	0,05
Con datos de MDR	CV (log)	5,3 RIQ [3,7-5,1] ^y	4,7 RIQ [2,5-4,7] ^z	-0,6	ND
	T CD4 (cél/mm³)	888,1 RIQ[398-1118] ^Ω	782,7 RIQ [271-1033,5] ^α	-105,4	ND
	% T CD4	26,5 RIQ [18-34,6] ^μ	25,4 RIQ [17,2-34,4] ^Φ	-1,1	ND
	% T CD8	42,6 RIQ [30,75-53,1] ^π	47,2 RIQ [34,6-61] ^α	+4,6	ND

Niveles basales, última información disponible antes de experiencia a LPV/r. LPV/r, lopinavir/ritonavir; Δ , diferencia entre los valores disponibles antes y después de la experiencia a LPV/r, RIQ, rango intercuartilico; CV, carga viral; ND, dato no disponible. Los valores disponibles de los niños y adolescentes infectados por VIH-1 para calcular los valores medios de los parámetros clínicos fueron: 28^a, 32^b, 20^c, 26^d, 21^e, 36^f, 35^g, 34^h, 29ⁱ, 118^j, 125^k, 123^l, 107^m, 126ⁿ, 119^o, 114^p, 181^q, 194^r, 190^s, 159^t, 192^u, 178^v, 191^w, 161^x, 59^y, 65^z, 49^Ω, 51^α, 57^μ, 54^Φ, 52^π.

Tal y como cabría esperar, y debido a la usencia de previos TARGA en los pacientes incluidos en el Grupo 1, se pudo observar que estos niños y adolescentes presentaban unos valores medios basales más elevados de CV plasmática (media de CV = 5,8 log), que los pacientes incluidos en el Grupo 2 y Grupo 3 (media de CV = 4,7 log en cada grupo). Además, se observó una disminución significativa (p -valor < 0,05) de la replicación viral en los pacientes incluidos en el Grupo 1 y Grupo 2, cuando se compararon los valores de CV antes de la experiencia a LPV/r y en la última determinación (tras el tratamiento con LPV/r), presentando una reducción media de 1,1 log y 0,9 log de CV plasmática en cada grupo, respectivamente. Los pacientes incluidos en el Grupo 3 no mostraron una reducción significativa de su replicación viral cuando se compararon estos dos momentos, aunque sí se observó una reducción media de 0,2 log en la CV plasmática (**Tabla 2.2**).

En la **Tabla 2.3** se muestra el porcentaje de pacientes incluidos en la población de estudio que consiguieron CV indetectable durante la exposición a LPV/r. Se observó que 46 (25,5%) de los 180 pacientes con valores basales de CV presentaron viremia indetectable (considerando CV < 500 cop./ml), siendo un 26,1% de los pacientes del Grupo 2 y un 73,9% del Grupo 3. No obstante, cerca del 70% de los 194 pacientes con datos disponibles consiguieron CV indetectables en la última determinación disponibles. En más detalle, se pudo observar que el 87,5% de los pacientes del Grupo 1, el 70,3% de los pacientes del Grupo 2 y el 64,8% de los pacientes del Grupo 3, consiguieron supresión viral.

Cambios en el número de linfocitos después de la experiencia a LPV/r

Se recuperaron los valores de linfocitos T CD4 para 159 (79,9%) pacientes antes de haber sido tratados con LPV/r y para 192 (96,5%) niños y adolescentes tras presentar experiencia a LPV/r. Cuando se compararon dichos valores, se pudo observar un incremento significativo de linfocitos T CD4 y T CD8, con una ganancia media de 4,3 y de 2,9%, respectivamente. Los porcentajes para dichos parámetros clínicos observados en los diferentes grupos fueron superiores en los pacientes incluidos en el Grupo 1 que presentaron el mayor recuento de linfocitos TCD 4 y los valores más bajos de porcentajes de T CD4 y T CD8 (**Tabla 2.2**). Los porcentajes de linfocitos T CD4 sólo se incrementaron de manera significativa (p -valor < 0,05) en los pacientes del Grupo 1 y Grupo 3.

Tabla 2.3. Cargas virales indetectables conseguidas durante el uso de LPV/r en la población pediátrica de estudio.

	Total ^a	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Con datos de MDR
Pacientes con datos disponibles	194 (97,5%)	32 (97%)	37 (100%)	125 (99,2%)	64 (100%)
Tiempo medio de experiencia a LPV/r (meses)	50,9	37,3	41,9	57,5	70,3
Nº total de determinaciones de CV	3.117 Rango: 1-48	438 Rango: 1-43	572 Rango: 1-40	2.107 Rango: 1-48	1.269 Rango: 1-45
Tiempo medio entre la primera y última determinación de CV (meses)	54,9	44,8	56,7	56,9	64,9
Nº de pacientes con CV basales CV indetectable a niveles basales	180	28	34	118	60
<50	26	0	6	20	4
<200	33	0	8	25	4
<500	46	0	12	34	5
Nº de pacientes con determinaciones CV después de la experiencia a LPV/r CV indetectables en la última visita clínica	194	32	37	125	64
<50	97	22	17	58	30
<200	118	25	24	69	34
<500	135	28	26	81	38
CV indetectable en la última visita clínica^b					
<50	1.739 (55,8%)	280 (63,9%)	409 (71,5%)	1.050 (49,8%)	556 (43,8%)
<200	1.822 (58,4%)	286 (65,3%)	421 (73,6%)	1.115 (52,9%)	564 (44,4%)
<500	2.054 (65,9%)	287 (65,5%)	440 (76,9%)	1.327 (63%)	673 (53%)
Nº medio de determinaciones de CV indetectables por paciente^c	Media 15 Rango: 0-48 59,6% RIQ [22-92,3]	Media 9 Rango: 0-40 49,5% RIQ [9,4-83,7]	Media 12 Rango: 0-37 68,3% RIQ [50-91,7]	Media 11 Rango: 0-29 56,9% RIQ [24,9-87,9]	Media 10,7 Rango: 0-38 44% RIQ [0-81,1]

LPV/r, lopinavir/ritonavir; CV, carga viral.^a Datos no disponibles en 5 pacientes: 1 en Grupo 1, 1 en Grupo 2 y 3 no incluidos en ningún grupo por falta de información relativa a la experiencia de LPV/r. ^b Se consideran como CV indetectable los valores <50, <200 y <500 copias/ml de ARN de VIH-1 en plasma según la técnica comercial utilizada para la cuantificación de VIH-1 durante el procesado de la muestra. ^c Se consideran como CV indetectable aquellos valores <500 cop./ml. RIQ, rango intercuartílico

MDR y susceptibilidad a LPV/r

Se recuperó la información relacionada con mutaciones de resistencia en 64 pacientes, tanto en la PR (n=64) y en la TI (n=48) durante la experiencia a LPV/r (**Tabla 2.4**). Adicionalmente, se disponía de datos de MDR para 35 pacientes antes de la experiencia al fármaco de estudio (**Tabla 2.5**). Entre los pacientes expuestos a LPV/r, 27 (42,3%) presentaron alguna MDR a IP en la PR, 28 (58,3%) a ITIAN y 21 (43,7%) a ITINAN en la TI (Tabla 2.4). Los pacientes incluidos en el Grupo 3 mostraron las tasas más elevadas de MDR a IP (52,2%) a ITIAN (62,5%) y a ITINAN (46,9%).

Las MDR más comunes observadas en los virus, y asociadas a los fármacos de la familia de los IP fueron D30N, M46IL, I54V, V82A y L90M en la PR. La sustitución D30N se observó con mayor frecuencia en los virus de los pacientes incluidos en el Grupo 2 y las mutaciones M46IL I54V, V82ASTC y L90M en los virus que infectaban a los niños incluidos en el Grupo 3 (**Figura 2.1A**).

Entre los 27 niños con virus portadores de MDR en la PR, el fármaco NFV (IP) fue el fármaco más afectado, ya que presentó una susceptibilidad muy reducida debido a la presencia de los cambios D30N y L90M. No obstante, DRV/r y TPV/r fueron los fármacos que presentaron una mayor susceptibilidad (**Figura 2.1D, Tabla 2.4**) debido a la baja tasa de cambios en las posiciones I47V, I50V, I54ML, Q58E, T74P, L76V, V82LT, N83D e I84V en la PR viral (**Figura 2.1A**). Por tanto, y tal y como cabría esperar, los virus con un número más bajo de MDR asociados a IP presentaron una mayor susceptibilidad predicha a los fármacos de dicha familia según *Stanford HIVdb*. No obstante, y a pesar de la usencia de virus con MDR en los pacientes del Grupo 1, tres pacientes mostraron un bajo nivel susceptibilidad a NFV y un niño a TPV/r (**Tabla 2.4**).

Tabla 2.4. Presencia de MDR y susceptibilidad a fármacos en virus de niños expuestos a LPV/r con datos de resistencia.

Pacientes	Primera experiencia a LPV/r	Pacientes con datos en la PR ^a	Pacientes con MDR <i>mayor</i> en la PR Media MDR [RIQ]	Susceptibilidad predicha a IP												
				ATV/r	DRV/r	FPV/r	IDV/r	LPV/r	NFV	SQV/r	TPV/r					
Grupo 1 (n=33)	Como 1º TARGA	8 (24,2%)	0 (0%)	100%	100%	100%	100%	100%	62,5%	100%	87,5%					
Grupo 2 (n=37)	Como 2º TARGA	10 (27%)	3 (30%) 2 [1-2,5]	80%	90%	80%	80%	90%	40%	90%	90%					
Grupo 3 (n=126)	Como ≥3º TARGA	46 (36,5%)	24 (52,2%) 2,7 [1-4]	56,5%	78,3%	50%	52,2%	58,7%	45,6%	60,9%	67,4%					
Todos (n=196) ^b	Cualquiera TARGA	64 (32,2%)	27 (42,3%) 2,6 [1-4]	65,6%	82,8%	60,9%	62,5%	68,7%	46,8%	70,3%	73,4%					
Pacientes	Primera experiencia a LPV/r	Pacientes con datos en la TI ^a	Pacientes con MDR en TI Media MDR [RIQ]	Susceptibilidad predicha												
				A ITIAN					A ITINAN							
Grupo 1 (n=33)	Como 1º TARGA	8 (24,2%)	4 (50%) 1,7 [1-3]	3 (37,5%) 2 [1-3]	50%	50%	75%	75%	50%	50%	62,5%	50%	62,5%	62,5%	62,5%	62,5%
Grupo 2 (n=37)	Como 2º TARGA	8 (24,2%)	4 (50%) 2,5 [1,5-3,5]	3 (37,5%) 1,3 [1-2]	62,5%	50%	75%	75%	50%	62,5%	62,5%	75%	75%	75%	75%	75%
Grupo 3 (n=126)	Como ≥3º TARGA	32 (25,4%)	20 (62,5%) 4,3 [3-6]	15 (46,9%) 2,3 [1-3]	43,7%	37,5%	40,6%	43,7%	37,5%	43,7%	46,8%	56,2%	65,6%	56,2%	65,6%	65,6%
Todos (n=196 ^b)	Cualquiera TARGA	48 (24,5%)	28 (58,3%) 3,7 [2-5,5]	21 (43,7%) 2,1 [1-2,5]	47,9%	41,7%	52,1%	54,2%	41,7%	47,9%	56,3%	62,5%	66,7%	62,5%	66,7%	66,7%

LPV/r, lopinavir/ritonavir; MDR, mutaciones de resistencia; PR, proteasa; RIQ, rango intercuartílico; IP, inhibidores de la proteasa; TI, transcriptasa inversa; ITIAN, inhibidores de la TI análogos de los nucleós(t)idos; ITINAN, inhibidores de la TI no análogos de los nucleós(t)idos. ATV, atazanavir; DRV, darunavir; FPV, fosamprenavir; IDV, indinavir; NFV, nelfinavir; SQV, saquinavir; TPV, tipranavir; /r, IP potenciado con ritonavir 3TC, lamivudina; ABC, abacavir; AZT, zidovudina; d4T, estavudina; ddI, didanosina; FTC, emtricitabina; TDF, tenofovir; EFV, efavirenz; ETV, etravirina; NVP, nevirapina; RPV, rilpivirina. ^a Datos de MDR disponibles; ^b Uso desconocido de LPV/r en 3 pacientes. Susceptibilidad a ARV predicha por *Stanford HIVdb (Anexo I)*.

Se observó una elevada resistencia a los fármacos FPV/r, IDV/r, LPV/r y SQV/r, en, aproximadamente, el 50% de los pacientes, a TPV/r en 22,2% y a ATV/r en 18,5% (**Figura 2.1D**). Entre esos 48 pacientes con secuencias del gen *pol* y/o perfiles de resistencia en la TI, se pudo observar que las sustituciones M184 y T215YF fueron las MDR más comunes asociadas ITIAN y las sustituciones K103N, Y181C y E138AGK asociadas a ITINAN (**Figura 2.1B y Figura 2.1C**). Entre los 28 pacientes con MDR relacionadas con ITIAN, los fármacos ARV más afectados fueron ABC, ddi, 3TC y FTC (**Figura 2.1D**). Entre esos 21 pacientes en los que se detectó virus con MDR a fármacos de la familia de los ITINAN, los ARV con una menor susceptibilidad fueron EFV y NVP en un 14,3% de ellos (**Figura 2.1D**).

En la **Tabla 2.5** se pudo observar las MDR a IP, en 35 niños, antes y durante el tratamiento con LPV/r, todos ellos con niveles elevados de viremia basal. Entre ellos, 11 niños estaban infectados por virus salvaje o wt tanto en la secuencia basal analizada, como en la secuencia disponible tras haber sido expuesto a LPV/r, durante un tiempo medio de 4,3 años. En 7 niños con virus wt, en la primera muestra secuenciada, las mutaciones a IP aparecieron tras una exposición media a LPV/r de 7,3 años y un tiempo medio entre toma de muestras secuenciadas de 5,7 años. Un total de 17 de los 35 pacientes mostraron virus resistentes a IP en la primera secuencia disponible, manteniéndose durante todo el seguimiento clínico en 10 de esos 17 niños. Cinco pacientes mantuvieron el mismo perfil de MDR a IP en ambas secuencias (basal y tras experiencia a LPV/r) durante un intervalo de 1,5 años y tras un tiempo medio de exposición a LPV/r de 3,7 años. En los 7 niños restantes se observó reversión a wt después de un tiempo medio de experiencia a LPV/r de 5,6 años. Los 35 niños con MDR mantuvieron viremia detectable en el momento de la muestra.

Tabla 2.5. MDR en 35 pacientes pediátricos infectados por VIH-1 con datos disponibles antes y después de tener experiencia a LPV/r.

Pacientes	Grupo	Fecha de secuenciación para estudio de MDR	t.medio entre sec (meses)	t.medio con experiencia a LPV/r (meses)	CV (log)	MDR a IP (IAS-2015)	
						MDR primarias	Nº de MDR minor
1	Grupo 1	06/04/2010	4,9	16,6	ND	Ninguna	1
1*		07/09/2010			ND	Ninguna	1
2	Grupo 1	10/03/2003	70,5	102,9	ND	Ninguna	1
2*		05/03/2009			ND	Ninguna	2
3	Grupo 2	29/05/2007	20,1	18	ND	Ninguna	0
3*		11/02/2009			ND	Ninguna	0
4	Grupo 3	15/04/2010	9,1	9,3	ND	Ninguna	3
4*		21/01/2011			ND	Ninguna	4
5	Grupo 3	01/02/2009	13,2	43,1	ND	Ninguna	2
5*		16/03/2010			ND	Ninguna	1

Pacientes	Grupo	Fecha de secuenciación para estudio de MDR	t.medio entre sec (meses)	t.medio con experiencia a LPV/r (meses)	CV (log)	MDR a IP (IAS-2015)	
						MDR primarias	Nº de MDR minor
6	Grupo 3	25/06/2007	23,8	31,6	ND	Ninguna	1
6*		01/07/2009			ND	Ninguna	3
7	Grupo 3	14/11/2005	40,3	89,1	ND	Ninguna	2
7*		16/04/2009			ND	Ninguna	2
8	Grupo 3	17/05/2001	46,9	42,5	4,8	Ninguna	3
8*		09/05/2005			3,8	Ninguna	ND
9	Grupo 3	10/05/2000	54,9	48,5	4,5	Ninguna	2
9*		05/01/2005			4,7	Ninguna	5
10	Grupo 3	18/05/1999	74,7	54,6	ND	Ninguna	0
10*		20/09/2005			ND	Ninguna	1
11	Grupo 3	05/06/2001	113,1	108,4	2,5	Ninguna	1
11*		10/01/2011			5,4	Ninguna	0
12	Grupo 3	10/12/2001	5,4	57,9	4,5	D30N	2
12*		28/05/2002			2,3	D30N	2
13	Grupo 3	21/12/2000	6,9	10,2	5	D30N	3
13*		25/07/2001			6	D30N	5
14	Grupo 3	04/10/2004	12,7	49,2	ND	D30N, L90M	5
14*		02/11/2005			ND	D30N, L90M	5
15	Grupo 3	25/10/2001	13,5	39,5	4,1	L90M	6
15*		18/12/2002			4,4	L90M	6
16	Grupo 3	25/01/2001	55,2	64,9	ND	M46I, I84V, L90M	2
16*		01/10/2005			ND	M46I, I84V, L90M	2
17	Grupo 3	01/12/2000	23,2	26,5	5,1	M46I, V77I, I84V, L90M	4
17*		20/11/2002			5,2	M46I, I47V, I54V, I84V, L90M	10
18	Grupo 3	03/11/2004	25,1	48,1	ND	M46I, L90M	6
18*		21/12/2006			ND	M46I, I54V, V82A, L90M	9
19	Grupo 3	16/11/2000	39,9	87,5	4,7	V32I, M46I, V82A, I84V, L90M	6
19*		05/04/2004			4,8	V32I, M46I, I54V, V82A, I84V, L90M	5
20	Grupo 3	09/05/2001	53,2	57	4,9	N88S	4
20*		14/11/2005			4,4	M46I, I54V, V82A	4
21	Grupo 2	14/08/2003	63,3	97,9	4,5	Ninguna	0
21*		29/12/2008			1,6	D30N	3
22	Grupo 3	25/04/2001	9,6	53,1	5,2	Ninguna	0
22*		15/02/2002			2,6	D30N	2

Pacientes	Grupo	Fecha de secuenciación para estudio de MDR	t.medio entre sec (meses)	t.medio con experiencia a LPV/r (meses)	CV (log)	MDR a IP (IAS-2015)	
						MDR primarias	Nº de MDR minor
23	Grupo 3	13/11/2000	45,4	84,9	4,7	Ninguna	5
23*		21/09/2004			4,1	M46I, V82A,I54V	8
24	Grupo 3	08/09/2000	57,7	57,3	4,9	Ninguna	2
24*		01/08/2005			5,2	I54V, V82A, L90M	8
25	Grupo 3	09/09/1996	80,9	90,8	4,6	Ninguna	2
25*		22/07/2003			3,4	D30N, M46I	ND
26	Grupo 3	17/04/2002	90,7	94,3	ND	Ninguna	2
26*		28/12/2009			ND	D30N, N88D	2
27	Grupo 3	10/11/1999	130,1	134,2	ND	Ninguna	0
27*		ND			ND	M46IM, L90LM	5
28	Grupo 3	24/02/2004	53,9	8,3	ND	D30N, N88D	3
28*		23/09/2008			ND	D30N	7
29	Grupo 1	17/09/2004	11,9	54,2	ND	V82AV	2
29*		01/01/2009			ND	Ninguna	4
30	Grupo 2	19/02/2003	5,7	129,7	ND	D30N, M46I	3
30*		14/08/2003			ND	Ninguna	3
31	Grupo 3	23/04/2001	8,4	0,63	4,3	D30N	4
31*		09/01/2002			4,8	Ninguna	2
32	Grupo 3	06/06/2005	16,8	14,5	ND	D30N	2
32*		10/11/2006			ND	Ninguna	0
33	Grupo 3	18/10/2000	30,9	128,2	3,8	M46I	3
33*		04/06/2003			2,1	Ninguna	1
34	Grupo 3	29/08/2001	46,7	65,9	ND	D30N, M46I	4
34*		14/08/2005			ND	Ninguna	1
35	Grupo 3	27/11/2000	50,4	74,9	ND	M46L, V82A, L90M	9
35*		10/03/2005			ND	Ninguna	ND

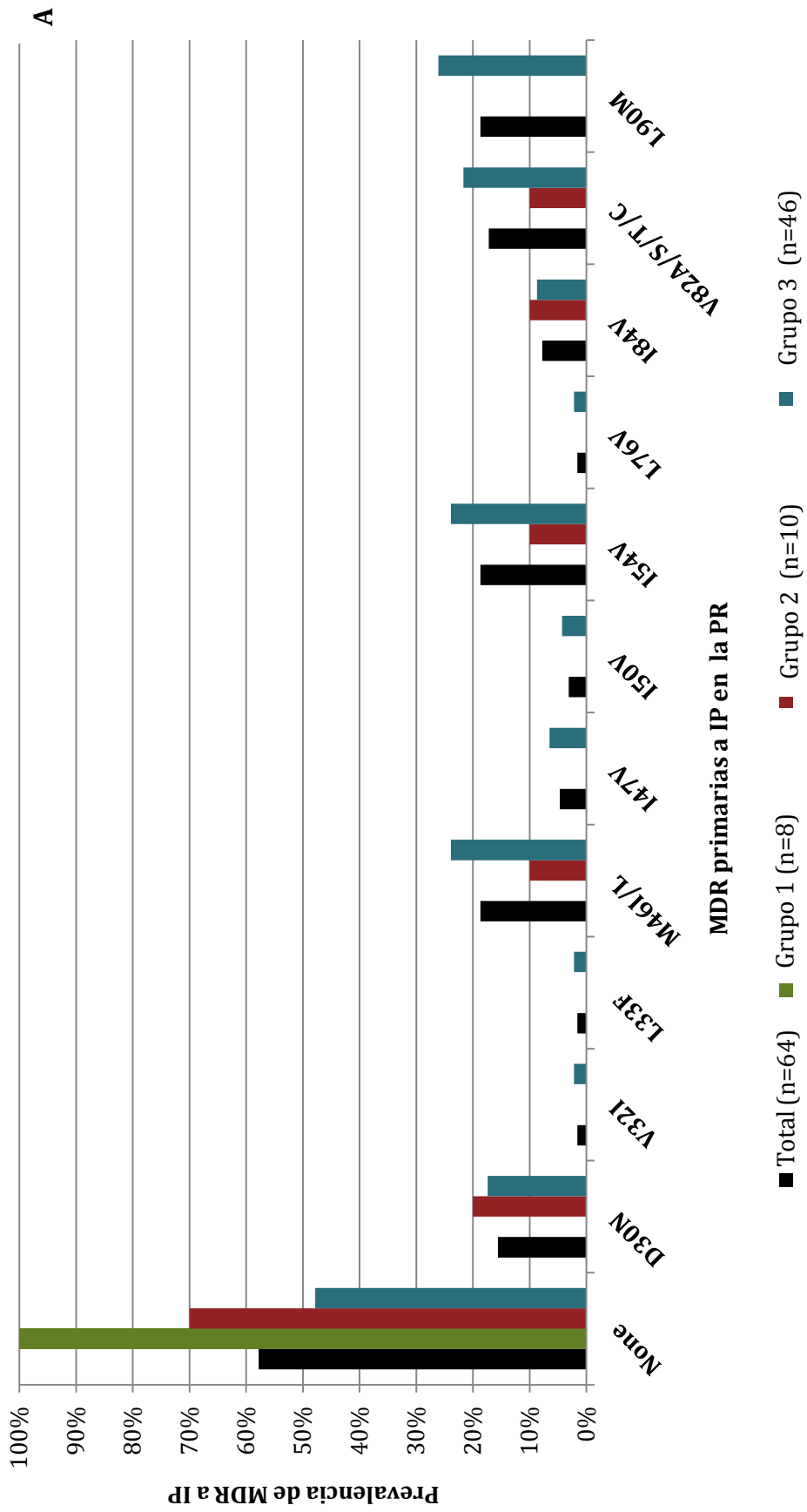
t, tiempo; sec, secuencia; LPV/r, lopinavir/ritonavir; CV, carga viral; MDR, mutaciones de resistencia; IP, inhibidor de la proteasa; ND, Datos no disponibles; PR, proteasa; TAR, tratamiento antirretroviral. Pacientes marcados sin asterisco hacen referencia a la secuencia basal en la PR antes de experiencia a LPV/r, pacientes marcados con asterisco indica que dicha secuencia o perfil de resistencia estaba disponible durante el TAR con LPV/r hasta diciembre de 2011.

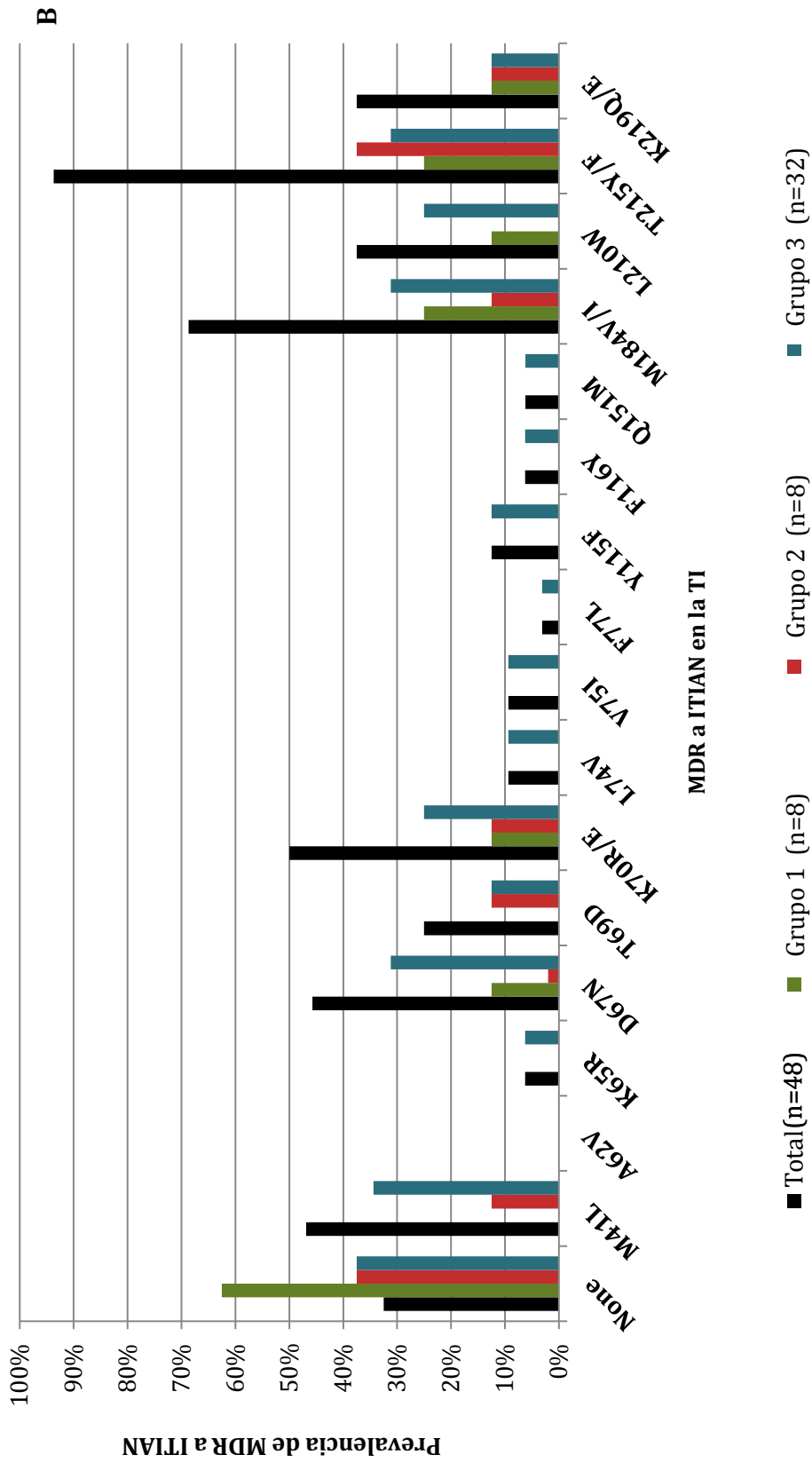
Tabla 2.6. Factores de riesgo para el desarrollo de MDR a IP.

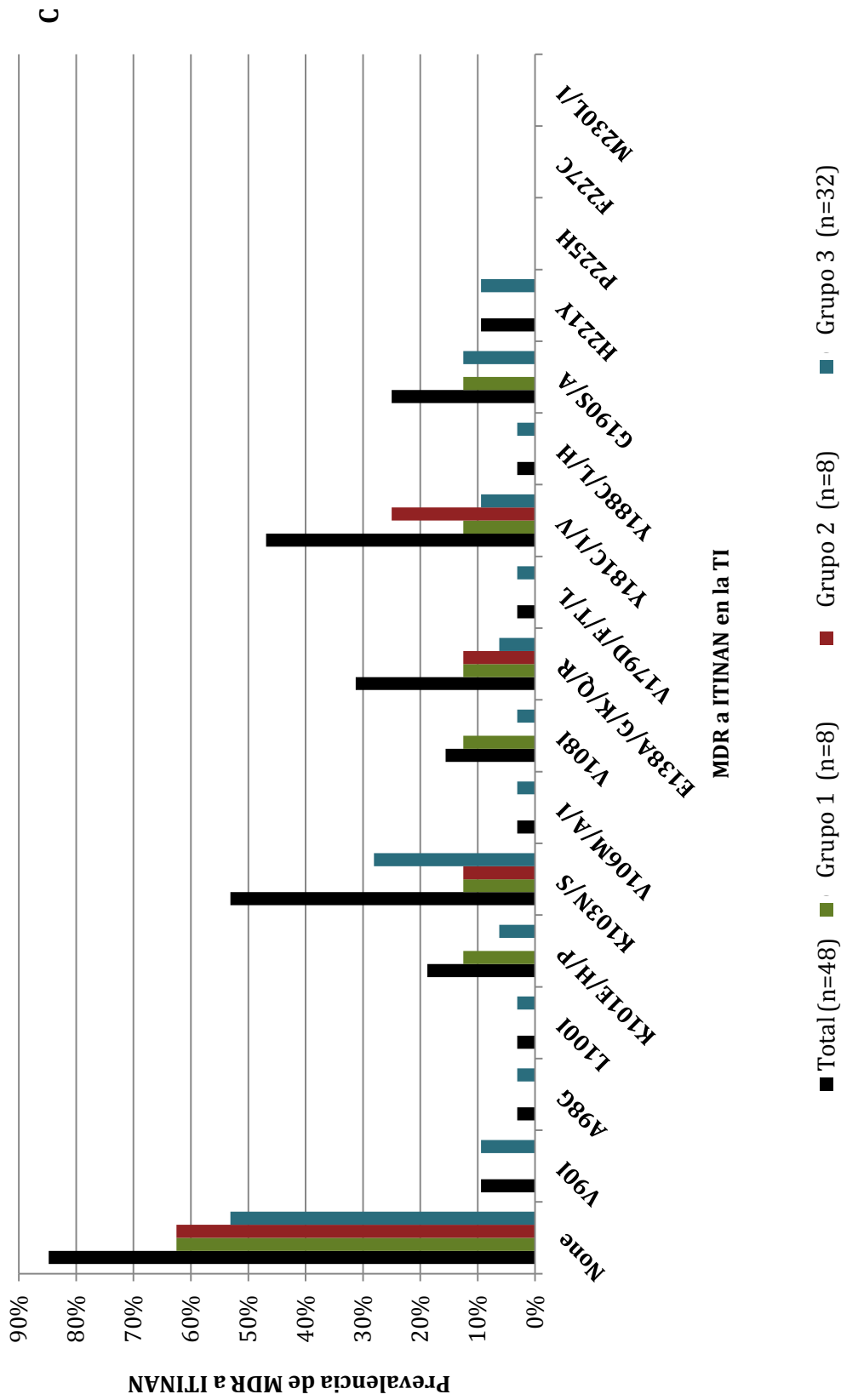
Variables seleccionadas	Análisis univariante		Análisis Multivariante (CFS)
	InfoGainAttributeEval	GainRatioAttributeEval	Nº de aciertos %
Año de diagnóstico de VIH-1	0,196	0,292	100%
Año de inicio de TARGA con LPV/r	0,181	0,252	100%
Año de inicio de TAR	0,164	0,165	90%
T CD4 c/mm3	0,156	-	100%
Año de secuenciación	0,138	0,192	90%
LPV/r como 1º TAR	0,123	0,287	80%

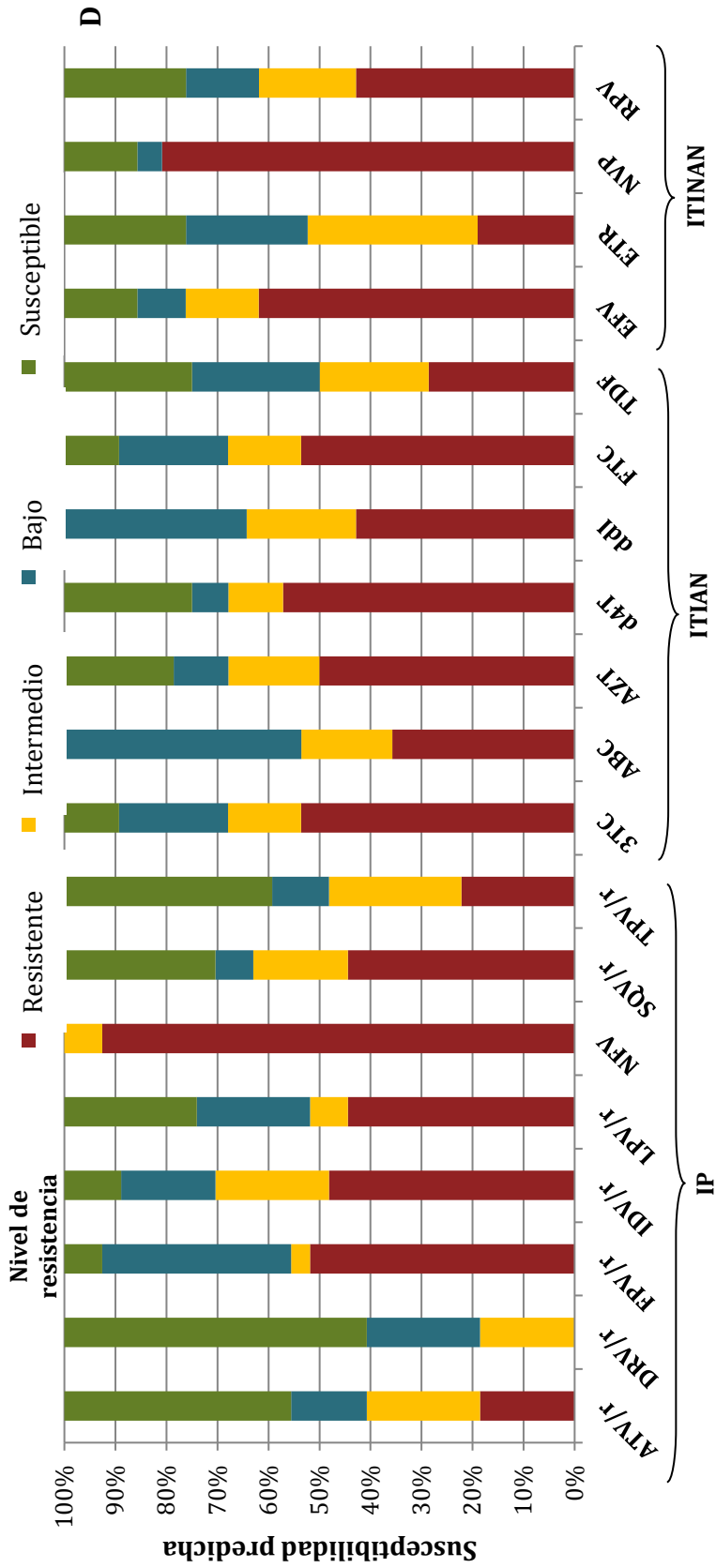
MDR, mutaciones de resistencia; IP, inhibidor de la proteasa; CFS, *Correlation Feature Selection*; TRGA, Tratamiento antirretroviral de gran actividad; LPV/r, lopinavir/ritonavir; TAR, tratamiento antirretroviral; -, ninguna variable fue relevante en un valor superior a 0,1. Factores predictivos mediante análisis univariante y análisis multivariante considerando MDR como variable clase o variable a predecir. Se consideraron variables predictivas cuando CFS arrojaba un valor $\geq 70\%$ y un umbral $\geq 0,1$

Figura 2.1. MDR en 64 pacientes pediátricos con experiencia a LPV/r y predicción de susceptibilidad en esos pacientes con MDR.









A)MDR en PR asociados a IP en 64 pacientes infectados por VIH-1 con datos disponibles de resistencia en PR (secuencias o perfiles de resistencia genotípicos) durante la experiencia a LPV/r. **B)** y **C)** MDR en TI asociados a resistencias en ITIAN o ITINAN respectivamente, en 46 pacientes infectados por VIH-1 con datos de resistencia disponibles en TI (secuencias o perfiles de resistencia genotípicos) durante la experiencia a LPV/r. **D)** Susceptibilidad predicha de acuerdo con el algoritmo de interpretación de *Stanford HIVdb* entre esos virus que presentaban MDR a IP (n=27), a ITIAN (n=28) o a ITINAN (n=21). MDR, mutaciones de resistencia; IP, inhibidores de la proteasa; PR, proteasa; ITIAN, inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleós(t)idos; TI, transcriptasa inversa; ITINAN, inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleós(t)idos; ATV, atazanavir; DRV, darunavir; FPV, fosamprenavir; IDV, indinavir; LPV, lopinavir; NFV, nelfinavir; SQV, saquinavir; TPV, tipranavir; /r, IP potenciado con ritonavir 3TC, lamivudina; ABC, abacavir; AZT, zidovudina; d4T, estavudina; ddI, didanosina; FTC, emtricitabina; TDF, tenofovir; EFV, efavirenz; ETV, etravirina; NVP, nevirapina; RPV, rilpivirina. Código de colores: rojo, alto nivel de resistencia; amarillo, nivel intermedio de resistencia; azul, nivel bajo de resistencia; verde, susceptible.

DISCUSIÓN

En este capítulo se analizan las características clínicas y virológicas de los pacientes pediátricos y adolescentes infectados por VIH-1 de la Cohorte de Madrid con experiencia a LPV/r durante el periodo 2000-2014. Considerando la inclusión de LPV/r en el tratamiento antirretroviral de primera o sucesivas líneas de rescate. Además, se describe la evolución de la CV y la recuperación inmune después del tratamiento con LPV/r, así como la presencia de MDR a las tres familias principales de fármacos ARV con la susceptibilidad predicha para los virus resistentes que infectaron a nuestra población de estudio.

Las guías de TAR actuales (tanto estadounidenses como europeas) promueven el uso de NFV y LPV/r como primera línea de tratamiento, en niños infectados por VIH-1 y *naive* (AIDSinfo, 2015; GESIDA, 2016; WHO, 2016b). Se ha observado mejoras en los pacientes con TARGA basado en LPV/r, en niños que no han sido expuestos previamente a NVP (Violari et al., 2012). En algunos países, LPV/r es el primer fármaco de elección para el tratamiento de niños infectados con VIH-1 (Huang et al., 2015) y la opción más usada como tratamiento de rescate en esos pacientes que presentan fracaso terapéutico con fármacos de la familia de ITINAN, así como uno de los fármacos de elección para la profilaxis postnatal (Penazzato et al., 2014; WHO, 2016b). A pesar de que el uso de LPV/r ha resultado ser la mejor opción para comenzar el TAR en niños menores de 3 años en España, en este capítulo se ha podido observar que LPV/r fue prescrito con mayor frecuencia en los tratamientos de rescate (segunda línea o superiores) que en los TARGA de primera línea (83,2% vs. 16,8%) durante el periodo de estudio (2000-2014). LPV/r fue prescrito con mayor frecuencia como parte de TARGA durante el periodo 2008-2014 que durante el periodo 2000-2007 (42,8% vs. 11%), debido probablemente a las siguientes razones: 1) La baja representación de nuevos niños infectados por VIH-1 durante el primer periodo que requerían TARGA de primera línea de acuerdo con la guías nacionales; 2) el uso alternativo de EFV vs. IP en niños mayores de 3 años con una buena adherencia; 3) el uso preferencial de ATV/r debido a una dosis más sencilla en niños mayores de 6 años, los cuales aparecen en un mayor número en el Grupo 1.

A pesar de observarse un incremento en el porcentaje de linfocitos T CD4 en los tres grupos de pacientes, se pudo ver que los pacientes incluidos en el Grupo 1 presentaron un mayor recuento de linfocitos T CD4 en el periodo basal, así como un mayor incremento en el porcentaje de linfocitos T CD4 en la última determinación clínica tras la exposición a LPV/r. Estos resultados están apoyados por estudios previos en los que se observa como el inicio de TAR maximiza la recuperación inmune cuando el recuento basal de linfocitos T

CD4 es elevado (Yin et al., 2014). Se observó que 7 de cada 10 pacientes consiguieron CV plasmáticas indetectable en la última determinación clínica disponible durante la exposición a LPV/r. La reducción de la viremia fue mayor (87,5%) en los pacientes del Grupo 1, quizás porque los TARGA que contiene LPV/r consiguen una mayor disminución de la replicación viral más duradera en el tiempo, tanto en pacientes *naive* y pacientes tratados (Ramos et al., 2009). Desafortunadamente, no todos los pacientes de nuestra Cohorte de estudio consiguieron mantener CV plasmática indetectable en su último dato de viremia disponible durante su exposición al LPV/r ya que la supresión completa de la replicación viral es más difícil de obtener en niños que en adultos. Esto es debido, principalmente, a que los niños presentan niveles basales más elevados de CV, distinta farmacocinética y dificultad de conseguir adherencia completa al TARGA como consecuencia del mal sabor, de regímenes complejos, de dosis inadecuadas y del gran tamaño de las píldoras.

Los niños que fracasaron cuando el primer tratamiento incluía LPV/r, desarrollaron un número mínimo de MDR a IP (Babiker et al., 2011; Meyers et al., 2015). De hecho, estudios previos muestran una baja prevalencia de MDR después de tratamientos con régimen de primera línea, incluyendo tratamientos con LPV/r frente a tratamientos con NFV (Kempf et al., 2004) o con algún fármaco ITINAN (Lima et al., 2008). Ningún niño incluido en el Grupo 1 presentó MDR a IP, lo que explica la reducción significativa de CV plasmática después de haber sido tratado con LPV/r así como la preservada susceptibilidad a los IP en este grupo. Tal y como era de esperar, los pacientes del Grupo 3 mostraron un mayor número de MDR a las 3 familias de fármacos, consecuencia del elevado número de fármacos y cambios de tratamientos a los que habían estado sometidos estos pacientes durante su seguimiento clínico y a su duración en el tiempo. No obstante, existen nuevos fármacos ARV más potentes que el LPV/r aprobados por la EMA durante los años 2008-2013. Entre ellos están los nuevos ITIAN (TNF en 2012), los nuevos IP (TPV/r y DRV/r en 2009 y el ATV/r en 2012) y los inhibidores de la INT (RAL en 2013), que minimizan la aparición de MDR y mantienen su susceptibilidad en el tiempo. Por otro lado, el NFV resultó ser la peor opción para el rescate terapéutico en los pacientes incluidos en esta Cohorte de estudio. Debido a la elevada barrera genética de LPV/r se consiguió preservar la susceptibilidad a este fármaco, así como a otros IP potenciados con ritonavir (TPV/r o DRV/r) a pesar de que los pacientes presentasen MDR a IP. Ello enfatiza el uso de LPV/r después del fracaso virológico. Estudios previos han mostrado la existencia de factores independientes y predictivos relacionados con el éxito virológico de tratamiento con LPV/r, como son los niveles de viremia en sangre, la experiencia previa a IP y el número de MDR fijadas en la PR de los virus que reducen la

susceptibilidad de LPV/r (Delaugerre et al., 2004; Bongiovanni et al., 2003). El análisis univariante y multivariante llevado a cabo en este capítulo identificó como variables relacionadas con la aparición de MDR a IP el uso de LPV/r como primera TAR y el año de inicio de TAR con dicho fármaco.

En nuestro estudio, 11 niños no desarrollaron MDR a IP después de estar expuestas a LPV/r durante un tiempo medio de 4,3 años. No obstante, los valores elevados de viremia en las últimas determinaciones de CV en 4 de estos 11 niños sugieren una mala adherencia al TARGA. En esta Cohorte pediátrica expuesta a LPV/r, existe una elevada prevalencia de niños con MDR a todas las familias de fármacos (n=16), probablemente como consecuencia del largo historial de terapias, frecuentes cambios de régimen, elevada experiencia fármacos y la elevada experiencia a ARV *off-label*. Estos resultados están en consonancia con otros estudios realizados en la Cohorte de Madrid de niños y adolescentes infectados por VIH-1 (de Mulder et al., 2011; Fernández Cooke et al., 2016; de Mulder et al., 2014; Rojas et al., 2015).

Las principales limitaciones de este capítulo radican en que solamente 64 de los 199 pacientes pediátricos con experiencia a LPV/r durante los años 2000-2014, presentaron secuencias disponibles del gen *pol* y/o perfiles de resistencia genotípicos. Este hecho se encuentra justificado por las recomendaciones de no hacer test de resistencia en pacientes *naïve* durante su seguimiento en rutina clínica hasta el año 2007 (GESIDA, 2016), por las bajas CV en las muestras disponibles tras la experiencia a LPV/r o a la falta de muestra. Este es el primer estudio en el que se describe y analiza la evolución (antes y después del tratamiento con LPV/r) durante 15 años, de los parámetros clínicos, epidemiológicos y virológicos en pacientes pediátricos infectados por VIH-1 de la Comunidad de Madrid. A pesar de que LPV/r ha sido usado frecuentemente como tratamiento de rescate en esta Cohorte de estudio, se ha podido observar una elevada reducción de la replicación viral y una buena recuperación inmune en términos de recuento y porcentaje de linfocitos T CD4 y T CD8 cuando LPV/r fue prescrito como TARGA de primera línea. Además, en este estudio se ha podido conocer que los nuevos IP son los ARV con actividad antirretroviral menos comprometida en los virus con MDR en la cohorte expuesta a LPV/r. Por otro lado, NFV es el ARV que presentó un mayor nivel resistencia. Esperamos que estos datos resulten de especial importancia e interés al personal médico, ya que aporta nueva información sobre el uso LPV/r en niños y adolescentes infectados expuestos a dicho fármaco.

Los resultados del trabajo descrito en este capítulo han sido enviados a publicar como artículo de investigación, incluido en el **Anexo III**: Rojas Sánchez P, Prieto L, Jiménez de Ory

S, et al. (2016) Impact of exposure to lopinavir-ritonavir in HIV-1 infected children and adolescents in Madrid, Spain during 2000-2014. En revision en *Plos One*.

CAPÍTULO 3

**CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS, EVOLUCIÓN DEL
PERFIL DE RESISTENCIAS Y DE VARIANTES DEL VIH-1 EN LA
COHORTE DE NIÑOS Y ADOLESCENTES INFECTADOS POR VIH-1 DE
MADRID DURANTE CASI 25 AÑOS (1993-MARZO 2016)**

ANTECEDENTES

A pesar del éxito de las medidas preventivas y la expansión del TAR en el mundo, encontrándose más de 17 millones de personas infectadas en TAR (UNAIDS, 2016a, b), todavía, el 60% (1,8 millones) de los 3 millones de niños infectados por VIH-1 no tienen acceso al TAR tras su nacimiento (UNAIDS, 2015). Incluso en países donde el TAR debe suministrarse a toda la población infectada, como es el caso de España, aún continúan ocurriendo nuevas infecciones pediátricas (Guillen et al., 2012, Frange et al., 2010). Esto es debido, principalmente, a población inmigrante procedente de países con una alta prevalencia del VIH-1, con alto estigma social asociado al VIH/sida y que no acceden (o lo hacen tarde) al control rutinario del VIH-1 durante el embarazo y al diagnóstico precoz del VIH-1. El objetivo de este capítulo es describir las tendencias temporales en la tasa de MDR transmitidas y adquiridas y las variantes virales del VIH-1 durante casi 25 años (1993-2015) en la Cohorte de niños y adolescentes de Madrid, aportando nuevos datos actualizados de las resistencias a ARV y la epidemiología molecular del VIH-1 en la población pediátrica infectada en España (Rojas et al., 2016a).

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

Para este estudio se seleccionaron todos los pacientes de la Cohorte de niños y adolescentes infectados por VIH-1 de la Comunidad de Madrid que presentaban, al menos, una secuencia parcial del gen *pol* del VIH-1 y/o perfil de resistencia genotípico, con el fin de analizar los patrones de resistencia así como las variantes virales del VIH-1 que infectaban a la población pediátrica desde 1993 hasta 2016. Además, se recopilieron los informes clínicos y epidemiológicos de todos los pacientes hasta marzo de 2016. Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Ramón y Cajal.

Identificación genotípica de resistencias a fármacos

La mayoría de las secuencias parciales del gen *pol* del VIH-1 (PR completa o PR y/o TI parcial) habían sido amplificadas previamente y publicadas en estudios realizados por nuestro grupo con muestras recogidas durante casi 25 años (entre 1993 a marzo de 2016) (de Mulder et al., 2012a; de Mulder et al., 2014; Rojas et al., 2016a). Muchos perfiles de resistencia genotípicos y 30 nuevas secuencias se recuperaron de la rutina clínica a partir de test de resistencia a fármacos ARV. Los números de acceso a GenBank para las secuencias (TI y/o PR) de los 207 pacientes incluidos en este estudio fueron: HQ426714-HQ426722,

HQ426724-HQ426911, JQ315955, JQ315961-JQ315963, JQ315967, JQ315971, JQ315986, JQ315989-JQ315999, JQ352007, JQ352018, JQ352021-JQ352023, KP881483-KP881495, KP881497, KT318869-KT318870, KX607057-KX607079.

La prevalencia de MRT a fármacos ARV en población *naive* se definió según la lista recomendada por la OMS (Bennett et al., 2009) usando la herramienta CPR de *Stanford HIVd* (**Anexo I**). La prevalencia de MDR en pacientes previamente tratados se definió de acuerdo al listado estadounidense IAS-2015 (**Anexo I**), excluyéndose las mutaciones secundarias para los IP. El análisis de sensibilidad de los fármacos ARV se predijo mediante la utilización del algoritmo de *Stanford HIVdb* (**Anexo I**) que clasifica la sensibilidad a los ARV en cuatro categorías en función de las puntuaciones otorgadas a cada mutación: 1) susceptible, 2) nivel bajo de resistencia, 3) nivel intermedio de resistencia y 4) nivel alto de resistencia.

Subtipaje del VIH-1

A pesar de que la mayoría de los subtipos habían sido identificados previamente mediante AF de las secuencias *pol* (de Mulder et al., 2012a; de Mulder et al., 2014; Rojas et al., 2016b), se llevaron a cabo nuevos AF en las secuencias que habían sido identificadas previamente como variantes no-B del VIH-1 y también en las 30 secuencias nuevas recuperadas de los hospitales de seguimiento clínico para estos pacientes. Se incluyeron como secuencias de referencia, al menos, 2 secuencias representativas de cada uno de los 9 subtipos y de 47 de los 79 CRF del VIH-1 del grupo M, incluidas las nuevas secuencias representativas de CRF descritos en el momento del análisis que se encontraban ausentes en los estudios previos. Dichas secuencias se descargaron de la base de datos del Laboratorio Nacional de Los Álamos de E.E.U.U. Se tomó como raíz la secuencia YBF30 del grupo N del VIH-1. Las secuencias se alinearon usando el programa ClustalX (**Anexo I**). El árbol filogenético se obtuvo usando el programa PHYLIP (**Anexo I**) mediante el método de distancia *neighbour joining* con el modelo de sustitución nucleotídica de dos parámetros de Kimura. Para comprobar la robustez estadística del árbol, se aplicó un re-muestreo tipo *bootstrap* con 1.000 repeticiones. Se consideró un límite de 700 en el valor dicho *bootstrap* como límite para un agrupamiento fiable.

RESULTADOS

Población de estudio

Se seleccionaron un total de 245 (43,6%) niños de los 561 pacientes pediátricos registrados en la Cohorte de Madrid de niños y adolescentes infectados por VIH-1, en función de la disponibilidad de secuencia de *pol* (n=207 pacientes) y/o perfil de resistencia

genotípico (n = 38 pacientes), desde 1986 a marzo de 2016 (**Tabla 3.1**). Se recopiló la información disponible de MDR y/o MRT en la PR y/o en la TI para los 245 pacientes con datos de resistencias en la PR (n=214) o en la TI (n=220) (**Tabla 3.2**). En la **Figura 3.1A** se indica el número de nuevos diagnósticos de VIH-1 en la Cohorte de Madrid de niños y adolescentes infectados por VIH-1 a partir de 1986 hasta marzo de 2016, así como los pacientes con datos de resistencia *pol* y los informes de resistencia disponibles por periodos.

En la **Tabla 3.1** se muestran las características clínicas y epidemiológicas de los 245 pacientes pediátricos con datos de resistencia a marzo de 2016. Se pudo observar que la mayoría de los pacientes estaban infectados perinatalmente (94,3%) por virus con subtipo B (81,6%), nacidos en España (79,1%), en seguimiento clínico en unidades pediátricas (34,7%) o de adultos (42,4%) en 8 hospitales públicos de Madrid. El 56,7% eran de género femenino. Sólo el 7,3% estaban coinfectados por el VHC (6,5%) o VHB (0,8%). La mayoría de ellos nacieron (81,2%) o se diagnosticaron como portadores de VIH-1 (73,9%) antes del año 2000, aunque la gran parte de las muestras secuenciadas disponibles se recogieron en años posteriores (79,6%) (**Tabla 3.1**). Además, se comparó la población de estudio con la población total adscrita a la Cohorte (n=561), y se pudo observar cómo ambas poblaciones presentaban características clínicas y epidemiológicas basales similares (**Tabla 3.1**).

Tabla 3.1. Características basales de la población de estudio con MDR en comparación con la Cohorte completa hasta marzo 2016.

Características	Cohorte de Madrid de niños infectados por VIH-1 n=561 (%)	Pacientes con datos de resistencia^a n=245 (%)
Demográficas		
Sexo femenino	301 (53,7)	139 (56,7)
Ruta de transmisión del VIH-1		
Perinatal	508 (90,6)	231 (94,3)
Transfusión sanguínea	36 (6,4)	6 (2,4)
Sexual	6 (1,1)	3 (1,2)
Desconocida	11 (1,9)	5 (2,1)
Origen^b		
España	477 (85)	194 (79,1)
Otros países Europeos	4 (0,7)	4 (1,6)
África	42 (7,5)	29 (11,8)
Latinoamérica	26 (4,6)	12 (4,9)
Asia	1 (0,2)	1 (0,4)
Norteamérica	2 (0,4)	1 (0,4)
Desconocido	9 (1,6)	3 (1,2)
Seguimiento clínico		

Características	Cohorte de Madrid de niños infectados por VIH-1 n=561 (%)	Pacientes con datos de resistencia^a n=245 (%)
Unidades pediátricas	127 (22,6)	85 (34,7)
Unidades de adultos	162 (28,9)	104 (42,4)
Pérdida de seguimiento	87 (15,5)	48 (19,6)
Fallecidos	185 (33)	6 (2,4)
Desconocido	0	2 (0,8)
Coinfecciones	49(8,7)	18 (7,3)
VHC	35 (6,2)	16 (6,5)
VHB	14 (2,5)	2 (0,8)
Periodo de nacimiento		
Antes de 1981	16 (2,85)	
1981-1985	69 (12,3)	8 (3,3)
1986-1990	143 (24,5)	45 (15,8)
1991-1995	182 (32,4)	97 (39,6)
1996-2000	73 (13)	49 (20)
2001-2005	45 (8)	26 (10,6)
2006-2010	26 (4,6)	16 (6,5)
2011-2012	6 (1,1)	2 (0,8)
Desconocido	1 (0,2)	2 (0,8)
Periodo de diagnóstico de VIH-1		
1986-1990	9 (1,6)	28 (11,4)
1991-1995	118 (21)	88 (35,9)
1996-2000	167 (29,8)	65 (26,5)
2001-2005	93 (16,6)	32 (13,1)
2006-2010	48 (8,6)	20 (8,2)
2011-2015 ^c	35 (6,2)	8 (3,3)
Desconocido	23 (5,7)	4 (1,6)
Periodo de la primera secuencia		
1993-1999	50 (17,5)	50 (20,4)
2000-2004	99 (34,7)	99 (40,4)
2005-2009	78 (27,6)	78 (31,8)
2010-2016 ^d	14 (4,9)	18 (7,4)
Desconocido	3 (1,1)	0 (0)

MDR, mutaciones de resistencia; VHC; virus de la hepatitis C, VHB, virus de la hepatitis B. ^a 207 niños infectados por VIH-1 con secuencias parciales del *pol* y 38 con perfiles de resistencia.

^bDistribución de pacientes entre 8 hospitales públicos de Madrid: Hospital Universitario Doce de Octubre (n=59), Hospital Universitario La Paz (n=60), Hospital General Universitario Gregorio Marañón (n=52), Hospital Universitario de Getafe (n=28), Hospital Universitario Carlos III (n=30), Hospital Universitario de Móstoles (n=2), Hospital Universitario del Niño Jesús (n=7), Hospital Príncipe de Asturias (n=7).^c de enero a marzo de 2016 no hubo ningún diagnóstico informado.

^dPeriodo de tiempo que incluye enero 2010 hasta marzo de 2016.

Características clínicas de la población de estudio

Se estudiaron las tendencias temporales de las características inmunológicas (número y porcentaje de linfocitos T CD4 y T CD8) y virológicas (tasas de MDR y de MRT, variantes del VIH-1 y CV) durante casi 25 años (1993-marzo 2016) en los 245 pacientes de la Cohorte con

datos de resistencia, empleando datos de CD4, CD8 y CV disponibles hasta marzo de 2016 (**Tabla 3.2**). Se establecieron 4 grupos o periodos diferentes según el año de la primera secuencia parcial del gen *pol* y/o perfil de resistencia disponible, quedando configurados los periodos de la siguiente forma: Periodo 1 (P1) 1993-1999 (50 pacientes); Período 2 (P2) 2000-2004 (99 pacientes); Periodo 3 (P3) de 2005-2009 (78 pacientes) y el período de 4 (P4), de 2010-marzo 2016 (18 pacientes) (**Tabla 3.2**).

En el momento de toma de la primera muestra con datos de resistencia disponible, la mayoría (77,6%) de los 245 pacientes pediátricos en estudio se encontraban en TAR. Entre los 190 niños y adolescentes tratados, 100 (52,6%) habían recibido tres regímenes de TAR diferentes y 162 (85,3%) más de tres TAR distintos. El 100% de los pacientes incluidos en P3 y P4 recibieron 3 o más TAR. Casi un tercio (28%) de los 190 pacientes tratados presentaban una elevada experiencia a fármacos ARV, habiendo sido expuestos a siete o más medicamentos diferentes durante su tratamiento (**Tabla 3.2**).

Tabla 3.2. Características de la población de estudio con datos de resistencia en la primera muestra hasta marzo de 2016.

Características	Año de la muestra para el primer dato de resistencia disponible, n° (%)				
	P1	P2	P3	P4	Total (245)
Periodo	1993-1999	2000-2004	2005-2009	2010-2016	1993-2016
Año	1993-1999	2000-2004	2005-2009	2010-2016	1993-2016
Nº de pacientes (%)	50 (20,4)	99 (40,4)	78 (31,8)	18 (7,3)^a	245 (100)
Seguimiento clínico					
Unidades pediátricas	12 (24)	28 (28,3)	33 (42,3)	12 (66,7)	85 (34,7)
Unidades de adultos	28 (56)	53 (53,5)	23 (29,5)	0 (0)	104 (42,5)
Pérdida de seguimiento	8 (16)	14 (14,2)	20 (25,6)	6 (33,3)	48 (19,6)
Fallecidos	2 (4)	3 (3)	1 (1,3)	0 (0)	6 (2,4)
Desconocido	0 (0)	1 (1)	1 (1,3)	0 (0)	2 (0,8)
Edad media a fecha de muestra (meses)	48,9	104,7	133,1	101,14	101,8
(rango)	0,3-150	0,5-255,5	10,9-2649	0,3-231	0,3-264,9
TAR					
Naive	21 (42)	9 (9,1)	14 (17,9)	6 (33,3)	50 (20,4)
Tratado	28 (56)	90 (90,9)	64 (82,1)	8 (44,4)	190 (77,6)
Desconocido	1 (2)	0 (0)	0 (0)	4 (22,2)	5 (2)
Nº de regímenes en tratados, Media (rango)	1 (0-5)	3,2 (0-12)	3,1 (0-11)	1,9 (0-10)	2,6 (0-12)
1-2	20 (71,4)	39 (43,3)	20 (31,3)	1 (12,5)	80 (42,1)
3-6	8 (28,6)	42 (46,7)	30 (46,8)	2 (25)	82 (43,1)
7-12	0	8 (8,9)	9 (14,1)	1 (12,5)	18 (9,5)
Desconocido	0	1 (1,1)	5 (7,8)	4 (50)	10 (5,3)
Nº de fármacos previos en tratados, media (rango)	1,7 (0-8)	5,1 (0-12)	4,9 (0-13)	3,6 (0-12)	4,2 (0-13)
<3	15 (53,6)	6 (6,7)	0	0	21 (11)
3-6	10 (35,7)	54 (60)	41 (64,1)	4 (50)	109 (57,4)
7-13	3 (10,7)	29 (32,2)	18 (28,1)	3 (37,5)	53 (27,9)
Desconocido	0	1 (1,1)	5 (7,8)	1 (12,5)	7 (3,7)

Características	Año de la muestra para el primer dato de resistencia disponible, n° (%)				
	P1	P2	P3	P4	Total (245)
Periodo	1993-1999	2000-2004	2005-2009	2010-2016	1993-2016
Año	1993-1999	2000-2004	2005-2009	2010-2016	1993-2016
Nº de pacientes (%)	50 (20,4)	99 (40,4)	78 (31,8)	18 (7,3)^a	245 (100)
Nº de secuencias <i>pol o</i> perfiles de resistencia^b					
TI en <i>naive</i>	21	8	14	5	48
PR en <i>naive</i>	19	8	14	5	46
TI en tratados	27	77	60	8	172
PR en tratados	21	78	61	8	168
Total TI	48	85	74	13	220
Total PR	40	86	75	13	214
Nº de pacientes <i>naive</i> con MRT					
A cualquiera	5 (22,7)	3 (33,3)	3 (21,4)	2 (40)	13 (26)
A ITIAN	3 (14,3)	2 (25)	0 (0)	0 (0)	5 (10,4)
A ITINAN	1 (4,8)	2 (25)	2 (14,3)	2 (40)	7 (14,6)
A IP (primarias)	1 (5,3)	2 (25)	2 (14,3)	0 (0)	4 (8,7)
Nº de pacientes tratados con MDR					
A cualquier	20 (71,4)	77 (85,6)	36 (56,2)	6 (75)	139 (73,2)
A ITIAN	18 (66,7)	60 (77,9)	30 (50)	3 (37,5)	111 (64,5)
A ITINAN	2 (7,4)	32 (41,6)	23 (40)	5 (62,5)	62 (36)
A IP (primarias)	4 (19)	42 (53,8)	12 (19,7)	1 (12,5)	59 (35,1)
CV (cop./ml)					
Con datos	47 (94)	90 (90,9)	67 (85,9)	14 (77,8)	218 (88,9)
Media	484.653	77.558,3	70.001,4	800.611,6	208.838,1
≤50	0 (0)	4 (4,4)	13 (19,4)	1 (7,1)	18 (8,3)
>50-500	2 (4,2)	7 (7,8)	7 (10,4)	1 (7,1)	17 (7,8)
>500-1.000	2 (4,2)	3 (3,3)	3 (4,5)	1 (7,1)	9 (4,1)
>1.000-10.000	6 (12,8)	22 (24,4)	15 (22,4)	1 (7,1)	44 (20,2)
>10.000-100.000	17 (36,2)	38 (42,3)	19 (28,4)	6 (42,9)	80 (36,7)
>100000	20 (42,6)	16 (17,8)	10 (14,9)	4 (28,7)	50 (22,9)
T CD4 (%)					
Con datos	42 (84%)	85 (85,6)	67 (85,9)	13 (72,2)	207 (84,5)
Media	29,3%	27,2%	28,7%	26,8%	28,1%
<25%	17 (40,5)	36 (42,3)	20 (29,9)	6 (46,2)	79 (38,2)
25-50%	21 (50)	48 (56,5)	46 (68,6)	7 (53,8)	122 (58,9)
>50%	4 (9,5)	1 (1,2)	1 (1,5)	0 (0)	6 (2,9)
T CD8 (%)					
Con datos	39 (78)	78 (78,8)	60 (76,9)	13 (72,2)	191 (77,9)
Media	34,4%	42,6%	42,7%	41,5%	40,8%
<25%	13 (33,3)	11 (14,1)	4 (6,7)	1 (7,7)	29 (15,2)
25-50%	17 (43,6)	41 (52,6)	40 (66,6)	9 (69,2)	108 (56,5)
>50%	9 (23,1)	26 (33,3)	16 (26,7)	3 (23,1)	54 (28,3)
T CD4 (cél/mm³)					
Con datos	39 (78)	69 (69,7)	65 (83,3)	14 (77,8)	185 (75,5)
Media	1425,3	1039,4	957,4	857	1080,2
<350	8 (20,5)	7 (10,1)	6 (9,2)	3 (21,4)	24 (12,9)
>350-500	5 (12,8)	10 (14,5)	6 (9,2)	1 (7,1)	22 (11,9)
>500-1.000	13 (33,4)	30 (43,5)	35 (53,8)	6 (42,9)	84 (45,3)
>1.000-1.500	3 (7,7)	8 (11,6)	7 (10,9)	1 (7,2)	19 (10,3)
>1.500	10 (25,6)	14 (20,3)	11 (16,9)	3 (21,4)	38 (20,5)

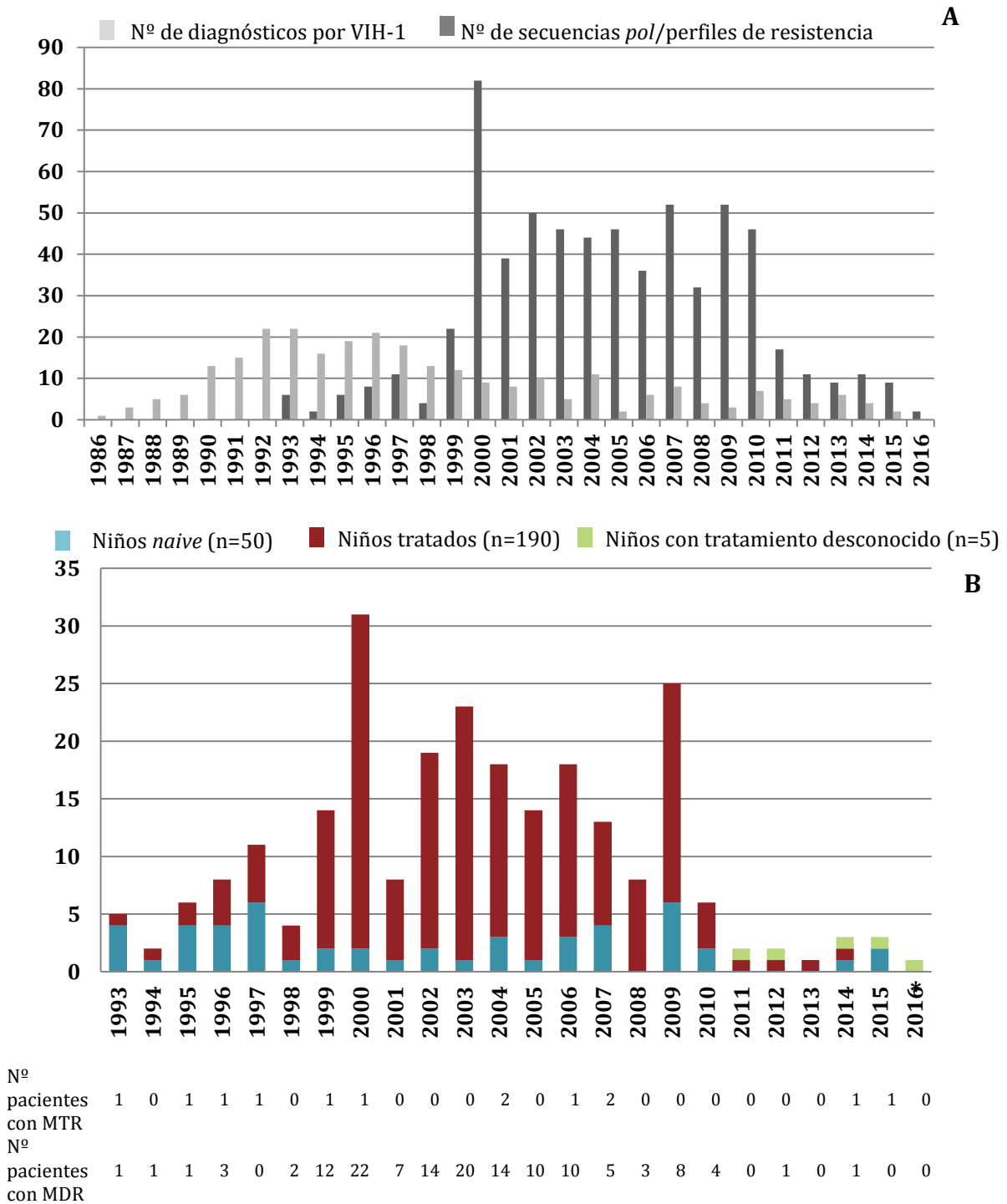
Características	Año de la muestra para el primer dato de resistencia disponible, n° (%)				
	P1	P2	P3	P4	Total (245)
Periodo	1993-1999	2000-2004	2005-2009	2010-2016	1993-2016
Nº de pacientes (%)	50 (20,4)	99 (40,4)	78 (31,8)	18 (7,3) ^a	245 (100)
T CD8 (cél/mm³)					
Con datos	24 (48)	40 (40,4)	38 (48,7)	11 (61,1)	113 (46,1)
Media	1095	1294	1285	1011	1222
<350	3 (12,5)	0 (0)	2 (5,3)	1 (9,1)	6 (5,3)
>350-500	2 (8,3)	1 (2,5)	0 (0)	0 (0)	3 (2,7)
>500-1.000	8 (33,4)	13 (32,5)	9 (23,7)	5 (45,4)	35 (30,9)
>1.000-1.500	5 (20,8)	15 (37,5)	20 (52,6)	3 (27,3)	43 (38,1)
>1.500	6 (25)	11 (27,5)	7 (18,4)	2 (18,2)	26 (23)
Ratio CD4/CD8, media (rango)	1.2 (0,2-5)	0.8 (0,03-3)	1.1 (0,15-14,7)	0.5 (0,01-5,8)	1 (0,03-14,7)

TAR, tratamiento antirretroviral; MRT, mutaciones de resistencia transmitidas; MDR, mutaciones de resistencia; CV, carga viral; PR, proteasa; TI, transcriptasa inversa; ITIAN, inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleós(t)idos; ITINAN, inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleós(t)idos ^a Se incluyeron 5 niños con TAR desconocido en este periodo. ^b Información de resistencias disponible en PR y/o TI en 245 pacientes (214 PR y 220 TI). De los 50 pacientes *naive*, 47 presentaban secuencias *pol* (43PR+TI, 1PR y 3TI) y 3 perfiles de resistencia (1PR y 2TI). Los datos para MTR derivaron de 46 PR y 48TI. Un total de 190 pacientes con TAR presentaron mutaciones de resistencia desde 1993 a marzo 2016, contando con 155 secuencias *pol* (133PR+TI, 14PR y 7TI) y 35 perfiles de resistencia genotípicos (18PR+TI, 3PR and 14 TI). Los datos para calcular las MDR derivaron de 168 PR y 172 TI.

La edad media de la Cohorte del estudio fue de 8,5 años. Los pacientes incluidos en P1 y con datos de resistencia disponibles antes de 2000 presentaron una menor edad media (4 años) y una mayor tasa de pacientes *naive* (42%) en comparación con los otros períodos de estudio (**Tabla 3.2**). Por otra parte, ningún niño incluido en este periodo presentó CV indetectable (<50 cop./ml), quizá debido al menor tiempo de exposición a ARV o al tratamiento con regímenes inadecuados en comparación con el resto de los pacientes incluidos en otros años (**Tabla 3.2**). Se observó un mejor control de la viremia en el 4,4%, 19,4% y 7,1% de los pacientes incluidos en los periodos P2, P3 y P4, respectivamente.

En cuanto a la situación inmunológica, el 61,8% de los 207 pacientes con datos de recuento y porcentaje de linfocitos (T CD4 y T CD 8) presentaron un porcentaje de linfocitos T CD4 superior al 25%, siendo éste mayor (70,2%) en P3 y menor en P4 (53,8%). Los pacientes incluidos en P1 presentan los recuentos más altos de linfocitos T CD4 y el valor del ratio CD4/CD8 más elevado, así como los valores más bajos de porcentaje de linfocitos T CD8. Los pacientes incluidos en P4 mostraron unos valores medios más bajos, tanto para el recuentos de linfocitos T CD4 y T CD8, como para el ratio CD4/CD8. Sólo el 2,9% de los 207 pacientes mostraron un porcentaje de linfocitos T CD4 superior al 50% en el primer período de estudio (**Tabla 3.2**).

Figura 3.1. Nuevos diagnósticos por VIH-1 y datos de resistencia genotípica disponibles en los 245 niños y adolescentes con VIH-1 de la Cohorte de Madrid.



A) Número de nuevos diagnósticos por VIH-1 por año y número total de secuencias parciales del gen *pol* y perfiles de resistencia genotípicos disponibles por año. **B)** Número de la primera secuencia disponible o perfil de resistencia para población *naive* (azul) y pretratada (rojo) y número de MTR y MDR, respectivamente, por año. El año de secuencia fue desconocido para 5 de 245 pacientes. Adicionalmente un paciente (año 2014) con MDR a ITINAN presentó TAR desconocido. 2016*, incluido hasta marzo de 2016. MDR, mutaciones de resistencia; MRT, mutaciones de resistencia transmitidas.

Prevalencia de las MDR y MRT

Entre los 245 pacientes infectados por VIH-1 e incluidos en este estudio, 50 (20,4%) estaban sin tratamiento previo cuando la primera secuencia estaba disponible, ya que ninguno de ellos había recibido TAR para prevenir la transmisión vertical según sus registros clínicos. Se encontraron mutaciones de resistencia transmitida o MRT en 13 (26%) de los 50 niños *naive*, siendo dicha prevalencia superior para los pacientes incluidos en P4 (40%) y P2 (33,3%) respecto a aquellos niños incluidos en P1 (22,7%) y P3 (21,4%) (**Tabla 3.2**). La tasa de MRT observada a ITINAN, ITIAN e IP fue del 14,6%, 10,4% y 8,7%, respectivamente. Las secuencias de virus de muestras tomadas después del año 2010 (P4) mostraron la prevalencia más alta MRT, pero sólo se encontraron mutaciones asociadas a ITINAN (40%) en este grupo. En la **Figura 3.1B** se muestra el número de pacientes *naive* y tratados por año que presentaban MRT y MDR desde 1993 a marzo de 2016.

Un total de 190 pacientes infectados por VIH-1 con experiencia ARV presentaron datos de mutaciones resistencia adquirida o MDR desde 1993 a marzo de 2016 (**Tabla 3.2**). De ellos, 139 (73,2%) presentaron alguna MDR. En cuanto a las familias de ARV, la tasa de MDR entre los niños tratados fue mayor para ITIAN (64,5%) que para ITINAN (36%) o IP (35,1%) (**Tabla 3.2**). Teniendo en cuenta los períodos de tiempo establecidos, los pacientes incluidos en P2 presentan la tasa más alta de MDR (85,6%), seguidos de los pacientes incluidos en P4 (75%), P1 (71,4%) y P3 (56,3%) (**Tabla 3.2** y **Figura 3.2A**). La tasa de MDR a PI e ITIAN fue mayor en P2 (53,8% y 77,9% respectivamente), pero se observó una tasa superior de MDR a ITINAN en P4 (62,5%). La mayor tasa de virus portadores de MDR a ITIAN (19,8%) e IP (20,3%) se encontró en 2000 y a ITINAN (17,7%) durante el año 2003 (**Figura 3.2B**).

Se identificaron y analizaron en pacientes tratados aquellas MDR específicas que se encontraban representadas por una frecuencia superior al 5%. Se observó que las MDR más frecuentes asociadas IP fueron: D30N (9,8%), M46I (11,6%), V82ATFSL (10,4%) y L90M (36,2%) en la PR; a ITIAN: M41L (24,3%), D67N (25,4%), T69D (9%), K70R (18,6%), L74V (8,5%), M184V (27,7%), L210W (15,8%), T215FY (31,6%) y K219Q (11,9%) en la TI; y a ITINAN: V90I (5,1%), K103N (18,6%), Y181C (5,6%) y G190A (5,6%) en la TI.

La **Figura 3.2C** muestra el período de tiempo en que se recogieron los datos de resistencia. Alrededor de la mitad de los pacientes infectados presentaban virus con las sustituciones T69D y L74V en la TI (ambas mutaciones asociadas a ITIAN) y se incluyeron en P1, pero no se encontraron MDR específicas asociadas ITINAN con una prevalencia superior al 5% en este periodo. En P2 se incluyeron el 93%, 60% y 64% de los niños tratados

e infectados con virus que habían fijado las sustituciones D30N y L90M en PR y Y181CIV en la TI, respectivamente. En P2 el número de pacientes portadores de virus resistentes fue mayor que en P1, a excepción de las sustituciones T69D y L74V en la TI. En P3 se observó un menor número de pacientes portadores de MDR que en P2, a excepción de las sustituciones D67N, T69D, V90I y G190AS en la TI. En P4 se encontró que el 62% de los niños que portaban la sustitución V90I en la TI y algunas MDR se encontraban ausentes (D30N, V82ATFSL y L90M para IP; M41L, D67N, L210W, T215FY y K219EQ para ITIAN e Y181CIV para ITINAN) (**Figura 3.2C**).

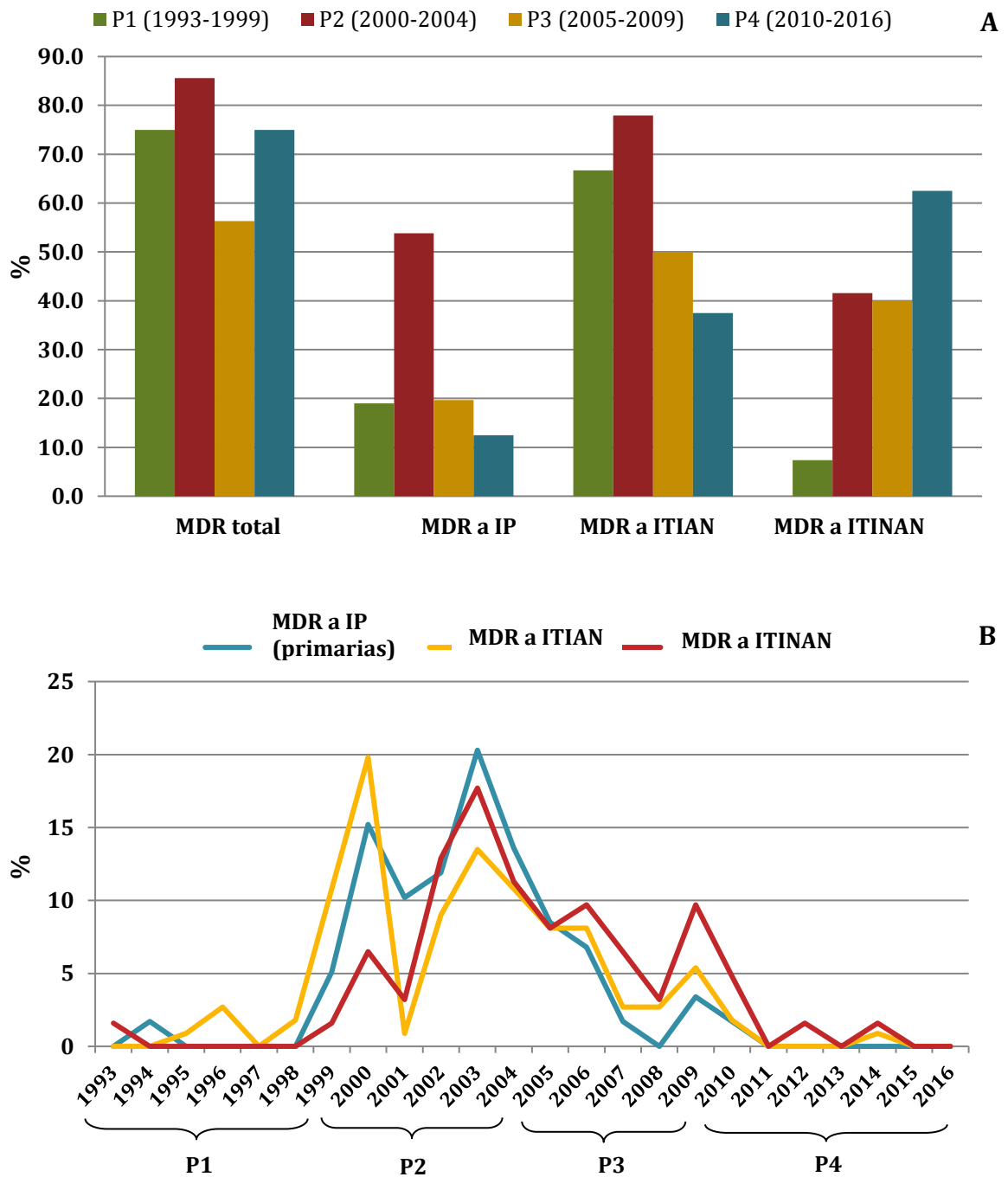
Susceptibilidad predicha a cada fármaco ARV

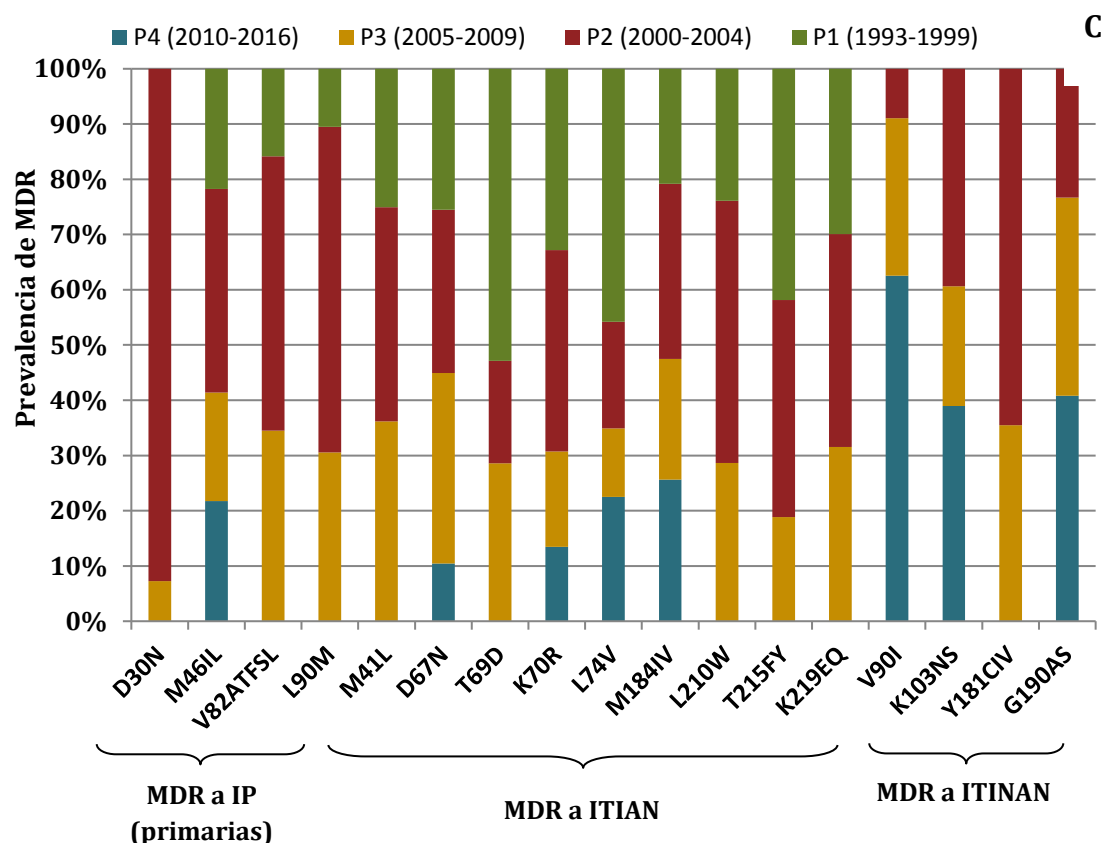
Se analizó la susceptibilidad a cada fármaco de las tres principales familias de ARV predicha por *Stanford HIVdb* para los 139 pacientes previamente tratados que presentaban virus con MDR, en cada periodo establecido (**Figura 3.3**). Antes del año 2000 (P1), los virus con DRM presentaron alta susceptibilidad a la mayoría de los IP y a todos los fármacos ITINAN.

La resistencia más alta se encontró en los fármacos de la familia de los ITIAN, destacando las limitadas opciones terapéuticas disponibles en España antes del año 2000. Se observó que del 20% al 40% de los pacientes pediátricos con MDR en P1 mostraban una alta resistencia a diferentes fármacos ITINAN, como al ddl, que arrojó los niveles más altos de resistencia (cerca de 40%). Durante P2 la resistencia a la mayoría de los ARV aumentó, especialmente a NFV (fármaco aprobado en España en 1998), a NVP (aprobado en 1998), a EFV (aprobado en 1999) y a FTC (aprobado en 2003).

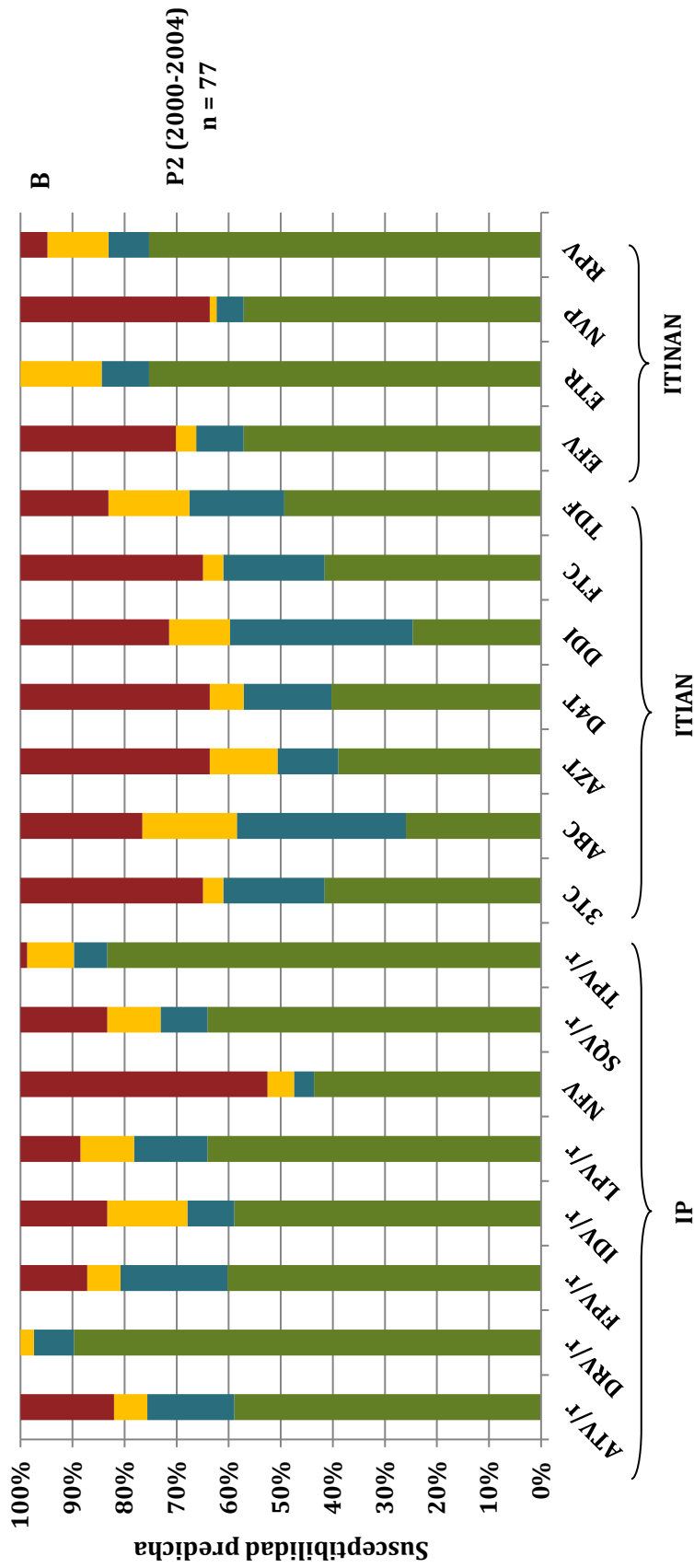
Durante P3 (2005-2009) los virus resistentes recuperaron la susceptibilidad a NFV, en comparación con el período anterior, aunque se redujo de nuevo en P4 (2010-2016). Durante el último periodo de estudio, los virus resistentes recuperaron la sensibilidad a los medicamentos AZT y d4T. Cuando se analizó la susceptibilidad predicha de los nuevos IP, como por ejemplo DRV, se puede observar la mayor susceptibilidad predicha en los 139 pacientes pediátricos tratados e infectados con virus con MDR (**Figura 3.3**).

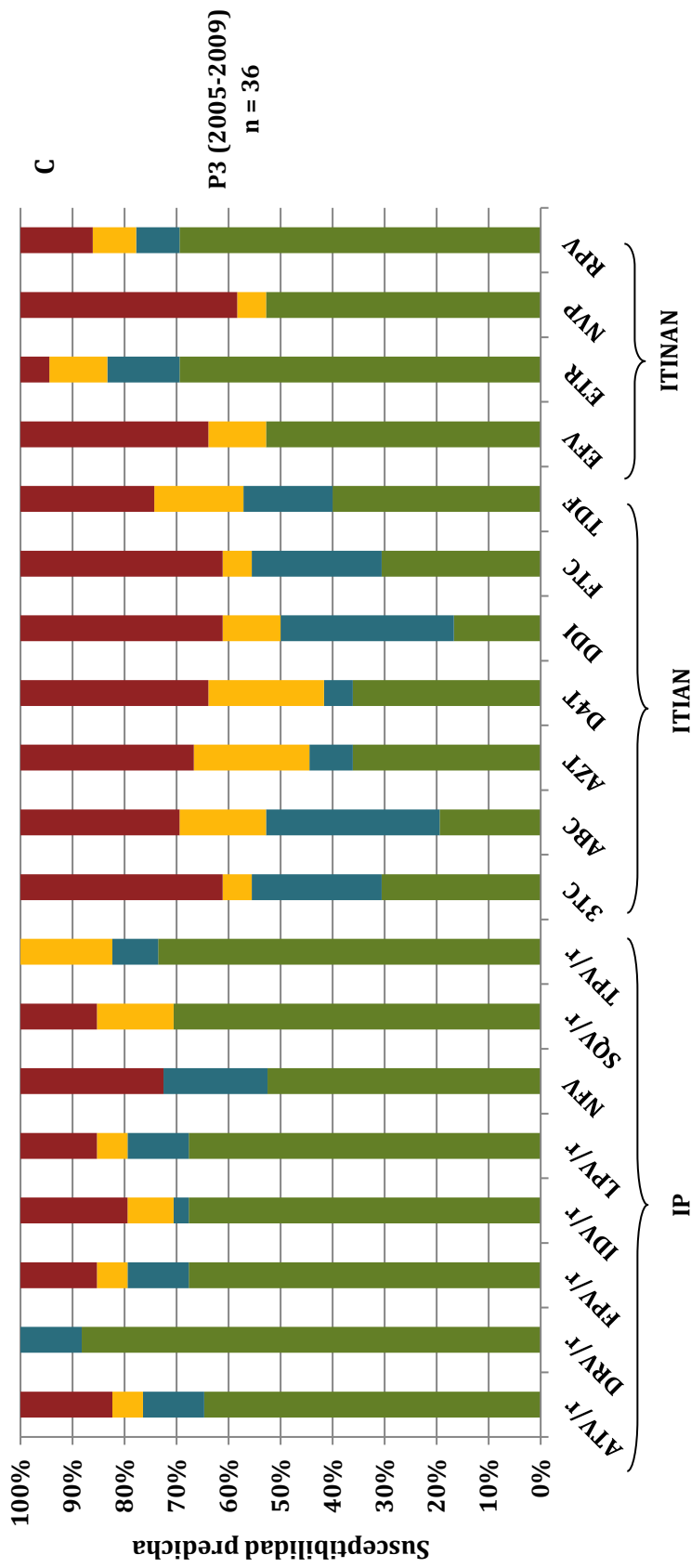
Figura 3.2. Tendencias temporales de la prevalencia de MDR durante 1993-2016* en los 190 niños infectados por VIH-1 y tratados.

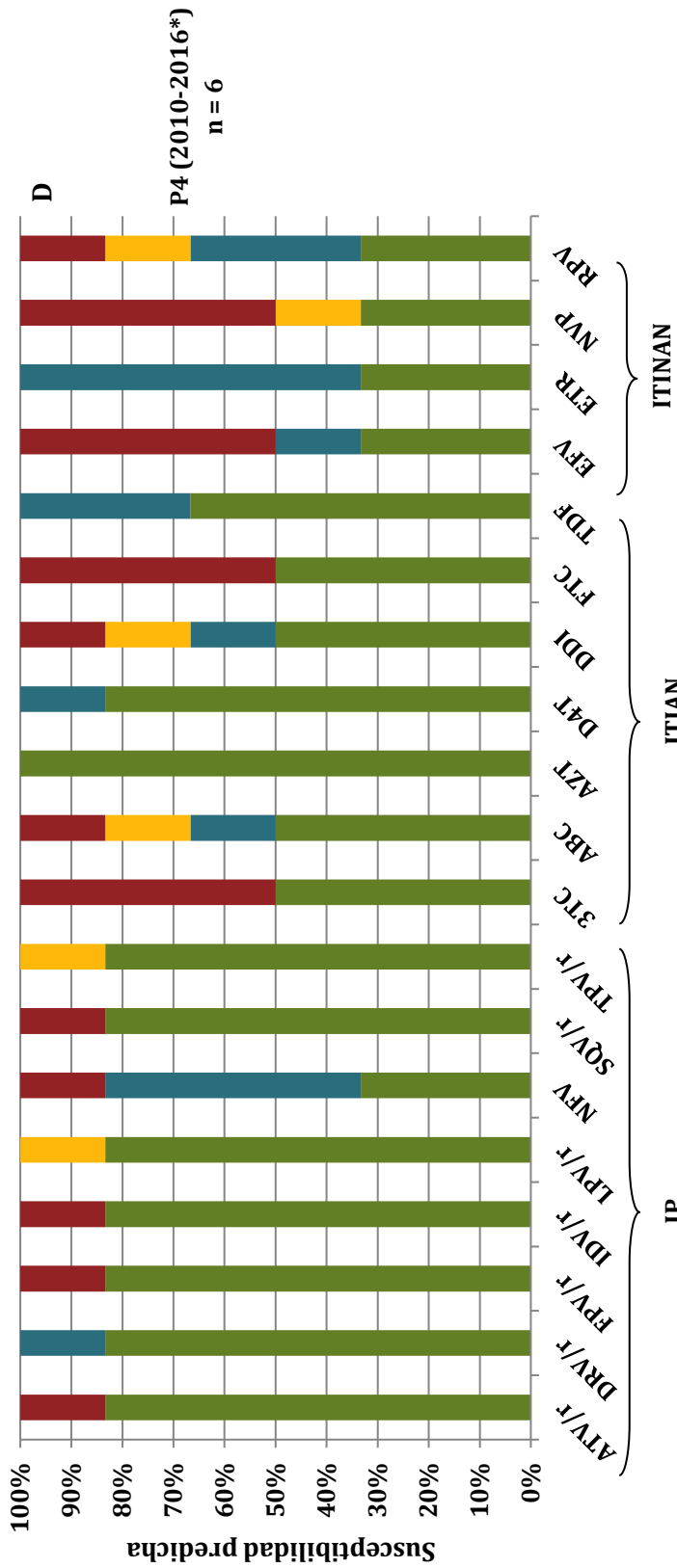




A) Tendencias temporales de la prevalencia de MDR de acuerdo con las familias de ARV y periodo de estudio en los pacientes con MDR. **B)** Tendencias temporales de la prevalencia de MDR de acuerdo a las familias de ARV por año en los 190 pacientes con datos de resistencia disponible **C)** Prevalencia de las posiciones específicas de MDR para cada familia de ARV representados en una prevalencia superior al 5% en la población de estudio de acuerdo a los periodos establecidos. 2016*, incluido hasta marzo de 2016. MDR, mutaciones de resistencia; IP, inhibidor de la proteasa; ITIAN, inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleós(t)idos; ITINAN, inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleós(t)idos.







Pacientes portadores de MDR en cada periodo: **A**) 20/28 (71,4%) en P1; **B**) 77/90 (85,6%) en P2; **C**) 36/64 (56,3%) en P3; **D**) 6/8 (75%) en P4. Susceptibilidad predicha de acuerdo con el algoritmo de interpretación de *Stanford HIVdb* entre esos virus que presentaban MDR. ARV, antirretroviral; MDR, mutaciones de resistencia; IP, inhibidor de la proteasa; ITIAN, inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleós(t)idos; ITINAN, inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleós(t)idos; ATV, atazanavir; DRV, darunavir; FPV, fosamprenavir; IDV, indinavir; NFV, nelfinavir; SQV, saquinavir; TPV, tipranavir;/r, IP potenciado con ritonavir; 3TC, lamivudina; ABC, abacavir; AZT, zidovudina; d4T, estavudina; ddI, didanosina; FTC, emtricitabina; TDF, tenofovir; EFV, efavirenz; ETV, etravirina; NVP, nevirapina; RPV, rilpivirina. Código de colores: verde, susceptible; azul, nivel bajo de resistencia; amarillo, nivel intermedio de resistencia; rojo, alto nivel de resistencia. Año en el que se aprobó cada fármaco en España: 1988 (AZT), 1993 (ddI), 1996 (d4T, 3TC, IDV/r, SQV/r), 1998 (NVP, NFV), 1999 (ABC, EFV), 2001 (LPV/r), 2002 (TDF), 2003 (FTC), 2004 (ATV/r, FPV/r), 2005 (TPV/r), 2007 (DRV/r) y 2008 (ETR) (**Anexo I**).

Caracterización filogenética de las variantes del VIH-1

En este estudio se han actualizado los datos de la epidemiología molecular del VIH-1 en la Cohorte de niños y adolescentes infectados por VIH-1 de Madrid hasta marzo 2016. En los datos publicados anteriormente sólo se incluían las secuencias recopiladas hasta el año 2010 y no se disponía de secuencias de referencia de 4 CRF en el GenBank para incluir en los análisis filogenéticos (de Mulder et al., 2011). Por ello, se llevaron a cabo nuevos análisis filogenéticos incluyendo todas las 24 secuencias de variantes no-B encontradas en niños y publicadas anteriormente (de Mulder et al., 2011; García Merino et al., 2010) y las 30 secuencias de nuevos pacientes. Así aportamos información sobre subtipos y recombinantes del VIH-1 en 235 (95,9%) de los 245 pacientes incluidos en este estudio, ya que en 10 de los 38 pacientes con perfil de resistencia los informes clínicos no aportaban el dato del subtipo. Por tanto las variantes del VIH-1 se dieron en los 207 pacientes con secuencia *pol* disponible (PR y/o TI) y en 28 de los 38 pacientes perfil de resistencia genotípico.

En la **Figura 3.4** se muestra la distribución de la variante del VIH-1 en la población de estudio por año de muestreo (a partir de 1993 hasta marzo de 2016) (**Figura 3.4A**) y por año de diagnóstico del VIH-1 (**Figura 3.4B**) hasta diciembre de 2015. Se puede observar como el subtipo B del VIH-1 fue la variante infectiva más frecuente en la Cohorte, principalmente antes del año 2005 (P1 y P2): Se encontraba infectando a 201 de los 235 pacientes (85,5%) (**Figura 3.4A**). Los subtipos no-B del VIH-1 y las formas recombinantes infectaron a 34 (14,5%) de los 235 niños y adolescentes con información de subtipo incluidos en el estudio (**Figura 3.4B**). Entre los 34 pacientes infectados por variantes no-B del VIH-1, 8 (23,5%) llevaban subtipos no-B o sub-subtipos del VIH-1 (1A1, 1A2, 3C, 2F1, 1H) y 26 (76,5%) estaban infectados por virus recombinantes intersubtipo, adscritos a 6 CRF diferentes. de esos 26 niños, 20 (76,9%) llevaban formas recombinantes circulantes (13CRF02_AG, 2 CRF12_BC, 2 CRF13_cpx, 1CRF11_cpx, 1CRF36_cpx, 1 CRF43_02AG) y 6 (23,1%) llevaban formas recombinantes únicas o URF (1 URF con B, 2 URF con D, 2 URF con G y 1 URF con CRF06_cpx).

En la **Tabla 3.3** se resumen las características epidemiológicas y clínicas de los 34 niños infectados por variantes no-B del VIH-1 desde 1993 a 2015. Los datos incluyen el origen del paciente, las variantes no-B infectivas, el año de nacimiento, de diagnóstico y de toma de muestras, el género del paciente, la vía de transmisión del VIH-1, el TAR, la CV plasmática, la presencia de MDR en el momento de la muestra y el hospital de seguimiento. El origen de los pacientes portadores de las 34 variantes no-B encontradas (hasta marzo el año 2016) se conocía en 32 casos; 7 (21,9%) de ellos eran niños nacidos de padres españoles y 25

(78,1%) niños procedentes de países extranjeros, principalmente (91,7%) de África. En más detalle, 12 niños procedían de Guinea Ecuatorial, 4 de Nigeria, 3 de Camerún, 1 de República Democrática del Congo, 1 de Mozambique, 2 de Marruecos, 1 de Ucrania y 1 de la India. La mayoría (94,1%) de los niños infectados por variantes no-B habían sido infectados por vía perinatal, exceptuando 1 niño que adquirió la infección por VIH-1 mediante transmisión sexual y otro niño infectado por una transfusión sanguínea (**Tabla 3.3**). La primera infección por variante no-B registrada en la Cohorte se observó en un niño nativo español diagnosticado en 1995 en el Hospital Doce de Octubre (Madrid) que había sido perinatalmente infectado en el año 1991 por la variante recombinante CRF39_BF y fue caracterizado por análisis filogenético en una muestra recogida en 2003.

Las infecciones por VIH-1 con variantes recombinantes complejas URF, aparecieron en esta población de estudio en pacientes nacidos durante los años 1994-2009 y diagnosticados entre 2005 y 2015 (**Tabla 3.1**). La vía de infección por VIH-1 en estos niños fue de origen vertical (3 casos), sexual (1 caso), por transfusión de sangre (1 caso) y desconocido en 1 niño. Cuatro de los pacientes pediátricos infectados por VIH-1 con URF procedían de Guinea Ecuatorial, 1 de Nigeria y 1 de España. El primer paciente registrado en la Cohorte con infección por VIH-1 con variante URF fue una niña marroquí nacida en el año 1995 que presentó infección por VIH-1 con variante URF con subtipo B y cuya infección por VIH-1 fue diagnosticada en el Hospital Gregorio Marañón (Madrid) durante el año 2005.

Tabla 3.3. Características de los 34 niños y adolescentes infectados por VIH-1 infectados por variantes no B del VIH-1.

Paciente	Variante no-B VIH-1	Hospital	Origen	Género	Ruta de transmisión VIH-1	Año de nacimiento	Año de diagnóstico	Edad al diagnóstico (meses)	Año de muestra	Estado de TAR	CV (log)	MDR en muestra
1	CRF39_BF	HDOC	España	M	Perinatal	1991	1995	46,23	2003	Con TAR	131	SI
2	CRF02_AG	HGM	España	F	Perinatal	1992	1992	2,97	2000	Con TAR	16,920	SI
3	A2	HGM	España	F	Perinatal	1992	1993	10,50	1993	Naive	1,340	NO
4	H	HDOC	Camerún	F	Perinatal	1993	1994	4,67	1993	Con TAR	ND	SI
5	CRF02_AG	HCIII	G-Q	F	Perinatal	1993	1997	47,57	2010	Con TAR	36	SI
6	URF con G	HDG	Nigeria	F	Perinatal	1994	2006	149,00	2008	Con TAR	145	NO
7	URF con D	HGM	Marruecos	F	ND	1995	2005	126,07	2007	Naive	234	NO
8	CRF43_02G	HDG	Nigeria	F	Perinatal	1996	2007	134,13	2009	Naive	19,525	NO
9	CRF12_BF	HLP	España	F	Perinatal	1997	1997	3,07	2000	Con TAR	12,600	NO
10	URF con CRF06_cpx	HLP	G-Q	F	Sexual	1998	ND	ND	2014	Con TAR	29,300	SI
11	CRF02_AG	HCIII	G-Q	M	Perinatal	2001	2006	63,87	2006	Naive	2,766	NO
12	URF con D	HCIII	G-Q	M	Perinatal	2001	2007	78,20	2009	Naive	ND	NO
13	C	HDG	Mozambique	M	Perinatal	2002	2003	13,80	2007	Con TAR	214,000	SI
14	CRF02_AG	HLP	Camerún	F	Perinatal	2002	2004	24,53	2004	Naive	243,000	SI
15	URF con C	HCIII	G-Q	M	Transfusión	2002	2006	51,67	2007	Con TAR	50	NO
16	CRF13_cpx	HCIII	India	M	Perinatal	2002	2006	48,20	2007	Con TAR	ND	NO
17	C	HLP	Camerún	F	Perinatal	2003	2003	0,07	2003	Con TAR	18,000	NO
18	CRF02_AG	HCIII	G-Q	F	Perinatal	2003	2004	8,80	2006	Con TAR	50	NO
19	CRF02_AG	HDOC	G-Q	M	Perinatal	2004	2004	0,17	2005	Con TAR	9,424	NO
20	URF con B	HDOC	España	M	Perinatal	2004	2015	130,17	2015	ND	95,476	NO
21	CRF02_AG	HCIII	G-Q	M	Perinatal	2005	2008	36,30	2007	Naive	NA	SI
22	CRF02_AG	HDOC	Nigeria	M	Perinatal	2006	2006	1,80	2006	Con TAR	50,342	NO
23	CRF02_AG	HLP	Nigeria	M	Perinatal	2006	2013	84,27	2013	Con TAR	80,000	NO
24	F1	HDOC	Congo	F	Perinatal	2007	2007	1,63	2007	Con TAR	500,000	NO

Paciente	Variante no-B-VIH-1	Hospital	Origen	Género	Ruta de transmisión VIH-1	Año de nacimiento	Año de diagnóstico	Edad al diagnóstico (meses)	Año de muestra	Estado de TAR	CV (log)	MDR en muestra
25	CRF02_AG	HDG	G.Q	F	Perinatal	2007	2007	0,00	2009	Con TAR	718	NO
26	A1	HDG	Ucrania	F	Perinatal	2007	2008	21,43	2009	Naive	465.417	NO
27	C	HDOC	Marruecos	M	Perinatal	2007	2008	2,43	2009	Con TAR	7.611	NO
28	CRF02_AG	HDOC	G.Q	M	Perinatal	2007	2010	32,67	2010	Con TAR	434.653	SI
29	URF con G	HDOC	G.Q	M	ND	2009	2014	59,00	2014	Naive	ND	SI
30	F1	HDOC	España	F	Perinatal	2010	2010	0,00	2010	Con TAR	236	SI
31	CRF02_AG	HDOC	G.Q	M	Perinatal	2010	2010	2,57	2010	Naive	10.000.000	NO
32	CRF_012BF	HDOC	España	F	Perinatal	2010	2014	45,30	2014	ND	ND	SI
33	C36_cpx	HDOC	ND	F	Perinatal	2011	2011	0,07	2011	ND	ND	NO
34	C11_cpx	HDOC	ND	F	Perinatal	2012	2012	0,00	2012	ND	9.424	NO

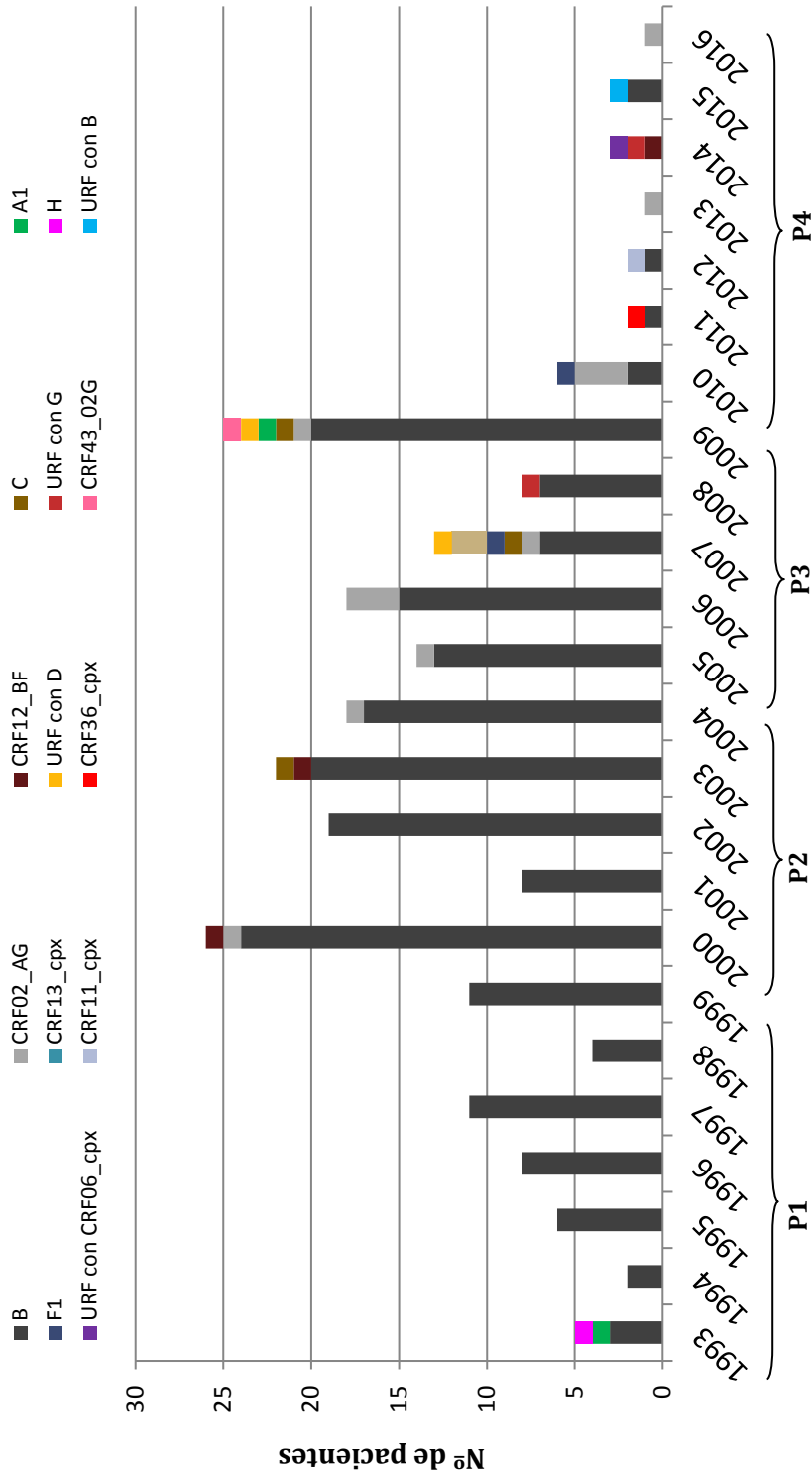
TAR, tratamiento antirretroviral; CV, carga viral; MDR, mutaciones de resistencia; HDOC, Hospital Universitario Doce de Octubre; HGM, Hospital General Universitario Gregorio Marañón; HCIII, Hospital Universitario Carlos III; HDG, Hospital Universitario de Getafe; HLP, Hospital Universitario La Paz; M, masculino; F, femenino; G.Q, Guinea Ecuatorial; ND, datos no disponibles

En la **Figura 3.4C** se representan las variantes infectivas de acuerdo con el año de diagnóstico por VIH-1, considerando 6 períodos de tiempo diferentes: P1 (1986-1990), P2 (1991-1995), P3 (1996-2000), P4 (2001-2005), P5 (2006-2010) y P6 (2011-2015). Entre los 231 niños y adolescentes con información disponible a cerca de las variantes infectivas del VIH-1 y tiempo de muestreo conocido, pudimos observar que las infecciones antes del año 2006 eran principalmente originadas por el subtipo B y menos del 5% por CRF y subtipos no-B del VIH-1. Sin embargo, el primer caso de infección por VIH-1 con variante no-B en la Cohorte se detectó en una niña perinatalmente infectada por la variante CRF02_AG y diagnosticada en 1992 (**Tabla 3.1**), observándose después un incremento de la prevalencia de las infecciones por subtipo no-B del VIH-1 en la Cohorte (**Figura 3.4C**). De hecho, sólo se encontraron 6 (3,4%) infecciones no-B entre los 173 niños y adolescentes diagnosticados en Madrid antes del año 2000, aumentando a 85,7% entre los diagnosticados en los últimos 5 años (2011-2015), todos ellos infectados por recombinantes del VIH-1. La tasa de pacientes extranjeros con variantes no-B por periodo fueron las siguientes: P1 (0%), P2 (25%), P3 (12,5%), P4 (42,8%), P5 (87,5%) and P6 (80%).

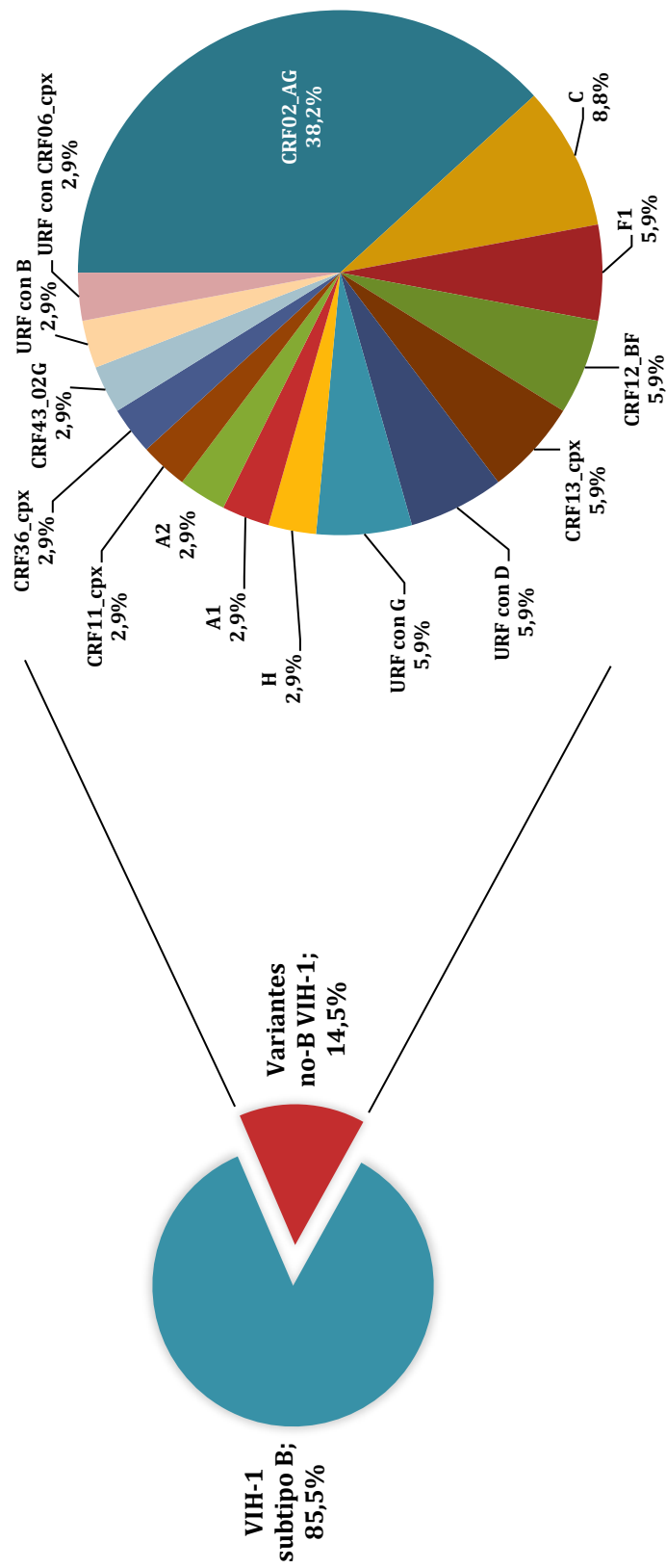
En más detalle, en los nuevos diagnósticos por el virus se observó una alta prevalencia de infección por VIH-1 con variantes recombinantes y URF, lo que representa casi un tercio de los nuevos diagnósticos desde 2011. De hecho, desde el primer diagnóstico de VIH-1 con URF en 2005, estas variantes complejas aumentaron de prevalencia entre el resto de variantes no-B (16,7% en P4, 21,4% en P5 y 33,3% en P6 (**Figura 3.4C**).

Figura 3.4. Prevalencia de las variantes del VIH-1 en 235 pacientes pediátricos con variante viral conocida durante 1993-2016.

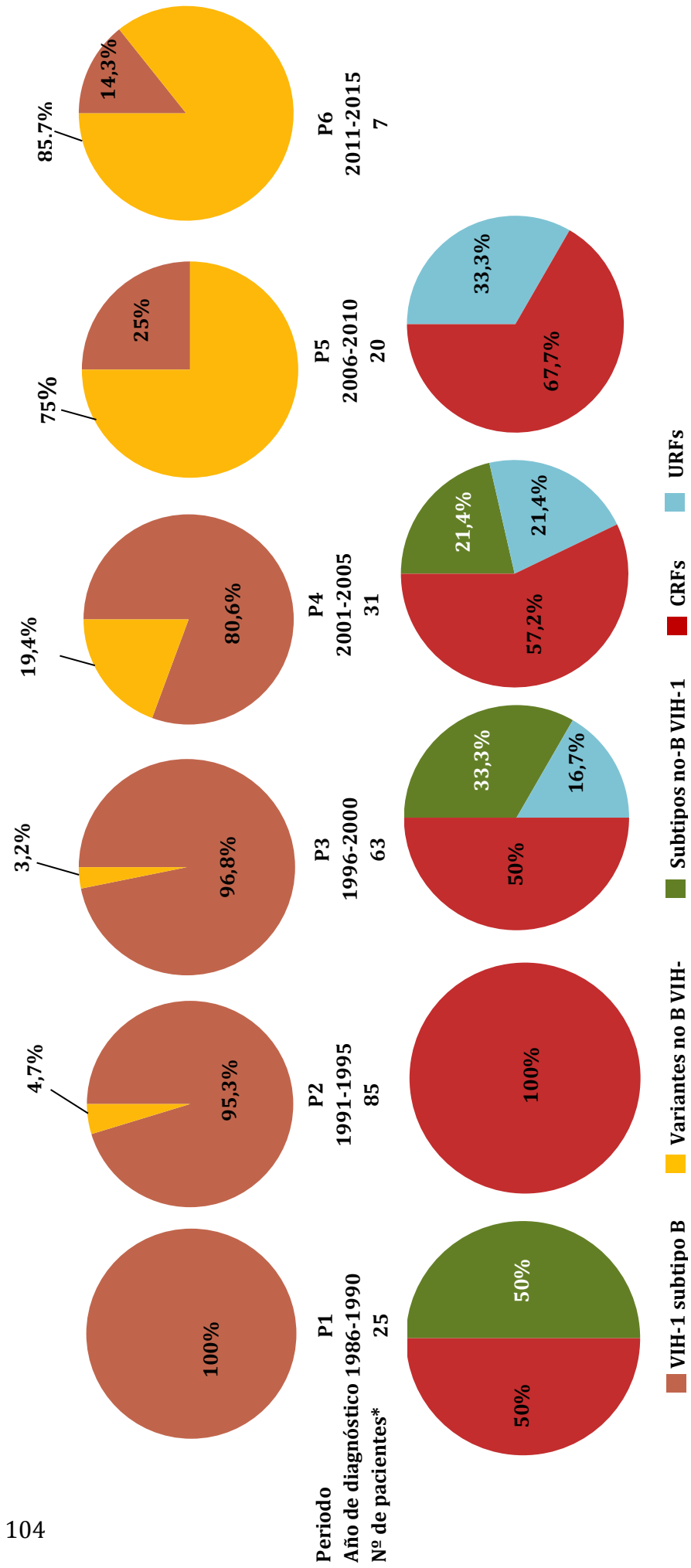
A) Por año de secuencia



B) en la Cohorte completa



C) Periodos de tiempo de diagnóstico



A) Distribución de variantes del VIH-1 por periodos de tiempo (1993- marzo 2016); B) por año de diagnóstico; C) por periodo de tiempo hasta el año 2015. El año de secuencia era desconocido en 4 pacientes, 2 con URF con B y 2 con URF con C. En más detalle, las variantes por periodos en el panel C fueron: en P1 (1986-1990): 25B; en P2 (1991-1995): 81B, 1CRF02_AG, 1A2, 1H, y 1CRF39_BF; en P3 (1996-2000): 61B, 1CRF02_AG, y 1 CRF12_BF; en P4 (2001-2005): 25B, 3CRF02_AG, 2C, y 1URF con D; en P5 (2006-2010): 5B, 6CRF02_AG, 2F1, 1A1, 1C, 1URF con C, 1URF con G, 1URF con D, 1URF con C, 1URF con G, 1CRF13_cpx, y 1CRF43_02AG; en P6 (2011-2016): 1CRF02_AG, 1CRF12_BF, 1URF con G, 1CRF36_cpx, 1CRF11_cpx, 1URF con B, y 1B. La tasa de pacientes extranjeros con subtipo B fueron las siguientes: P1 (0%), P2 (4,7%), P3 (12,7%), P4 (22,6%), P5 (80%) y P6 (50%). La tasa de pacientes extranjeros con variantes no-B por periodo fueron las siguientes: P1 (0%), P2 (25%), P3 (12,5%), P4 (42,8%), P5 (87,5%) and P6 (80%). No se tiene diagnóstico informado entre enero y marzo 2016.

DISCUSIÓN

En este capítulo se describen las tendencias temporales de las mutaciones de resistencia y variantes del VIH-1 en población pediátrica *naive* y pretratada, adscrita a la Cohorte de Madrid incluyendo a todos los 245 niños y adolescentes con datos de resistencia durante casi 25 años (1993-2016). La tasa global de MRT (26%), encontrada en esta Cohorte durante los años 1993-2016, fue superior a la publicada antes (13,6%) y después (40%) del año 2010 (de Mulder et al., 2012a), siendo incluso mayor a la encontrada en la Cohorte de Adultos con infección por VIH-1 de la Red de Investigación de Sida en España (CoRIS) durante el período 2007-2010 (8,6%) (Monge et al., 2012), 2011-2013 (6,9%) (Monge et al., 2012) o 2014 -2015 (7,6%) y también superior a la observada en la mayoría de las cohortes pediátricas a nivel mundial (Rojas & Holguín, 2014). La elevada prevalencia de MRT en los virus que infectan a los pacientes pediátricos *naive* de la Cohorte de Madrid podría explicarse por la prescripción de terapias subóptimas (basadas en monoterapia o biterapia) en las madres infectadas por VIH-1 en España o debido a la ausencia de tratamientos altamente eficaces para suprimir la viremia durante el embarazo, el parto o la lactancia, en el caso de madres extranjeras procedentes de países de recursos limitados. Desafortunadamente, la historia clínica relacionada con las pautas farmacológicas de las madres de los niños o adolescentes con MRT no estaba disponible en el momento del estudio.

La prevalencia de MDR (73,2%) observada en los pacientes pediátricos tratados, fue superior a la reportada en otros estudios europeos (Foster et al., 2014). Alrededor de 1 de cada 4 pacientes de la Cohorte (24,4%) durante el periodo 2000-2011 presentó virus resistentes a las tres familias principales de fármacos (Rojas et al., 2015), tasa similar a la encontrada en otras cohortes europeas pediátricas (12-32%) (Chakerboki et al., 2008; Bertangolio et al., 2012; Foster et al., 2014). Ya se había visto que los adolescentes infectados por VIH-1 durante los primeros años de la epidemia y transferidos para su seguimiento clínico a unidades de adultos presentaron una mayor tasa de MDR que los niños en seguimiento clínico en unidades pediátricas (de Mulder et al., 2014). Los virus con mutaciones de resistencia que infectaban a los niños y adolescentes incluidos en nuestra Cohorte durante los años 2010-marzo 2016, mantuvieron una elevada susceptibilidad predicha a varios ARV (principalmente a la mayoría de los IP), considerando los cerca de 20 ARV aprobados o bajo evaluación de uso en población pediátrica (AIDS info, 2015; EMA, AEMPS, **Anexo I**). Este resultado sugiere que estos ARV podrían ser excelentes candidatos a incluir en los futuros regímenes de TAR pediátricos.

En este capítulo hemos mostrado diferentes tasas de sensibilidad a los fármacos ARV según las mutaciones fijadas en los virus y en diferentes periodos. Esta variación de la susceptibilidad es un reflejo del cambio de pautas en el TAR en función de las opciones disponibles a lo largo del tiempo y según el año de aprobación de los fármacos para su uso pediátrico en España durante las últimas décadas (leyenda **Figura 3.3**). La susceptibilidad conservada a todos los ITINAN e IP antes del año 1999 (a pesar de la existencia de virus resistentes en este periodo) puede explicarse porque la mayoría de los regímenes entonces se basaban en mono o biterapia con ITIAN. Lopinavir/r, el IP más utilizado en niños, así como todos los ITINAN, fueron aprobados en España después del año 1999 para su uso en población pediátrica (leyenda **Figura 3.3**). La aparición de virus resistentes con bajo nivel de resistencia a ITINAN, aparecieron después 1998, año de aprobación de los dos ITINAN: NVP y NFV. El uso de Truvada (TDF + FTC) y EFV en pacientes pediátricos, tras su aprobación en España en 2006, (EMA, AEMPS, **Anexo I**) podría explicar la mayor tasa de resistencia a FTC y EFV en el último período de estudio en comparación con los periodos anteriores.

El subtipo B del VIH-1 representa el 12% de las infecciones mundiales y es frecuente en las zonas más industrializadas, como América del Norte y Europa Occidental, incluyendo España (Monge et al., 2012, Yebra et al., 2011, Yebra et al., 2012). No obstante, en este capítulo, se ha confirmado que el subtipo B del VIH-1 es el más prevalente en la Cohorte pediátrica de Madrid, tal y como se ha observado anteriormente en la población adulta de la misma ciudad (Yebra et al., 2011; Holguín et al., 2008c; González Alba et al., 2011). Encontramos que un 14,5%, las infecciones en la Cohorte pediátrica ocurrían por variantes no-B del VIH-1, aumentado a más del 75% en la última década, probablemente debido al aumento de niños procedentes de países extranjeros. Además, la prevalencia de las nuevas infecciones por variantes no-B del VIH-1 también se ha visto incrementada en población adulta procedente de países desarrollados (Thomson et al., 2007), entre los cuales se incluye España (Yebra et al., 2012, González Alba et al., 2011), así como pacientes extranjeros diagnosticados en este país (Holguín et al., 2008c) o en otros países europeos (Descamps et al., 2010, Neogi et al., 2014).

Las variantes no-B del VIH-1 están empezando a ser cada vez más frecuentes en los países que presentan una mayor tasa de nuevas infecciones, tanto en pacientes adultos como pediátricos. Es interesante observar que más del 76,5% de los virus con variantes no-B que infectan a niños y adolescentes en la Cohorte de Madrid son formas recombinantes inter-subtipo, tal y cómo se observó en la población adulta de España (Yebra et al., 2012),

contribuyendo a la creciente heterogeneidad de la epidemia del VIH-1 en nuestro país, así como en la pandemia (Zhang et al., 2010). El gran aumento de formas recombinantes únicas entre los niños nativos e inmigrantes nacidos en Madrid después del año 2000 refleja la complejidad cada vez mayor entre variantes genética del VIH-1 en nuestro país. En los últimos años, esta nueva heterogeneidad se ha traducido en la aparición de un número cada vez mayor de CRF y URF en Europa occidental. Tradicionalmente, la localización de estas cepas complejas se limitaba a los puntos de acceso para determinadas regiones donde existía una mayor circulación de variantes no-B, como por ejemplo, el África Subsahariana, el sudeste de Asia y ciertas partes de América del Sur. Estos nuevos recombinantes europeos incluyen las formas CRF47_BF y CRF73_BG en España (Fernández García et al., 2016), CRF50_A1D en el Reino Unido (Foster et al., 2014), CRF56_cpx en Francia (Leoz M et al., 2013), CRF60_BC en Italia (Simonnetti et al., 2014) y CRF73_BG en Portugal (Fernández García et al., 2016), así como una nueva generación de cepas con recombinantes más complejos (Galimand et al., 2010).

La principal limitación de nuestro estudio radica en la ausencia de datos de mutaciones de resistencia en nuestra Cohorte antes del año 1993. Esto se debe, principalmente, a que en esta época la secuenciación automática para la monitorización de las mutaciones de resistencia no estaba implementada en la rutina clínica en los hospitales de seguimiento. Además, las muestras de plasma de niños infectados por VIH-1 antes de 1993 no se almacenan en los hospitales y no siempre han estado disponibles en el BioBanco de VIH-1 de la Comunidad de Madrid, puesto en marcha posteriormente.

Los resultados del trabajo descrito en este capítulo han sido aceptados para publicar como artículo de investigación, incluido en el **Anexo III**: Rojas Sánchez P, Dominguez S, Jiménez de Ory S, et al. (2016) Trends in drug resistance prevalence, HIV-1 variants and clinical status in HIV-1- infected paediatric population in Madrid: 1993-2015 Analysis. Aceptado en *Pediatrics Infection Disease Journal*

CAPÍTULO 4

**IMPACTO DE LOS PARÁMETROS CLÍNICOS EN LA EVOLUCIÓN INTRA-
HUÉSPED DEL VIH-1 SUBTIPO B EN PACIENTES PEDIÁTRICOS DE
MADRID**

ANTECEDENTES

Casi todos los estudios acerca de los factores clínicos que determinan la diversidad genética del VIH-1 se han realizado en pacientes adultos. Sin embargo, el VIH-1 no necesariamente tiene que evolucionar del mismo modo en niños y adultos infectados, ya que la infección pediátrica presenta características clínicas propias, tal y como se indicó en la introducción de esta Tesis. Por ello, resulta imprescindible conocer la importancia relativa de los factores clínicos para entender cómo éstos pueden afectar a la evolución del VIH-1, lo que podría ayudar a diseñar TAR más eficientes (Lemey et al., 2006). No obstante, este tipo de análisis son escasos en la literatura y se limitan a estudiar, como máximo, dos variables clínicas (Carvajal-Rodríguez et al., 2008; Castro-Nallar et al., 2012). En este capítulo se analiza la importancia relativa de 28 factores clínicos en la evolución molecular del subtipo B del VIH-1 (HIV-1B), con el fin de entender mejor la dinámica de la evolución viral de este subtipo (mayoritario en la población de estudio, tal y como se observó en el Capítulo 3 de esta Tesis) en el transcurso de la infección en población pediátrica. Para llevar a cabo este estudio, se estimó la distancia genética y presión de selección del VIH-1 en 24 niños infectados perinatalmente de la Cohorte de Madrid. Se emplearon secuencias *pol* del VIH-1 de cada niño disponibles durante su seguimiento clínico, recopilando los parámetros clínicos asociados con la progresión de la enfermedad (incluyendo recuento y porcentaje de linfocitos T CD4 y T CD8, CV, edad del paciente, MDR y la exposición a TAR). Se analizó la relación entre la evolución viral, las MDR y los parámetros clínicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

Tal y como se expuso en capítulos previos de esta Tesis, la Cohorte de Madrid de los niños y adolescentes infectados por VIH-1 está formada por 561 niños infectados por VIH-1 registrados hasta mayo de 2016. Para este estudio, se seleccionaron todos los pacientes de la Cohorte infectados perinatalmente por VIH-1B y de los que se tuviese tres o más secuencias parciales del gen *pol* recogidas en un intervalo de, al menos, dos años. Siguiendo estos criterios de inclusión, un total de 24 niños fueron incluidos en el estudio (**Tabla 4.1**).

Secuencias de VIH-1B

Se copilaron un total de 162 secuencias parciales del gen *pol* de VIH-1B de los 24 pacientes incluidos en este estudio. Para cada paciente, se recopiló la primera secuencia basal, una secuencia intermedia y la última secuencia disponible. Estas secuencias

presentaban una diferencia de tiempo de 2,2 a 20,3 años (media 7,7). En este análisis, se incluyeron de 3 a 24 (media 7) secuencias *pol* parciales por paciente (**Tabla 4.1**), secuenciadas durante 20 años (entre octubre de 1993 y octubre de 2013). La mayoría de estas secuencias se habían publicado previamente, y estaban disponibles en nuestro laboratorio (Mulder et al., 2011, Mulder et al., 2012; Rojas et al., 2015).

La extracción, amplificación y secuenciación del ARN viral se realizó sobre la región codificante del gen *pol* (1.002 nucleótidos, nt) del VIH-1, incluyendo la región codificante de la PR completa (99 aminoácidos, aa) y una región codificante parcial de la TI (correspondiente a los primeros 235 aa), tal y como se ha descrito previamente en el capítulo primero de esta Tesis. Para este estudio, sólo 7 (4,3%) de las 162 secuencias fueron generadas a partir de muestras de plasma infectadas por VIH-1B y proporcionadas por el BioBanco de VIH integrado en la RIS (**Anexo I**). Los alineamientos de la secuencias en aa se construyeron utilizando el programa MUSCLE 3.7 (Edgar, 2004), y se editaron manualmente utilizando el programa MEGA 6.0.6 (Tamura et al., 2013).

Análisis de MDR y MRT

Las MDR en población pediátrica pretratada e infectada por VIH-1B se definieron de acuerdo con el listado estadounidense IAS-USA-2015 (**Anexo I**) y usando el algoritmo de *Stanford HIVdb* (**Anexo I**). La prevalencia de MRT a fármacos ARV en la población pediátrica *naive* se definió según la lista recomendada por la OMS (Benett et al., 2009) y usando la herramienta CPR de *Stanford HIVdb* (**Anexo I**). La susceptibilidad de cada fármaco ARV se predijo utilizando el algoritmo de *Stanford HIVdb* (**Anexo I**) y en base a la calificación recibida para cada mutación de resistencia fijada en el virus se establecieron cuatro categorías de susceptibilidad para cada fármaco ARV: 1) susceptible, 2) nivel bajo de resistencia, 3) nivel intermedio de resistencia y 4) nivel alto de resistencia.

Análisis de distancias genéticas y presión de selección

La diversidad genética (d) se calculó usando el programa MEGA 6.0.6 (Tamura et al., 2013) mediante la aplicación del modelo de sustitución nucleotídica Kimura-2-parámetros, siendo este el mejor modelo obtenido mediante jModelTest 2.1.8 (Darriba et al., 2012). Para calcular el error estandar (ES) de cada medida se aplicó un re-muestreo tipo *bootstrap* con 1.000 repeticiones. El valor de presión de selección (d_N/d_S) se obtuvo como la relación entre el número medio de sustituciones nucleotídicas no sinónimas (d_N) y sinónimas (d_S) por sitio, calculados mediante el método Pamilo-Bianchi-Li implementado en MEGA 6.0.6. También se obtuvieron los valores individuales de d_N y d_S y la relación d_N/d_S para cada codón

en las diferentes secuencias parciales del gen *pol*, utilizando diferentes métodos implementados en el programa HYPHY (Single Likelihood Ancestor Counting; FEL, Fixed Effects Likelihood; IFEL, Internal Fixed Effects Likelihood; REL, Random Effects Likelihood; FUBAR, Fast Unbiased Bayesian Approximation) (Kosakovsky et al., 2005). Así pudimos determinar si cada codón se encontraba bajo selección negativa ($d_N/d_S < 1$), neutra ($d_N/d_S = 1$) o positiva ($d_N/d_S > 1$). Estos análisis se realizaron después de la confirmación de la ausencia de secuencias recombinantes en nuestra base de datos mediante el uso de cuatro métodos diferentes disponibles en el paquete RDP4: RDP, GENECONV, BootScan, y Quimera, y empleando los parámetros seleccionados por defecto (Martin et al., 2015).

Parámetros clínicos, epidemiológicos y virológicos analizados

Para realizar este estudio se incluyeron 28 parámetros diferentes: cinco parámetros virológicos (MDR, MDR a ITIAN, MDR a ITINAN, MDR a IP y CV), cinco parámetros clínicos (recuento y porcentaje de linfocitos T CD4 y CD8 y ratio CD4/CD8) y 18 parámetros epidemiológicos origen, año de la infección (considerado como el año de nacimiento), año de diagnóstico del VIH-1B, edad al diagnóstico del VIH-1B, coinfección por el VHB o VHC, año de la secuencia del virus, edad del paciente cuando se realizó la secuenciación del virus, TAR (*naive* o tratado), año a la toma del primer TAR edad al primer TAR, número de regímenes previos, número de fármacos utilizados y experiencia de la familia de fármacos ITIAN, ITINAN, IP, inhibidor de la fusión (IF) e inhibidor de la INT)

Métodos de clasificación supervisados

Para analizar la importancia relativa que presentan los factores clínicos en la evolución del VIH-1B, se aplicaron métodos de clasificación supervisada. Se construyeron modelos multivariantes utilizando los parámetros evolutivos del VIH-1B (d , d_N , d_S) y la frecuencia de MDR como variables a predecir. Los parámetros clínicos analizados en este capítulo fueron considerados variables predictoras. Para construir los modelos, se categorizaron algunas de las variables continuas, con el fin de aumentar el poder predictivo de los modelos. Los parámetros evolutivos del VIH-1B se agruparon en tres categorías diferentes, de acuerdo con tres terciles de distribución formados por los valores de cada variable y quedaron configurados de la siguiente manera: para d : $<0,011$; $0,011-0,022$; $>0,022$; para d_N : $<0,007$; $0,007-0,0019$; $>0,019$; para d_S : $<0,002$; $0,002-0,075$; $>0,075$). Los datos relacionados con MDR también se discretizaron en dos categorías (presencia o ausencia), considerando las diferentes MDR por separado (ITIAN, ITINAN e IP) así como la presencia de MDR a cualquiera de las 3 familias. Los parámetros clínicos, tales como recuento y porcentaje de

linfocitos T CD4 y T CD8, CV, edad a la fecha de la secuencia y edad al momento del diagnóstico, también se discretizaron de acuerdo con las recomendaciones de *Centers for Disease Control* (CDC, 1994). Las categorías para estas variables se muestran en las **Tabla 4.1** y **Tabla 4.2**.

Para evaluar la contribución de cada factor clínico, mediante el método *wrapper*, se analizó, en primer lugar, la fuerza de 6 algoritmos (clasificadores) con el fin de encontrar el mejor modelo predictivo: árbol de clasificación (árbol J48), vecino más cercano (IB- 1 y IB-K, donde K = 3), método de regresión logística y dos algoritmos bayesianos (*Naive Bayes* y *tree-augmented Naive Bayesian Network* o TAN). Para evaluar la bondad de cada uno de estos 6 algoritmos o clasificadores, se obtuvieron las medidas siguientes: matriz de confusión, tasa de verdaderos positivos (TP) y verdaderos negativos (TN), precisión, cobertura (mide la proporción de variables correctamente clasificados respecto al total de variables) medida de F (caracteriza con único valor la bondad de un clasificador o algoritmo, siendo su fórmula: $F=2*Precisión*Cobertura/(Precisión+Cobertura)$) y el área bajo la curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*). La curva ROC es una representación gráfica de la sensibilidad frente a la especificidad para un sistema de clasificación binario. Cuanto mayor sea el área (>0,75) mejor será la separación de datos. Es importante destacar que esta representación es independiente de la existencia de muestreo desequilibrado. Todos estos métodos están implementados en el software Weka (Hall et al, 2009).

Con el fin de eliminar variables irrelevantes que pudiesen introducir un sesgo en los modelos de predicción, se implementó la herramienta FSS (*Feature Subset Selection*) utilizando tres técnicas diferentes: 1) dos algoritmos univariantes (InfoGainAttributeEval y GainRatioAttributeEval), cuya finalidad consiste en explorar la importancia de cada variable por separado en el conjunto de datos. 2) un algoritmo multivariante de correlación CFS (*Correlation Feature Selection*), que tiene como objetivo predecir el valor de cada variable individual en función del mejor subconjunto de características, usando un algoritmo de inducción como parte de la función de evaluación. 3) el método *wrapper*, basado en un algoritmo de aprendizaje que utiliza su método de predicción para evaluar la utilidad relativa de los subconjuntos de variables.

RESULTADOS

Características clínicas, epidemiológicas y virológicas de la población de estudio

Las características clínicas y epidemiológicas basales de los 24 pacientes adscritos a la Cohorte de Madrid de niños y adolescentes infectados por VIH-1B niños y adolescentes que cumplían criterios de inclusión se muestran en la **Tabla 4.1**. La mayoría de los pacientes eran españoles (91,7%), varones (62,5%), y habían sido diagnosticados antes del año 2000 (83,3%). Tenían una edad media de 3 años cuando recibieron el primer TAR y estaban en seguimiento clínico en unidades pediátricas (**Tabla 4.1**). La edad media cuando se recuperó la primera secuencia del virus fue de 8,8 años (rango 0,3 a 18,8 años) y la edad media en el momento de toma de la última muestra secuenciada disponible fue de 16,8 años (rango 5-23,9).

Tabla 4.1. Principales características clínicas y epidemiológicas de los sujetos de estudio.

Característica	Pacientes	
Transmisión vertical de VIH-1B	24	
Infección por VIH-1B	24	
Género	Masculino	15
	Femenino	9
País de origen	España	22
	Guatemala	1
	Perú	1
Año de infección (año de nacimiento)	1984-1989	7
	1990-1999	15
	2000-2002	2
Año de diagnóstico de infección por VIH-1	1984-1989	1
	1990-1999	19
	2000-2004	4
Edad media en años (rango)	Al diagnóstico por VIH-1 ^{a§}	1,7 (0,1-8,6)
	En el primer TAR ^b	3 (0,1-8,5)
	En secuencia basal ^a	8,8 (0,3-18,8)
	En la última secuencia	16,8 (5-23,9)
Nº medio de secuencias/pacientes (rango)	7 (3-21)	
Años entre la primera y última secuencia (rango)	7,7 (2,2-20,3)	

TAR, tratamiento antirretroviral. Dato desconocido en 5^a, 1^b o 4^c pacientes, respectivamente. [§]Trece (68%) niños fueron diagnosticados antes del primer año de vida, 3 (15,8%) fueron diagnosticados entre el primer y el cuarto año de vida y dos niños se diagnosticaron entre el cuarto y noveno año de vida.

Las características clínicas y virológicas de los 24 pacientes estaban disponibles en el primer informe clínico (datos basales o a fecha de toma de la primera muestra secuenciada) y en el último (**Tabla 4.2**). La tasa de pacientes con niveles indetectables de CV (≤ 50 cop./ml) aumentó del 8,3% al 17,4% ($\chi^2=3,73$; p -valor=0,052). El número de pacientes con recuentos de CD4 bajos (< 500 céls/mm³) también aumentó (de 33,3% a 60,7%) de forma significativa ($\chi^2=4,52$; p -valor=0,033) (**Tabla 4.2**).

Tabla 4.2. Características clínicas de los 24 pacientes con seguimiento longitudinal.

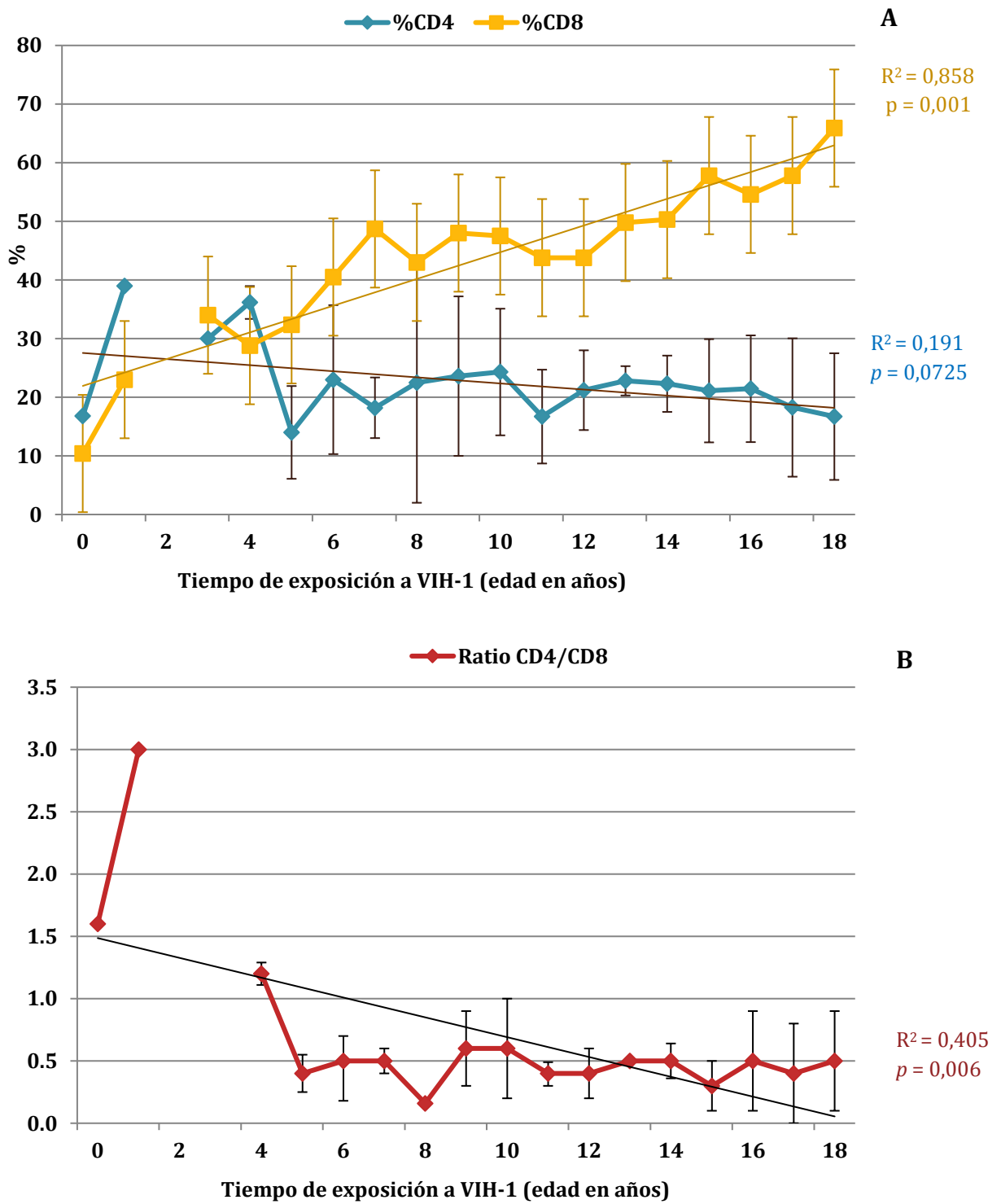
Características	Nº de pacientes	
	En secuencia basal	En último seguimiento clínico
Seguimiento clínico		
Unidades Pediátricas	24	11
Unidades de adultos	0	9
Prdida de Seguimiento	0	1
Fallecidos	0	1
Desconocidos	0	2
Tratamiento		
<i>Naive</i>	2	0
Tratados	22	24
Media de regímenes diferentes (rango)		
	3,4 (0-12)	5,9 (2-12)
01-Feb	9	1
03-Jun	10	14
07-Dec	2	6
Desconocido	3	3
Media de ARV previos (rango)		
	5,9 (0-18)	9,7 (5-18)
<3	3	0
03-Jun	12	4
Jul-13	5	15
>13	1	4
Desconocido	3	1
Nº de MDR		
Total	126	147
A ITIAN	71	79
A ITINAN	21	34
A IP (major)	34	34
T CD4 cels/mm³		
<350	3	10
350-500	4	4
501-1,000	11	8
1,001-1,500	1	1
>1,500	2	0
Desconocido	3	1

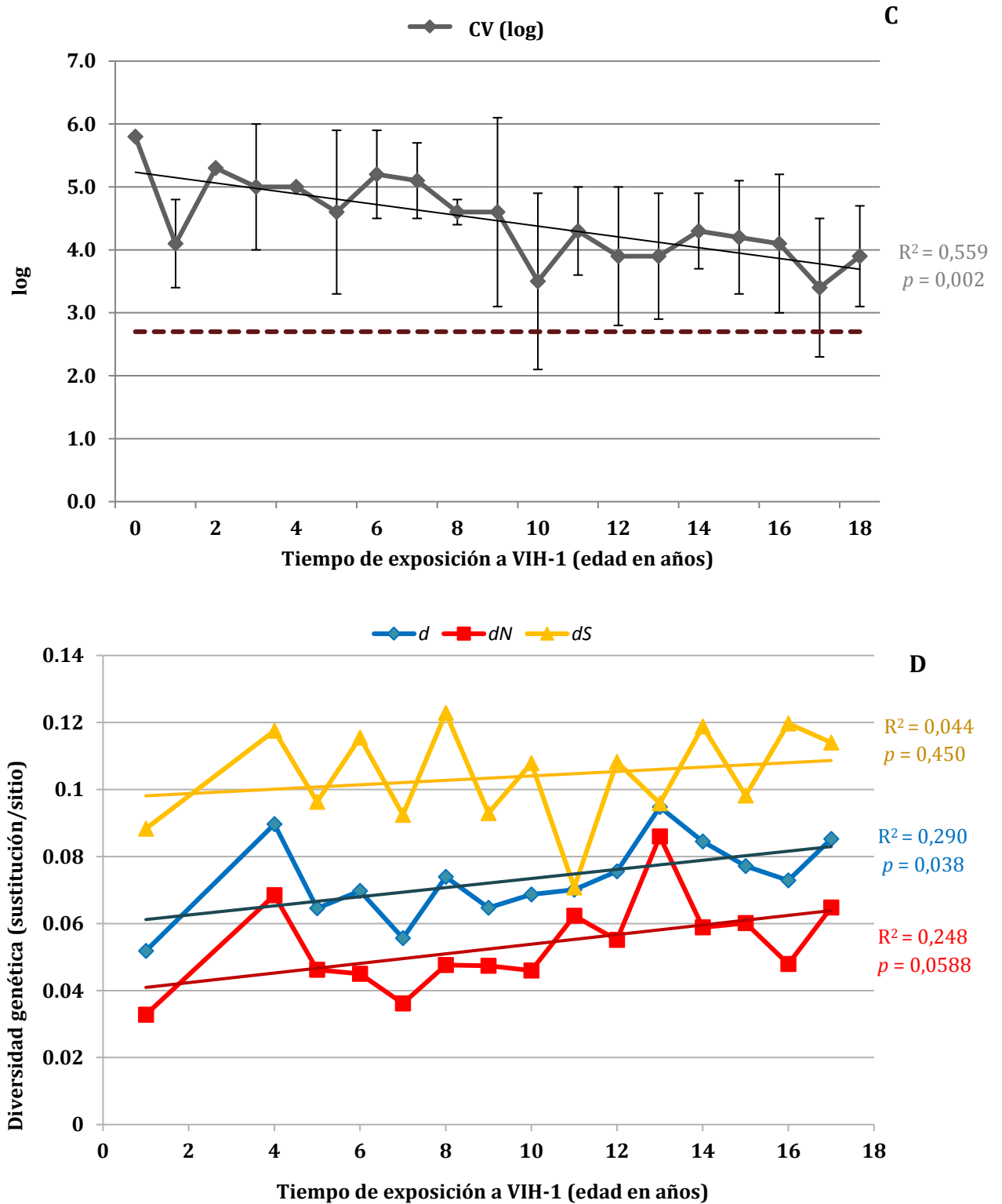
% TCD4		
<25%	12	16
25-50%	10	7
>50%	0	0
Desconocido	2	1
T CD8 cels/mm³		
<350	1	1
350-500	0	0
501-1,000	3	5
1,001-1,500	7	5
>1,500	5	6
Desconocido	8	7
Media de Ratio CD4/CD8 (Rango)	0,8 (0,1-3) ^a	0,4 (0,06-0,9) ^b

AVR, antirretroviral; MDR, mutaciones de resistencia; ITIAN, inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleós(t)idos; ITINAN, inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleós(t)idos; IP, inhibidor de la proteasa. Datos desconocidos en 8^a y 7^b pacientes, respectivamente,

Adicionalmente, se analizó el cambio en la tasa de linfocitos y en la viremia durante el transcurso de la infección por VIH-1. Para ello, se calcularon los valores medios de los porcentajes de linfocitos T CD4 y T CD8, el ratio CD4/CD8, y la CV a lo largo del tiempo de exposición al VIH-1B. Se observó un aumento en el porcentaje de linfocitos T CD8 respecto al tiempo ($r = 0,93$; p -valor = 0,001) (**Figura 4.1A**), oscilando de un 10% en los recién nacidos, hasta un 65% para el mayor tiempo de exposición al VIH-1B (18 años de edad). Durante el tiempo de seguimiento, se pudo observar una disminución no significativa en el porcentaje de linfocitos T CD4 ($r=-0,44$; p -valor=0,072) (**Figura 4.1B**). El ratio CD4/CD8 alcanzó un máximo valor en los primeros meses de exposición al virus, disminuyendo rápidamente después hasta alcanzar una estabilización de su valor después de 5 años de infección. Se detectó una asociación logarítmica significativa entre el ratio CD4/CD8 y el tiempo de exposición al virus ($r=-0,77$; p -valor=0,006) (**Figura 4.1C y Tabla 4.2**). Finalmente, se pudo observar una disminución de la CV con el tiempo ($r=-0,75$; p -valor=0,002) (**Figura 4.1C**).

Figura 4.1. Correlación entre valores de linfocitos, CV y parámetros genéticos del VIH-1 con el tiempo de exposición al virus.

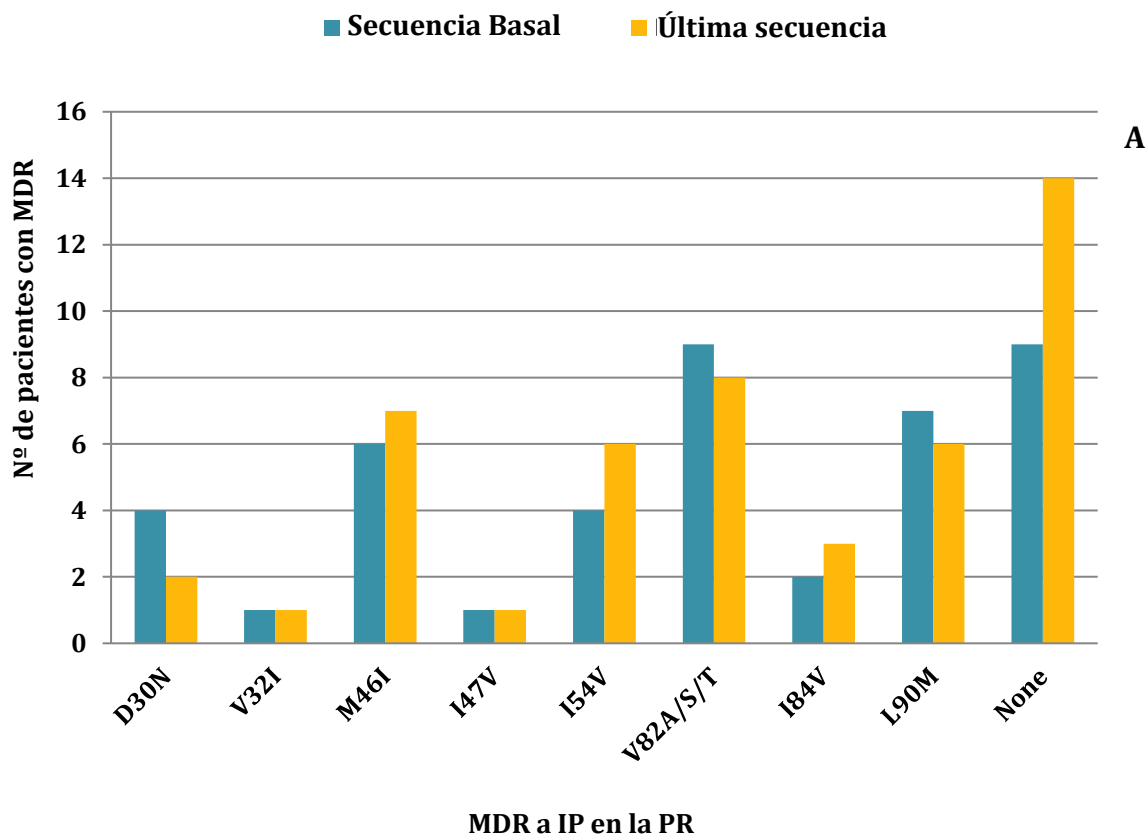


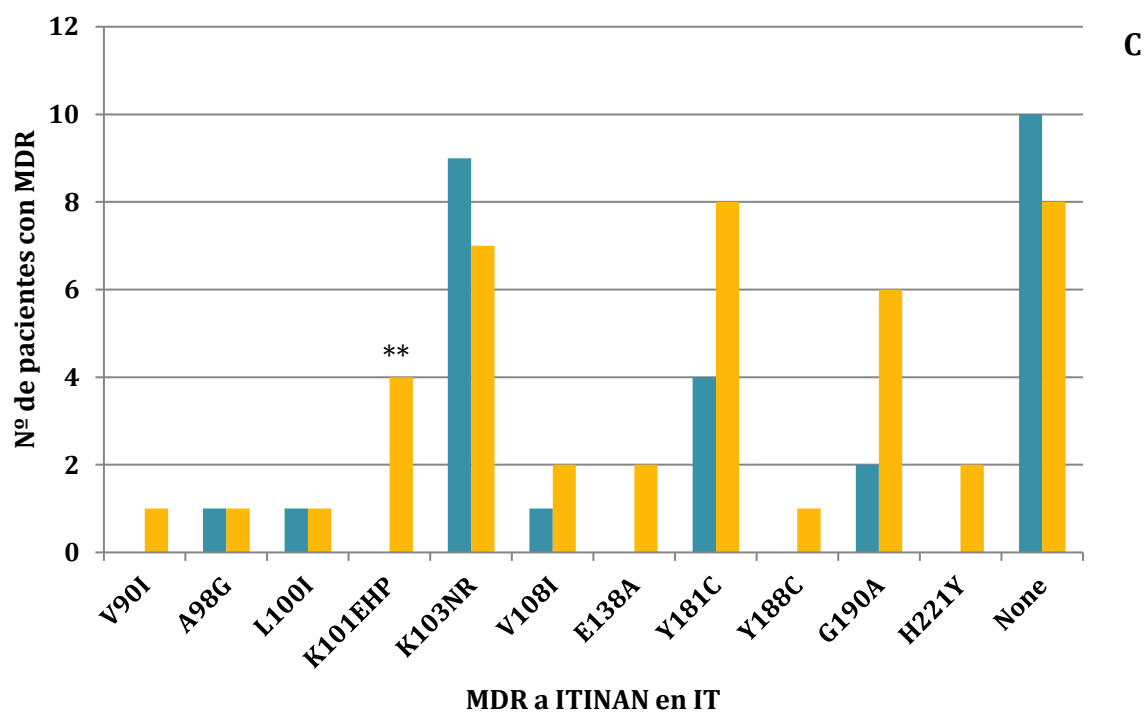
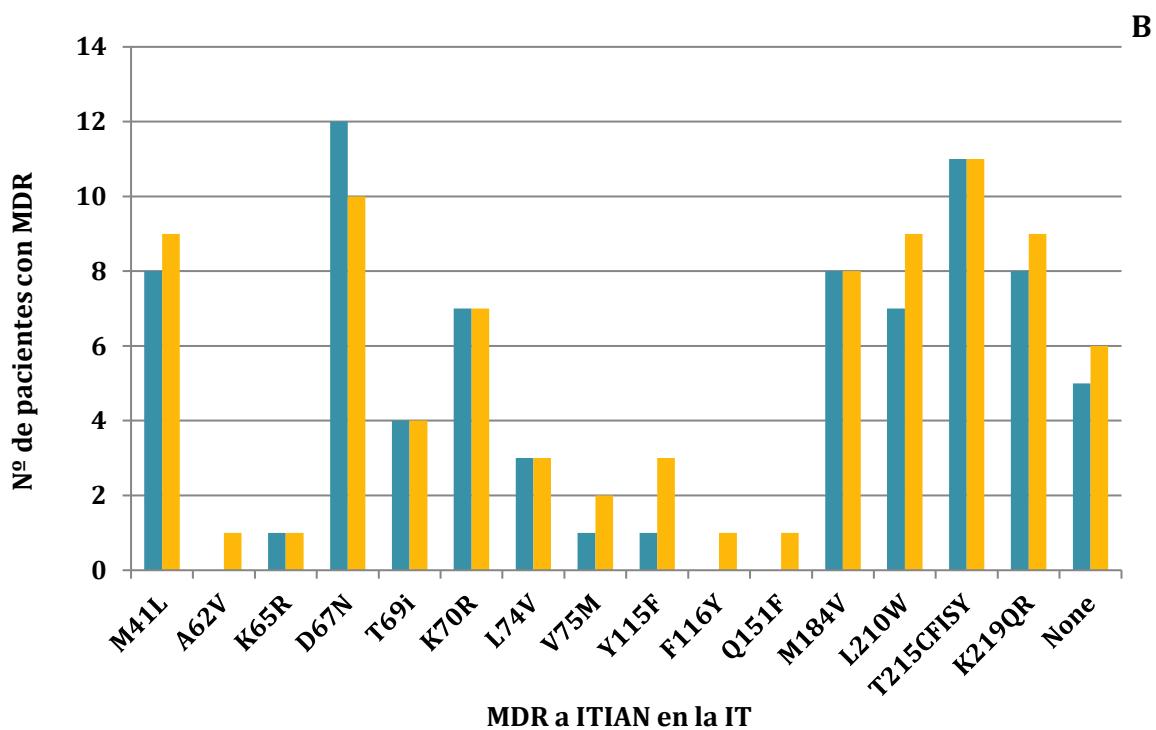


A) Correlación entre el tiempo de exposición al subtipo B del VIH-1 y porcentaje de linfocitos T CD4 y T CD8; **B)** ratio CD4/CD8; **C)** carga viral; **D)** y parámetros evolutivos. Línea discontinua en panel C indica límite de CV indetectable. CV, carga viral; d , distancia genética, d_N , tasa de sustitución no sinónima; d_S , tasa de sustitución sinónima; p , p -valor.

Los 24 pacientes incluidos en este estudio tenían una amplia experiencia a fármacos ARV con un elevado número de regímenes diferentes (**Tabla 4.2**). La mayoría de las secuencias virales analizadas mostraron la presencia de MDR (**Figura 4.2**), manteniéndose estable el número de fijaciones entre la primera y la última secuencia analizada (126/1128 vs. 147/1128; $\chi^2=1,84$; $p\text{-valor}=0,175$) (**Tabla 4.3**). Las MDR más comunes en la última secuencia disponible fueron: D67N (41,6%), T215YF (45,8%), K219QR (37,5%), M184V (33,3%) y L210W (37,5%) a ITIAN en la TI; K103NR (29,2%), Y181C (33,3%) y G190A (25%) a ITINAN en la TI; y V82ATS (33,3%), M46I (29,2%), I54V (25%) y L90M (25%) a IP en la PR (**Figura 4.2**).

Figura 4.2. Número de pacientes con MDR en la primera y última secuencia disponible para los 24 pacientes con seguimiento longitudinal.



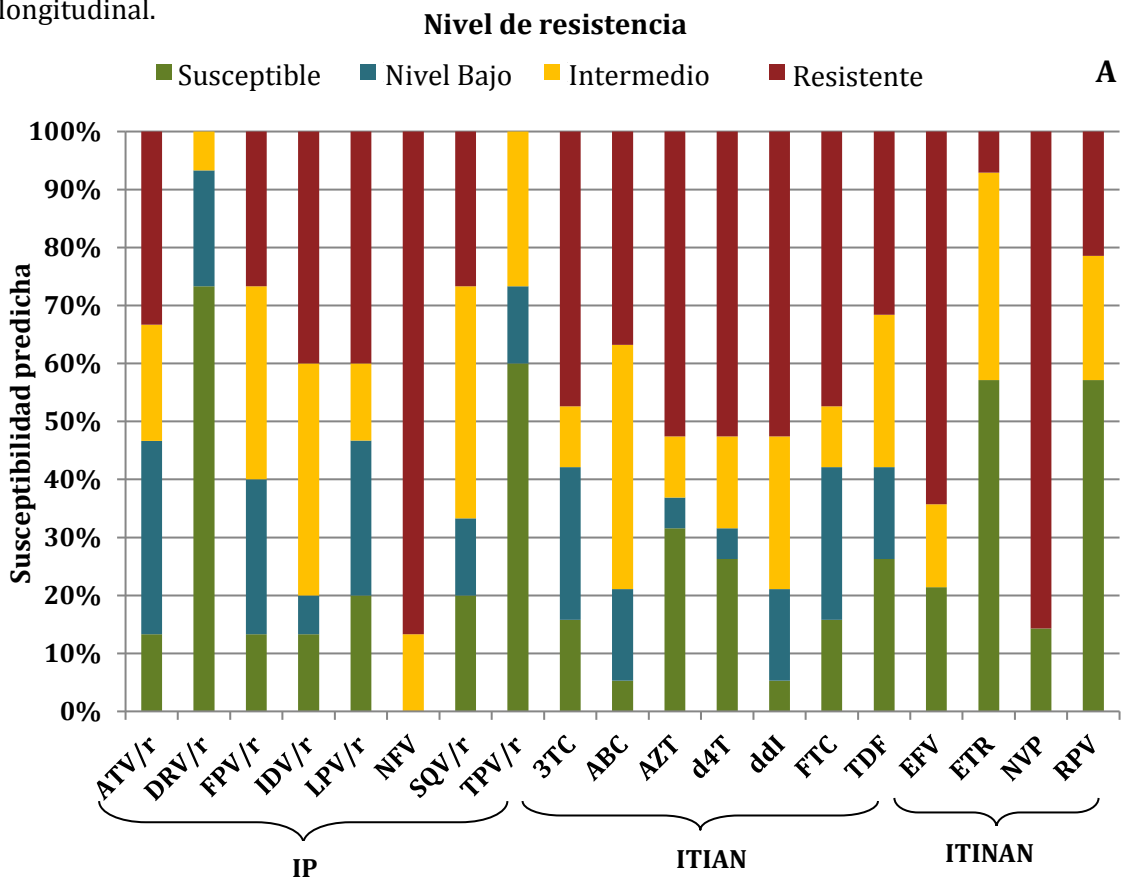


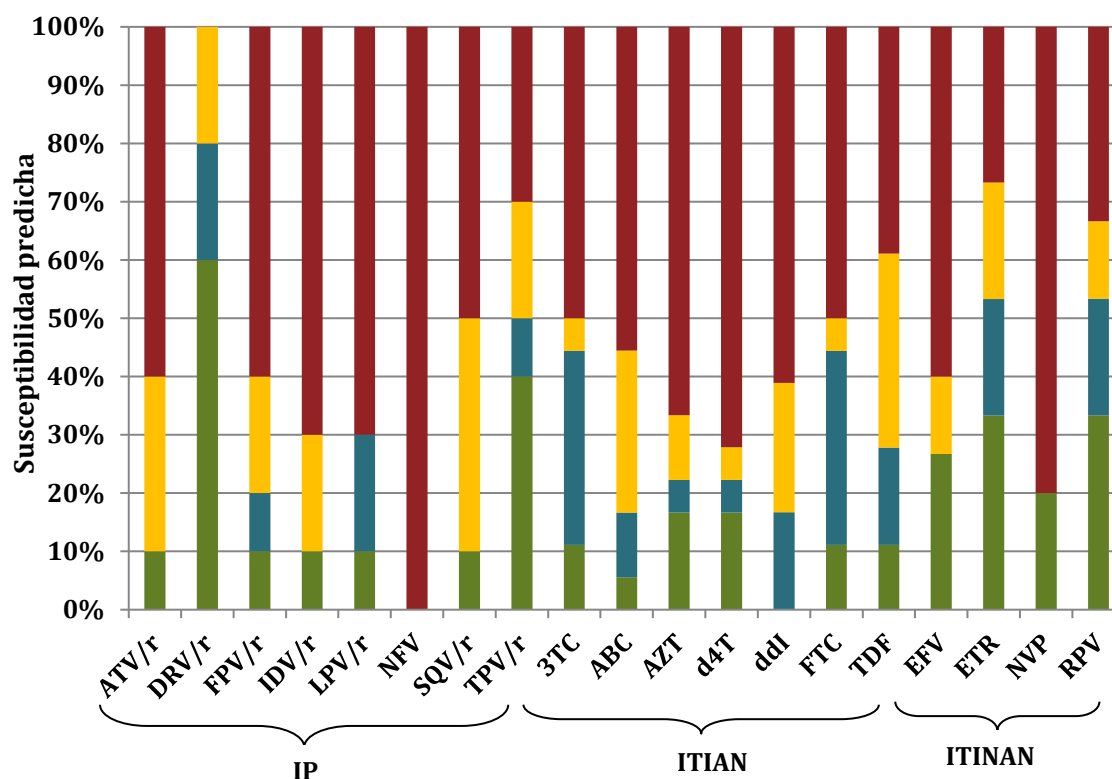
A) MDR a IP; **B)** MDR a ITIAN; **C)** MDR a ITINAN, en los 24 pacientes infectados por VIH-1 subtipo B con seguimiento longitudinal con primera y última secuencia disponible. **diferencias estadísticas (p -valor <0.05) en las MDR encontradas entre la secuencia basal y la última disponible. MDR, mutaciones de resistencia; IP, inhibidor de la proteasa; ITIAN, inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleós(t)idos; ITINAN, inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleós(t)idos.

Cuando se analizaron las MDR a las tres familias de ARV por separado, se pudo observar que la tasa pacientes infectados con virus resistentes se mantenía constante en el tiempo para los ITIAN (57,3% vs. 53,7%; $\chi^2=0,14$; p -valor=0,724) e IP (27,4% vs. 23,1%; $\chi^2=0,49$; p -valor=0,476). Se observó un incremento significativo en la tasa de los pacientes con virus resistentes a ITINAN (12,3% vs. 23,1%; $\chi^2=3,95$; p -valor=0,044). A pesar de la presencia de MDR en la secuencia viral, algunos niños resultaron ser susceptibles a algunos de los nuevos ARV, como DRV/r en seis niños, TPV/r en cuatro y ETR y RPV en cinco pacientes, según el algoritmo de predicción de *Stanford HIVdb* (Figura 4.3).

Durante el tiempo de muestreo comprendido entre la secuencia basal y la última secuencia analizada (promedio de 7,7 años, **Tabla 4.3**), se pudo observar que en 8 (33,3%) de los 24 niños se produjo reversión de virus con MDR a virus wt para, al menos, una familia ARV. En más detalle, las MDR a IP, ITINAN e ITIAN revertieron a wt en cinco, cuatro y dos niños, respectivamente (**Tabla 4.3**). Uno de los dos niños con secuencia viral disponible antes de presentar experiencia a ARV fue infectado con virus resistentes a IP e ITIAN, habiéndose fijado los cambios V82A en el PR y L210W y T215S en la TI de sus virus (Figura 4.2).

Figura 4.3. Susceptibilidad predicha para los pacientes con MDR y seguimiento longitudinal.





A) Pacientes con MDR a IP (n=15), a ITIAN (n=19) o a ITINAN (n=14) en la primera secuencia *pol* disponible; **B)** Pacientes con MDR a IP (n=10), a ITIAN (n=18) o a ITINAN (n=16) en la última secuencia (disponible después de un tiempo medio entre secuencias de 7,7 años (rango 2,2-20,3 años). MDR, mutaciones de resistencia; IP, inhibidor de la proteasa; ITIAN, inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleós(t)idos; ITINAN, inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleós(t)idos; ATV, atazanavir; DRV, darunavir; FPV, fosamprenavir; IDV, indinavir; NFV, nelfinavir; SQV, saquinavir; TPV, tipranavir; /r IP potenciado con ritonavir; 3TC, lamivudina; ABC, abacavir; AZT, zidovudina; d4T, estavudina; ddI, didanosina; FTC, emtricitabina; TDF, tenofovir; EFV, efavirenz; ETV, etravirina; NVP, nevirapina; RPV, rilpivirina. Código de colores: verde, susceptible; azul, nivel bajo de resistencia; amarillo, nivel intermedio de resistencia; rojo, alto nivel de resistencia.

Tabla 4.3. Evolución de las MDR en los 24 pacientes pediátricos con seguimiento longitudinal durante un tiempo medio de 7,7 años entre la primera y última secuencia disponible.

Pacientes	MDR			Tiempo medio (años)
	A IP (nº de IP <i>minor</i>)	A ITIAN	A ITINAN	
P1	L90M	L74V, M184V	Ninguna	13,8
P1*	D30N, I54V, V82A, I84V	M41L, K65R, K70R, V75I, Y115F, F116Y, Q151M, K219E	K101P, G190A	
P2 §	Ninguna (0)	Ninguna	Ninguna	20,2
P2*	Ninguna (3)	Ninguna	V79L, Y181I	
P3	D30N (7)	D67N, K70R, T215F, K219Q	Ninguna	4,4
P3*	Ninguna (3)	Ninguna	K103N	
P4 §	V82A(4)	L210W, T215S	Ninguna	4,7
P4*	Ninguna (3)	L201W, T215Y	K101E, E138Q, G190A	
P5	M46I, L90M (3)	M41L, D67N, L210W, T215C	K103N	13

Pacientes	MDR			Tiempo medio (años)
	A IP (nº de IP <i>minor</i>)	A ITIAN	A ITINAN	
P5*	M46I, L90M (4)	M41L, L210W, T215C	Y181S, Y188C	
P6	Ninguna (2)	K65R, K219R	L100I, K103N	9,2
P6*	Ninguna (2)	M184V	Ninguna	
P7	Ninguna (2)	M41L	K103N	8,2
P7*	Ninguna (3)	Ninguna	Ninguna	
P8	V82A (4)	M41L, M184V	Ninguna	11,1
P8*	V82A, L90M (6)	M41L, M184V, L210W, T215Y	E138A	
P9	V32I, M46I, V82A, I84V, L90M	M41L, D67N, L210W, T215Y	V108I, Y181C	9,4
P9*	V32I, M46I, I54V, V82A, I84V, L90M(4)	M41L, D67N, L210W, T215S, K219S	K101H, V108I, Y181C, G190A, H22Y	
P10	M46I, V82A, I54V	D67N, K70R, M184V, K219Q	Ninguna	10
P10*	M46I, V82A, I54V (8)	D57N, K70R, M184V, K219Q	Ninguna	
P11	Ninguna (1)	M184V	G181C, G190A	7,9
P11*	Ninguna (3)	L74V, Y115F, M184V	K101E, K103N, Y181C, G190A, H221Y	
P12	I47IV, I54A, V82A, L90M(5)	M41L, D67N, T69D, L210W, T215Y	K103N	3,6
P12*	M46I, I47V, V82T, L90M, I54A (4)	M41L, D67N, T69D, M184I, L210W, T215Y	V90I	
P13	Ninguna (3)	Ninguna	K103N	8,8
P13*	Ninguna (4)	Ninguna	K103N	
P14	I54V, V82AV, I84V (9)	D67N, T69N, K70R, T215IT, K219E	Y181C	4
P14*	M46I, I54V, V82A, I84V (9)	D67N, T69DN, K70R, T215F, K219E	Y181C	
P15	Ninguna (2)	Ninguna	K103N	12,2
P15*	Ninguna (2)	A62V, D67N	Ninguna	
P16	Ninguna (2)	M41L, D67N, K70R, T215F, K219Q	Ninguna	4,9
P16*	Ninguna (1)	M41L, D67N, K70R, T215F, L2010W, K219Q	Ninguna	
P17	Ninguna (1)	D67N, K70R, M184V, T215S, K129Q	K103N	6,2
P17*	Ninguna (2)	D67N, K70R, T215F, K219Q	K103N	
P18	D30N (2)	Ninguna	Ninguna	4
P18*	Ninguna (1)	Ninguna	V108I, Y181C	
P19	M46I, V82A, L90M (3)	L74V	L100I, K103N	6
P19*	Ninguna (1)	T69N	Ninguna	
P20	D30N, L90M (5)	M41LM D67N, K70R, V75M, M184V, L210W, T215Y, K219Q	Ninguna	3
P20*	D30N, L90M (5)	M41LM, K70R, V75M, M184V, L210W, T215Y, K219Q	Ninguna	
P21	Ninguna (1)	M41L, D67N, L210W, T215Y	Ninguna	5,6
P21*	Ninguna (2)	M41L, D67N, L74V, L210W, T215Y, K219E	Y181C, G190A	

Pacientes	MDR			Tiempo medio (años)
	A IP (nº de IP <i>minor</i>)	A ITIAN	A ITINAN	
P22	M46I, I54V, V82A, L90M (10)	D67N, T69D, K70R, L74V, Y115F, M184V, K219Q	A98G, K103N, Y181C, G190A	2,2
P22*	M46I, I54V, V82A, L90M (12)	D67N, K70R, L74V, Y115F, M184V, K219Q	A98G, K103N, Y181C, G190A	
P23	M46I, V82A (8)	D67N, T69D, M184V, L210W, T215Y	Ninguna	2,6
P23*	M46I, V82A (8)	M41L, D67N, T69D, M184V, L210W, T215Y	Ninguna	
P24	D30N (4)	Ninguna	K103N	6,2
P24 *	Ninguna (5)	Ninguna	K103N	

MDR entre los 24 pacientes pediátricos infectados con VIH-1 con seguimiento longitudinal y con la primera (marcado en negrita) y última secuencia o perfil de resistencia genotípico disponible (marcado con asterisco, *) § Pacientes *naive* en el momento de la secuencia. Para estos pacientes las MTR se definieron de acuerdo con el listado recomendado por la OMS (Bennett et al. 2009). Las MDR a ITINAN revirtieron en 4 pacientes (P6, P7, P15, y P19). Las MDR a ITIAN revirtieron a wt en dos casos (P3 y P7). Las MDR a IP revirtieron en 5 niños (P3, P4, P18, P19 y P24). MDR, mutaciones de resistencia; IP, inhibidor de la proteasa; ITIAN, inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleós(t)idos; ITINAN, inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleós(t)idos

Diversidad genética y presión de selección en la población intra-huésped de VIH-1B

La media de la diversidad genética de la población intra-huésped del VIH-1B fue de $0,004 \pm 0,001$, pero incrementó hasta un orden de magnitud entre pacientes (d : de $0,003 \pm 0,000$ a $0,040 \pm 0,001$) (Tabla 4.4). Además, el promedio de la tasa de mutaciones no sinónimas y sinónimas fue de $0,003 \pm 0,001$ y $0,008 \pm 0,003$, respectivamente, variando enormemente, ambos parámetros evolutivos entre los pacientes analizados (d_N : de $0,001 \pm 0,000$ a $0,032 \pm 0,001$; d_S : de $0,002 \pm 0,001$ hasta $0,058 \pm 0,003$) (Tabla 4.4). En su promedio, el fragmento de la secuencia pol analizada se encontraba bajo la acción de la presión de selección negativa en (d_N/d_S : $0,565 \pm 0,386$). Sin embargo, las presiones de selección variaron entre los individuos. Se detectó presión de selección negativa (d_N/d_S significativamente inferior a 1) en 14 (58,4%) pacientes, presión de selección positiva (d_N/d_S con valores > 1) en cinco pacientes (20,8%) y bajo evolución neutral en los 5 sujetos restantes (20,8%) (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Parámetros evolutivos de la secuencia parcial del gen *pol* de los 24 pacientes infectados por VIH-1 subtipo B y seguimiento longitudinal.

Pacientes	T. exposición VIH-1B (años)	Nº secuencias	d^1		d_N^2		d_S^3		d_N/d_S^4	
			Media	ES ⁵	Media	ES	Media	ES	Media	ES
1	2,3	3	0,004	0,001	0,003	0,001	0,008	0,003	0,565	0,386
14	6	6	0,028	0,008	0,018	0,004	0,050	0,019	1,736	0,508
11	6,8	5	0,015	0,007	0,008	0,004	0,024	0,012	0,222	0,111
5	7,3	3	0,028	0,009	0,020	0,005	0,040	0,013	0,628	0,092
24	9	20	0,017	0,001	0,020	0,002	0,006	0,001	1,919	0,262
8	10,7	3	0,020	0,004	0,010	0,002	0,044	0,009	0,254	0,022
6	10,7	5	0,006	0,001	0,004	0,001	0,010	0,003	0,670	0,268
20	11,7	6	0,006	0,003	0,007	0,004	0,002	0,001	2,444	1,222
21	12,5	11	0,022	0,004	0,024	0,004	0,013	0,004	1,665	0,416
23	12,8	20	0,040	0,001	0,030	0,001	0,058	0,003	0,790	0,011
13	13	4	0,009	0,002	0,007	0,002	0,018	0,003	0,350	0,117
2	14,3	3	0,018	0,006	0,015	0,006	0,020	0,004	0,657	0,205
9	14,3	4	0,004	0,001	0,002	0,000	0,007	0,001	0,287	0,038
22	14,6	18	0,015	0,005	0,008	0,002	0,030	0,009	0,199	0,035
3	14,7	3	0,008	0,001	0,006	0,003	0,009	0,003	1,215	0,764
7	14,7	4	0,012	0,005	0,014	0,005	0,005	0,002	1,850	0,513
18	15,6	5	0,029	0,001	0,026	0,001	0,031	0,002	1,004	0,058
4	15,7	3	0,007	0,002	0,004	0,001	0,011	0,004	0,235	0,074
19	15,9	9	0,003	0,000	0,001	0,000	0,006	0,001	0,152	0,054
10	16	5	0,037	0,011	0,027	0,006	0,053	0,020	2,220	0,818
15	16	5	0,026	0,001	0,032	0,001	0,008	0,002	1,724	0,145
17	18,6	5	0,007	0,000	0,006	0,000	0,007	0,000	0,511	0,043
12	19,8	5	0,020	0,002	0,014	0,001	0,035	0,005	0,359	0,039
16	25,6	7	0,008	0,002	0,009	0,002	0,007	0,001	1,185	0,168
Total/ Media	12	162	0,004	0,001	0,003	0,001	0,008	0,003	0,565	0,386

T, tiempo; d , distancia genética; d_N tasa de sustituciones nucleotídicas no sinónimas; d_S , tasa de sustituciones nucleotídicas sinónimas; d_N/d_S , presión de selección; ES, error estándar.

Los parámetros evolutivos también variaron con el tiempo. Así, la diversidad genética (sustituciones por sitio) incrementó entre la primera y última secuencia del virus disponible (de $0,052 \pm 0,006$ a $0,090 \pm 0,014$; $r=0,54$; p -valor= $0,038$) (**Figura 4.1D**). Esto pudo deberse, principalmente, a la acumulación de mutaciones no sinónimas (de $0,033 \pm 0,005$ hasta $0,086 \pm 0,004$; $r=0,50$; p -valor= $0,058$), mientras que las mutaciones sinónimas se mantuvieron relativamente constantes en el tiempo (de $0,088 \pm 0,009$ hasta $0,123 \pm 0,011$; $r=0,21$; p -valor= $0,450$). Al comparar la secuencia basal frente a las últimas secuencias disponibles por paciente, también se observó un aumento significativo en el número de sitios bajo evolución neutral (115/334 vs. 293/334, $\chi^2=10,32$; p -valor= $0,002$).

Contribución relativa de los factores clínicos en la evolución del VIH-1B pediátrico

La contribución relativa de cada factor clínico en la evolución del VIH-1B se obtuvo tras analizar cómo los factores clínicos predecían la evolución del VIH-1B mediante la implementación de 6 clasificadores (árbol J48, IB-1, IB-3, regresión logística, *Naïve Bayes* y TAN). Estos clasificadores arrojaron diferente exactitud a la hora de clasificar los datos, pudiéndose observar como IB1, IB3 y J48 resultaron ser los mejores clasificadores. La razón es que los tres mostraron el mayor porcentaje de casos clasificados correctamente (83,1%, 81,4% y 76,5%, respectivamente), una buena precisión y valores elevados de medida de F (0,83, 0,81 y 0,76) y AUC ($\geq 0,8$) (**Anexo II, Material suplementario S1**).

Para identificar las variables que mejor predijeron la evolución del VIH-1B estimadas mediante los clasificadores IB1, IB3 y J48, se emplearon tres técnicas diferentes: dos algoritmos univariantes (InfoGainAttributeEval y GainRatioAttributeEval), un algoritmo multivariante (CFS) y la método *wrapper* (*wrapper*-IB1, *wrapper*-IB2 y *wrapper*-J48) (**Anexo II, Material suplementario S2 y S3**). En la **Tabla 4.5** se muestran las variables que mejor predijeron, tanto los parámetros evolutivos (d , d_N y d_S) del VIH-1B, como la presencia de MDR y que fueron seleccionadas con una frecuencia más elevada por los algoritmos univariantes, multivariante y *wrapper*. Así pues, la variable “edad de diagnóstico de VIH-1” se encontraba asociada con d (valores obtenidos: 0,105 por GainRatioAttributeEval; 80% por CFS; 100% por *wrapper*/IB3 y *wrapper*/J48 y 70% por *wrapper*/IB1); la variable “edad a la toma del primer TAR” se encontraba asociada con d_N (valores obtenidos: 0,226 por GainRatioAttributeEval; 60% por CFS y 100% por *wrapper*/IB3 y *wrapper*/J48) y asociada con d_S , la variable “año de diagnóstico de VIH-1” (valores obtenidos: 0,211 por GainRatioAttributeEval; 50% por CFS y 100% en la *wrapper*/IB1, 90% por *wrapper*/IB3 y 70% por *wrapper*/J48). Cabe destacar que estas tres variables epidemiológicas (“edad de diagnóstico de VIH-1”, “edad a la toma del primer TAR” y “año de diagnóstico de VIH-1”) se encuentran estrechamente relacionadas entre sí, ya que la mayoría de los niños incluidos en este estudio habían recibido TAR precoz en el momento del diagnóstico de VIH-1B. Además, las variables “año de la infección” (año de nacimiento, asumiendo la infección al nacer) y “año de secuencia del virus” resultaron ser variables relevantes para la fijación de cualquier MDR a ITIAN y/o a ITINAN y/o a IP. Así, valores obtenidos para la variable “año de nacimiento/infección” fueron 0,116 por GainRatioAttributeEval y 100% por CFS y para la variable “año de secuencia”: 0,116 por GainRatioAttributeEval; 100% por CFS y 60 % por *wrapper*/J48. En más detalle, el año de nacimiento” o de infección fue relevante para la fijación de MDR a IP (con valores de 0,168

por GainRatioAttributeEval, 100% por CFS, 100% por *wrapper/J48*, 90% por *wrapper/IB1* y *wrapper/IB3*) y también para la fijación mutaciones a ITIAN (0,149 por GainRatioAttributeEval; 60% por CFS; 90% por *wrapper/IB1*, *wrapper/IB3* y *wrapper/J48*). El año de secuencia fue importante para la fijación de MDR a IP (60% por CFS) y para ITIAN (90% por CFS y 60% por *wrapper/IB1*) (**Tabla 4.5, Anexo II Material Suplementario**). Otros factores clínicos también resultaron ser relevantes en la evolución del VIH-1B, relacionándose con la diversidad genética y la fijación MDR. Estos eran el año de la infección, la experiencia a TAR diferentes y el regímenes ARV previos, el recuento de linfocitos T CD8, el porcentaje de linfocitos T CD4 y el ratio CD4/CD8 (**Tabla 4.5, Anexo II Material Suplementario**). Para probar la solidez de nuestras estimaciones, se realizó un análisis por FSS, indicando, nuevamente, que IB1, IB3 y J48 fueron los paradigmas de clasificación supervisada que arrojaron valores más altos de precisión, e identificando las mismas variables que habían sido identificadas como las mejores predictoras para la evolución del VIH-1B en niños después de los análisis con InfoGainAttributeEva, GainRatioAttributeEval y CFS (**Tabla 4.6, Anexo II, Material suplementario S4**).

Tabla 4.5. Variables consenso calificadas como las que mejor predicen los parámetros evolutivos y mutaciones de resistencia.

Parámetros evolutivos		Resistencia a fármacos ARV				
<i>d</i>	<i>d_N</i>	<i>d_S</i>	MDR a IP	MDR a ITIAN	MDR a ITINAN	Presencia de MDR
Edad de diagnóstico VIH-1	Edad al primer TAR	Año de infección	Año de infección	Año de infección	Experiencia a ITINAN	Año de secuencia
Año de infección	Experiencia a ITINAN	Año de diagnóstico VIH-1	Origen del paciente	Coinfección con VHC y/o VHB	Nº de ARV	Nº de regímenes/TAR previos
Nº de regímenes/TAR previos	Nº de ARV	Coinfección con VHC y/o VHB	Coinfección con VHC y/o VHB	Nº de ARV	Ratio CD4/CD8	T CD4 céls/mm ³
Año de la toma del primer TAR	Año de diagnóstico VIH-1	Año de la toma del primer TAR	Edad el primer TAR	%CD8	%CD4	Año de infección
Año de diagnóstico VIH-1	T CD8 céls/mm ³	Edad al primer TAR	Nº de TAR previos	%CD4	CD8 céls/mm ³	Año de diagnóstico VIH-1
Experiencia a ITINAN	Ratio CD4/CD8	Ratio CD4/CD8	Experiencia a IP	Año de diagnóstico VIH-1	Año de la toma del primer TAR	%CD8
T CD8 céls/m ³	Nº de regímenes/TAR previos	Nº de regímenes/TAR previos	Nº de ARV	Año de secuencia	Edad en la primera secuencia	
Experiencia a INI		Año de secuencia		Experiencia a IP		
				T CD4 céls/mm ³		
				Edad al primer TAR		
				%CD8		

Variables consenso predictoras

En cada columna las variables están ordenadas de acuerdo con su importancia relativa. TAR, tratamiento antirretroviral; ITINAN, inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleós(t)idos; VHC, virus de la hepatitis C; VHB, virus de la hepatitis B; N^o, número; ARV, antirretroviral; INI, inhibidor de la integrasa; IP, inhibidor de la proteasa.

Tabla 4.6. Porcentaje de las instancias calificadas correctamente para cada modelo utilizando *wrapper*, *GainRatioAttributeEval* y *CFS* para los parámetros de estudio.

Modelo	Método de selección	Parámetros						
		<i>d</i>	<i>d_N</i>	<i>d_S</i>	MDR a IP	MDR a ITIAN	MDR a ITINAN	Presencia de MDR
J48	<i>wrapper</i>	47,4%	79,3%	76,4%	91,5%	86,7%	80,6%	93%
	<i>Gain ratio</i>	86,1%	66,8%	72,8%	77,9%	80,6%	79,6%	89,3%
	CFS	68%	68,9%	63,6%	81,2%	85,1%	80,1%	90,6%
IB1	<i>wrapper</i>	37,1%	69,4%	72,8%	87,7%	82,6%	80,1%	86,8%
	<i>Gain ratio</i>	78,4%	73,6%	75,9%	92,5%	83,7%	86,6%	92,5%
	CFS	76,3%	68,4%	67,7%	85,5%	82,4%	83,3%	93,1%
IB3	<i>wrapper</i>	47%	68%	67%	88,7%	85%	79%	91,8%
	<i>Gain ratio</i>	74,2%	70,9%	75,4%	85,9%	83,2%	87,1%	93,1%
	CFS	73,7%	68,4%	64,1%	73,7%	89,2%	85,5%	94,9%

d, distancia genética; *d_N* tasa de sustituciones nucleotídicas no sinónimas; *d_S* tasa de sustituciones nucleotídicas sinónimas; *d_N/d_S*, presión de selección; MDR, mutaciones de resistencia; IP, inhibidor de la proteasa; ITIAN, inhibidores de los nucleós(t)idos; ITINAN, inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleós(t)idos Modelos predictores: J48, árbol de clasificación; *Gain ratio*, *GainRatioAttributeEval*; IB, vecino más cercano; CFS, *Correlation Feature Selection*.

DISCUSIÓN

Este es el primer estudio que analiza los efectos interactivos de más de dos características clínicas y virológicas relacionadas con la evolución intra-huésped del VIH-1B en pacientes pediátricos durante un largo periodo de exposición al virus (tiempo medio de 12 años, rango 2,3-25,6 años). Aunque los 24 niños estudiados fueron infectados por vía perinatal, podríamos suponer que la edad del paciente y del tiempo de exposición al VIH-1B deberían ser similares, pero únicamente si el VIH-1B fue transmitido en el momento del parto. El no conocer el momento exacto de la infección (gestación y mes, parto o lactancia materna), supone una limitación del estudio, ya que la exposición al virus podría ser algo diferente a la que hemos supuesto al considerar la infección en el parto, es decir, en el momento del nacimiento del niño.

Durante el tiempo de exposición al VIH-1B, los parámetros clínicos, epidemiológicos y virológicos (CV, MDR) fluctuaron. Así, no todos los 24 pacientes presentaron una buena situación inmunológica y clínica reflejada en el último informe de su seguimiento clínico. Además, se pudo observar un aumento significativo en el número de MDR a ITINAN en las secuencias virales con el tiempo. Estos parámetros, junto con la edad del niño al tomar el primer TAR y el año de diagnóstico de VIH-1B, parecieron ser relevantes en el curso de la infección y evolución del VIH-1B.

En este estudio se utilizaron seis métodos de clasificación supervisada con el fin de predecir tres parámetros evolutivos del VIH-1B (d , d_N y d_S) y la fijación de MDR en el virus. Las técnicas de clasificación supervisada son algoritmos con un elevado poder predictivo y diseñados para optimizar los procedimientos de clasificación estadística (Stephens et al., 2014). Entre estos seis métodos empleados, IB1, IB3 y J48 generaron los mejores modelos de predicción. Nuestros resultados sugieren que estos métodos han demostrado ventajas sobre otros métodos al requerir un menor pre-procesamiento de los datos, y al ser funcionales cuando se quiere analizar la interacción entre variables requiriendo, por lo general, menos datos de entrenamiento para su aprendizaje, lo que aumenta su eficacia frente a otros modelos. Esta es la primera vez que las técnicas de aprendizaje automático o “*machine learning*” se han utilizado para llevar a cabo un estudio tan amplio que analiza la importancia de los parámetros clínicos la evolución intra-huésped del VIH-1B. No obstante, otros estudios de cohortes de VIH han empleado los análisis multivariantes para este mismo fin (Reddy et al., 2016; Auld et al., 2016; Gilbert et al., 2016), incluidos estudios clínicos (Cakir et al., 2011; Sahle 2016). Los factores que se seleccionaron mediante técnicas de clasificación supervisada, que mejor predicen la diversidad genética del VIH-1B fueron:

edad del primer TAR, edad de diagnóstico de VIH-1B y año en infección por VIH-1B. Esto podría explicarse porque la mayoría (75%) de estos niños nacieron en la década de los años 90 y 80, habiendo experimentado regímenes basados en monoterapia y/o biterapia, lo que pudo desencadenar en fracaso terapéutico debido a una supresión incompleta del virus por ser regímenes poco potentes (Abrams et al., 1998). Como se ha podido observar en los capítulos anteriores de esta Tesis, el fracaso terapéutico en esta Cohorte está representado por un elevado porcentaje, lo que sugiere que esta población va a ver reducida la eficacia del TAR tras la fijación de MDR (Ammaranond et al., 2012; Rojas & Holguín, 2014).

En nuestro estudio, todos los 24 pacientes (excepto 1 niño) habían sido infectados por virus con MDR, tanto en su secuencia basal como en la última secuencia disponible. Sin embargo, estos pacientes mantuvieron una alta susceptibilidad predicha a varios medicamentos entre los casi 20 compuestos antirretrovirales con licencia o en proceso de evaluación para el tratamiento de la infección por VIH en la población pediátrica, principalmente a la mayoría de los IP, (AIDS info, 2015; AEMPS, **Anexo I**). La elevada tasa de resistencia a la mayoría de los ARV por parte de los virus con MDR, refleja el cambio de las opciones de terapéuticas por parte de los médicos durante las últimas décadas, en función del momento de aprobación de los ARV para uso pediátrico en España (leyenda **Figura 3.3**).

La diversidad media del virus entre pacientes se vio incrementada durante el TAR (Pagan et al., 2016), lo que indica que la diversidad de virus en plasma se mantiene durante cada fase de descenso viral a pesar de la gran disminución del tamaño de la población viral replicada. Nuestros resultados obtenidos mediante “*machine learning*” demostraron que aquellas variables relacionadas con el TAR, como el edad al primer TAR, experiencia ITINAN, número de ARV y número de TAR previos, tienen efecto sobre parámetros evolutivos. El efecto de la TAR en la diversidad genética del VIH-1 ha sido previamente estudiada (Kearney et al., 2014). Por lo tanto, el efecto de estas variables en la evolución intra-huésped del VIH-1B debería ser analizada de una forma más exhaustiva en estudios futuros. A la vista de nuestros resultados, podríamos asumir que los genes secuenciados en término medio, se encuentran bajo selección negativa en las poblaciones virales que infectan a los 24 pacientes pediátricos. Esto, junto con el elevado número de secuencias con MDR, podría deberse, principalmente al efecto que los factores clínicos tienen en la evolución del virus: una rápida disminución del ratio CD4/CD8 con el tiempo, la supresión viral incompleta, terapias subóptimas y una elevada experiencia a ARV, lo que indudablemente promueven la fijación de MDR en el genoma viral (Markham et al., 1998; Castro et al., 2011; Rojas & Holguín, 2014). Estas evidencias también se observaron tras la

implementación de algoritmos de *machine learning*. En este capítulo se observó una significativa disminución del cociente CD4/CD8 con el tiempo, previamente relacionada con un mayor riesgo de episodios graves no relacionadas con el sida en pacientes infectados por el VIH-1 en TAR (Serrano-Villar et al., 2014) de hecho, sólo uno de los 24 niños consiguió normalizar la relación CD4/CD8 en el último informe clínico, incluso a pesar de la supresión viral después de recibir TAR eficaz, quizás debido a una mayor activación inmune y inmunosenescencia causada por el largo tiempo la infección por VIH-1B y al tener un sistema inmune desarrollado en la presencia del virus desde el nacimiento (Serrano-Villar et al., 2013; Sainz et al., 2013). Por lo tanto, podemos asumir que estos factores interactivos podría modificar el ambiente en el que evoluciona el VIH-1, lo que sugieren que existe una relación entre los factores y la diversidad genética del VIH-1 en niños (Carvajal et al., 2008; Ryland et al., 2010).

Las principales limitaciones de este capítulo radican en el bajo número de pacientes analizados, así como el modesto número de las secuencias incluidas. Sin embargo, son representativas de la Cohorte de Madrid de niños y adolescentes infectados por VIH-1 y existe información clínica, epidemiológica y virológica detallada asociada a cada secuencia estudiada. Además, el número de secuencias *pol* fueron suficientes para realizar un correcto análisis de la evolución intra-huésped del VIH-1B, similar a la empleada en otros estudios similares en adultos (Novitsky, 2013). Por otra parte, no podemos descartar los casos de niños que adquirieron la infección por el VIH-1B durante el embarazo o la lactancia materna temprana, al ser una información desconocida.

Los resultados del trabajo descrito en este capítulo se van a enviar a publicar como artículo de investigación, incluido en el **Anexo III**: Rojas Sánchez P, Cobos A, Navaro ML, Ramos JT, Pagán P and Holguín A. Impact of clinical parameters in the intra-host evolution of HIV-1 subtype B in pediatric patients.

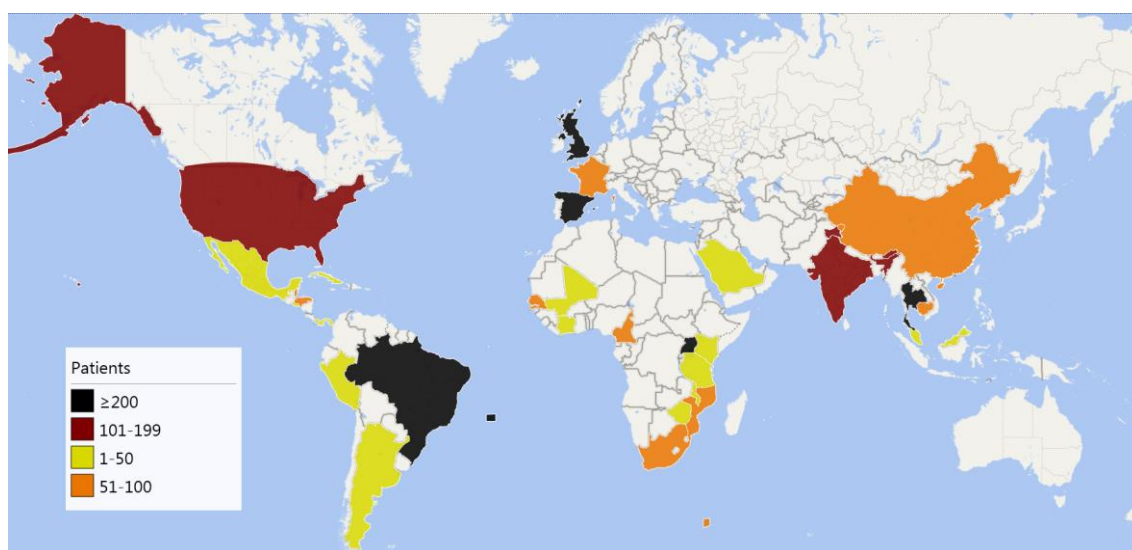
DISCUSIÓN INTEGRADORA

En los últimos diez años se ha observado un aumento proporcional sin precedentes respecto al número de personas recibiendo TAR, consiguiendo que 17 de los 37 millones de personas infectadas por el VIH-1 estuviesen en tratamiento (AIDS, 2016), esperando llegar a una cobertura del 90% en 2020 (UNAIDS PCB3, 2016). Sin embargo, 1,8 de los 3 millones de niños infectados en el mundo no tuvieron acceso al TAR tras su nacimiento (UNAIDS, 2015). El fracaso terapéutico es recurrente en niños infectados por VIH-1 durante su TAR y suele estar asociado con la fijación de un elevado número de MDR en sus virus, siendo la tasa de mutación superior a la encontrada en adultos (Castro H et al., 2011). La fijación de las MDR es debido, en la mayoría de los casos, a una adherencia incompleta al TAR o al tratamiento con regímenes subóptimos, sobre todo en aquellos niños nacidos en la era de mono o bioterapia o en áreas con disponibilidad limitada ARV. Por ello, la adecuada vigilancia de la adherencia al tratamiento tiene que ser una prioridad en el seguimiento clínico de estos pacientes. El desarrollo y la expansión del uso de regímenes más simplificados, menos tóxicos y con fármacos más eficaces, resulta esencial para garantizar una buena proyección clínica e inmunológica en la población pediátrica infectada por el virus (WHO, 2014).

En los años 90, España era uno de los países de la Comunidad Europea que presentaba tasas más elevadas de VIH debido, principalmente, al elevado número de usuarios de drogas inyectables infectados. Así, durante esta época, nacieron muchos niños infectados perinatalmente de mujeres drogadictas que contrajeron previamente la infección por VIH-1 por vía parenteral. Desde el comienzo de la epidemia hasta diciembre de 2015, un total de 561 pacientes estaban adscritos a la Cohorte pediátrica de niños y adolescentes infectados por VIH-1 de la Comunidad de Madrid, lo que representa un 57,3% de la población pediátrica infectada hasta la fecha a nivel nacional. De ellos, 289 se encontraban en seguimiento clínico en unidades pediátricas (43,9%) o habían sido derivados a unidades de adultos (56,1%) para su seguimiento. A pesar de que estos pacientes presentaron una buena situación clínica e inmunológica en el momento de toma de muestra, la mayoría de ellos presentaban un historial clínico con síntomas asociados a la infección por VIH-1 y había recibido regímenes ARV muy diversos y no supresivos en muchos casos, donde la única terapia disponible era mono o biterapia con fármacos de barrera genética baja, generando altas tasas de resistencias a los ARV en uso. En esta Tesis se han actualizado los datos de MDR y MRT y la epidemiología molecular del VIH-1, describiendo las tendencias temporales en la Cohorte de Madrid, durante casi 25 años (1993-2015). Los datos previos en el laboratorio y los generados en este trabajo han proporcionado toda la información relativa de resistencias pediátricas a ARV publicados en nuestro país contribuyendo a que España

sea, junto con Reino Unido (cohorte CHIPS) (Chakrabortt et al., 2008), India (Neogi et al., 2012; Shet et al., 2013), Brasil (Almeida et al., 2012; Simonetti et al., 2003; Soto Ramirez et al., 2010, Dumans et al., 2009; Angelis et al., 2011) y Uganda (Towler et al., 2010; Church et al., 2009; Mussime et al., 2013), uno de los cinco países en el mundo que ha publicado datos de resistencias analizando el virus de más de 200 pacientes pediátricos infectados (Rojas & Holguín, 2014). Estos datos quedan reflejados en la **Figura D.**, obtenida tras realizar una revisión sistemática de todos los artículos publicados con datos de MDR en poblaciones pediátricas infectadas con VIH a nivel mundial y que se anexa en esta Tesis (**Anexo III**, Rojas & Holguín, 2014). Es importante señalar que, a pesar de que el tema de la monitorización de resistencias es prioritario para la OMS, sólo se plantea empezar los estudios en población pediátrica infectada a partir del 2020 en 34 países de recursos limitados dentro de su plan global para combatir las resistencias durante el 2017-2021 (WHO, 2016b), quedando muchos países con altas prevalencias del VIH en niños fuera del plan global.

Figura D.1. Datos de resistencia por países en población pediátrica infectada por VIH-1.



Adaptado de Rojas & Holguín, 2014.

En los últimos años, se ha observado una disminución en la tasa de MDR en los pacientes pediátricos incluidos en la Cohorte de Madrid para la mayoría de fármacos ARV (excepto para los ITINAN), lo que podría deberse a la instauración de nuevas pautas ARV altamente supresivas para los virus que infectan a los niños y adolescentes de la Cohorte. Las MDR a ITINAN, cuya frecuencia aumentó de forma significativa durante 2011-2015, tal vez debido a la aprobación de dos nuevos ITINAN durante ese período y a la frecuente resistencia cruzada en fármacos de esta familia. El bajo número de pacientes no tratados y con datos de resistencia observados en esta Tesis podría explicarse por las escasas nuevas infecciones

por VIH-1 en los últimos años como consecuencia de la eficacia de los programas de prevención de la transmisión vertical del virus en España. Por otra parte, es importante señalar que, hasta el año 2007, las guías españolas no recomendaban la realización de test de resistencia en población *naive* (GESIDA, 2016).

Durante la Tesis exponemos que el 14,5% de los 235 niños y adolescentes en seguimiento clínico de la Cohorte estaban infectados por variantes no-B del VIH-1 y que 3 de cada 4 de ellos llevaban recombinantes intersubtipo, aumentando las tasas de recombinantes complejos únicos en las nuevas infecciones de los últimos años. El espectacular aumento de nuevas infecciones por variantes no-B (3,4% entre los diagnosticados antes del año 2000 al 85,7% entre los diagnosticados entre 2011-2015), refleja la creciente heterogeneidad viral en los últimos años en nuestra Comunidad autónoma y país. Eso es importante, porque la alta variabilidad genética asociada a las distintas variantes del VIH-1 podría afectar a la detección molecular del VIH-1 para un diagnóstico precoz de la infección en recién nacidos (Álvarez P et al., 2016) y durante la cuantificación de la carga viral necesaria para monitorizar la eficacia del TAR (Holguín et al., 2006a; Álvarez et al., 2014; Tatarelli et al., 2016) y los ensayos de resistencia a fármacos (Peeters et al., 2016), afectando al manejo clínico de los pacientes infectados (Hemelaar, 2013). También podría afectar a la respuesta ARV (Mackie et al., 2013; Häggblom et al., 2016), a la aparición de MDR (Martínez Cajas et al., 2008), a la velocidad de progresión de la enfermedad (Pant Pai et al., 2014) y al desarrollo de futuras vacunas (deCamps et al., 2014). Por ello también es necesaria estudios periódicos de las variantes del VIH-1 y a largo plazo, identificando las nuevas variantes del virus que se están introduciendo en nuestra área geográfica y en nuestra población de estudio.

Los datos presentados profundizan en el tema de la variabilidad viral. Casi todo lo que se conoce acerca de los factores que determinan la diversidad genética del VIH-1 proviene de análisis realizados en pacientes adultos y los estudios de evolución de VIH-1 en niños ha recibido mucha menos atención. Sin embargo los virus ejercen una menor presión de selección en población pediátrica infectada por VIH-1 que en población adulta, al menos en las primeras etapas de infección (Ceballos et al., 2008). Ello es debido a que la mayoría se infectan en el embarazo y parto (Chakraborty et al., 2008), donde el sistema inmune de los pacientes pediátricos no está aun desarrollado, existiendo gran variación de la respuesta inmune entre niños infectados (Fawzi et al., 2001 Becquet et al., 2012). Cabe destacar que la replicación y evolución del virus continúa en pacientes aunque éstos se encuentren en TAR supresivo y viremias indetectables (Martínez Picado et al., 2016), lo que refuerza la

importancia del tratamiento ARV en la evolución molecular del VIH-1 y la justificación de su estudio. De hecho, la mayoría de estos niños de nuestro estudio con resistencias no consiguieron alcanzar la supresión viral, por lo que es razonable suponer que el virus sigue evolucionando y, por ello, evolución viral y TAR estarían estrechamente ligados. En el último capítulo de esta Tesis, se han analizado las posibles variables que podrían ayudar a predecir tanto la diversidad genética del VIH, como la fijación de MDR en población viral intra-huésped. Se ha podido observar que la experiencia a la familia de los ITINAN podría estar relacionada con la diversidad genética y la frecuencia de mutaciones no sinónimas en la población pediátrica infectada por VIH-1B. Esto sugiere que los mismos factores que afectan a la evolución del VIH-1B determinan la fijación de MDR a ITINAN en los niños, tal y como se ha descrito previamente en población adulta (Rath et al., 2013). Otros factores virológicos resultaron ser menos relevantes en la fijación de MDR (como la CV) y en la evolución del VIH-1B en población pediátrica (porcentaje de T CD4, el recuento de linfocitos T CD8 y el cociente CD4/CD8). En nuestro estudio hemos observado como la mayoría de los niños infectados por VIH-1 con MDR fallan en la normalización del ratio CD4/CD8 a pesar de recibir TAR. Este hecho podría explicarse como consecuencia de una mayor activación y senescencia inmune resultante de la transmisión vertical del VIH-1 en pacientes infectados, cuyo sistema inmune se ha desarrollado en presencia del virus desde el nacimiento del niño o incluso durante el embarazo (Sainz et al., 2013). Nuevamente se hace imprescindible una buena monitorización clínica y un diagnóstico precoz del VIH para poder detectar al virus precozmente en el momento de la infección y poder proporcionar un TAR inmediato en la población infectada a nivel mundial. Particularmente, debería prestarse especial atención a los países de recursos limitados, donde la implantación de técnicas moleculares para un diagnóstico precoz, para el genotipado de resistencias, y para la cuantificación de la CV y la administración de TAR óptimos son aún muy limitados (Rojas & Holguín, 2014; Cossarini et al., 2013).

Será necesario hacer un esfuerzo para supervisar las tendencias actuales de mutaciones de resistencia a fármacos ARV y llevar a cabo una evaluación de la evolución de los patrones de resistencia, con el fin de evitar la transmisión de cepas resistentes en un futuro, para controlar las infecciones por variantes no-B y nuevos recombinantes complejos y para mantener una estrecha vigilancia de la adherencia farmacológica con el fin de reducir los eventos de fracaso virológico en estos niños y adolescentes con VIH que requerirán TAR de por vida.

CONCLUSIONES



- 1- Uno de cada 4 niños y adolescentes infectados por VIH-1 adscritos a la Cohorte pediátrica de Madrid con datos de resistencia disponibles durante el periodo 2000-2011 seleccionaron virus con MDR a las tres familias principales de ARV en algún momento de su seguimiento clínico. Ello puede deberse al uso de terapias poco supresivas (monoterapia o biterapia) disponibles en los primeros años de epidemia o por a fallos de adherencia al tratamiento.
- 2- La mayoría de niños infectados por virus con triple resistencia fueron susceptibles a los nuevos fármacos IP (TPV y DRV) e ITINAN (ETV y RPV). Todos presentaron una buena situación inmunológica y clínica en la última visita clínica. Además, uno de cada 5 pacientes con datos disponibles consiguieron normalizar el ratio CD4/CD8, sugiriendo un buen estadio inmunológico.
- 3- En el 42,8% de los pacientes infectados con virus con triple resistencia y seguimiento longitudinal, las mutaciones de resistencia frente a alguna de las familias revirtieron a virus salvaje, recuperando la susceptibilidad a los fármacos ARV de dicha familia.
- 4- Más de un tercio de los niños y adolescentes con VIH-1 de la Cohorte de Madrid habían recibido LPV/r en sus regímenes antirretrovirales, siendo prescrito durante los años 2000-2014 con mayor frecuencia en los tratamientos de rescate que en los de primera línea (83,2% vs. 16,8%). Encontramos que los factores predictivos relacionados con la aparición de MDR a IP tras el tratamiento con LPV/r fueron el uso LPV/r como fármaco de primera línea y el año de primera experiencia de dicho fármaco.
- 5- LPV/r ha sido usado frecuentemente como terapia de rescate en esta Cohorte de estudio. Sin embargo, cuando LPV/r se había prescrito integrado en regímenes terapéuticos de primera línea se observó una mayor reducción de la CV y mejor recuperación inmune en términos de recuento y porcentaje de linfocitos T CD4 y T CD8.
- 6- La tasa de MDR entre los niños tratados fue mayor para ITIAN (64,5%) que para ITINAN (36%) o IP (35,1%). Aunque en los últimos años se ha observado una disminución en la tasa de mutaciones de resistencia en los pacientes pediátricos, por nuevas TAR altamente eficaces, las mutaciones de resistencias a ITINAN aumentaron en los últimos 5 años. Los datos refuerzan la importancia de la vigilancia periódica de las resistencias a ARV para optimizar el tratamiento de niños infectados por virus resistentes.

- 7- Los subtipos no-B del VIH-1 y las formas recombinantes infectaron al 14,5% de los 235 niños y adolescentes de la Cohorte. Tres de cada 4 pacientes pediátricos con cepas no-B estaban infectados por recombinantes intersubtipo adscritos a 6 CRF diferentes y a URF.
- 8- Las tasas de infecciones por variantes no-B del VIH pasaron del 3,4% entre los 173 niños y adolescentes diagnosticados en Madrid antes del año 2000 al 85,7% entre los diagnosticados en los últimos 5 años (2011-2015), todos ellos infectados por recombinantes del VIH-1.
- 9- Hemos presentando los primeros datos de evolución molecular del VIH-1 en población infantil en nuestro país. Los parámetros clínicos y epidemiológicos más importantes para predecir la evolución molecular intra-huésped del subtipo B del VIH-1 en población pediátrica fueron la edad del primer TAR, la edad de diagnóstico del virus y el año de infección por VIH-1.

BIBLIOGRAFÍA



1. Abbott Laboratories (2010) Kaletra, highlights of prescribing information. Disponible en: <http://www.rxabbott.com/pdf/kaletratabpi.pdf>.
2. Abrams EJ, Weedon J, Steketee RW, et al. (1998) Association of human immunodeficiency virus (HIV) load early in life with disease progression among HIV-infected infants. *J Infect Dis*; 178:101-108.
3. Aghokeng AF, Monleau M, Eymard-Duvernay S et al. (2014) Extraordinary heterogeneity of virological outcomes in patients receiving highly active antiretroviral therapy and monitored with the World Health Organization Public Health approach in Sub-Saharan Africa and Southeast Asia. *Clin Infect Dis*; 58:99-109.
4. Aghokeng AF, Mpoudi-Ngole E, Dimodi H, et al. (2009) Inaccurate diagnosis of HIV-1 group M and O is a key challenge for ongoing universal access to antiretroviral treatment and HIV prevention in Cameroon. *PLoS One*; 4:e7702.
5. AIDS info (2011) Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services.
Disponible en:
<http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>.
6. AIDS info (2015) Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Pediatric HIV Infection. Disponible en:
<https://aidsinfo.nih.gov/guidelines/html/2/pediatric-treatment-guidelines/0#>
7. Almeida FJ, Rodrigues R, Zapparoli MS et al. (2012) Prevalence of transmitted HIV-1 drug resistance mutations in children and adolescents in Sao Paulo, Brazil. *Pediatr Infect Dis J*; 31: e255-e257.
8. Alvarez P, Prieto L, Martín L, et al. (2016) Evaluation of 4 virological tests using DBS for HIV-1 early infant diagnosis. *Pediatric Research* (Artículo en revisión)
9. Alvarez P, Rodríguez C, Martín L, Romero J, Holguín A (2014) HIV-1 RNA quantification from Dried Blood Spots and plasma using the Siemens VERSANT® HIV-1 RNA 1.0 Assay (kPCR). *Journal of Virology & Antiviral Research*; 3:2.
10. Ammaranond P, Sanguansittianan S (2012) Mechanism of HIV antiretroviral drugs progress toward drug resistance. *Fundam Clin Pharmacol*; 26:146-161.
11. Angelis DS, Tateno AF, Diaz RS et al. (2011) HIV-1 drug resistance genotypic profiles in children with undetectable plasma viremia during antiretroviral therapy. *Braz J Infect Dis*; 15: 60-65.
12. Auld E, Lin J, Chang E et al. (2016) HIV Infection Is Associated with Shortened Telomere Length in Ugandans with Suspected Tuberculosis. *PLoS One*; 11:e0163153.
13. Babiker A, Castro nee Green H, Compagnucci A et al. (2011) 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*; 11: 273-283.
14. Baeten JM, Chohan B, Lavreys L et al. (2007) HIV-1 subtype D infection is associated with faster disease progression than subtype A in spite of similar plasma HIV-1 loads. *J Infect Dis*; 195:1177-1180.
 15. Barnhart HX, Caldwell MB, Thomas P et al. (1996) Natural history of human Immunodeficiency virus disease in perinatally infected children: an analysis from the pediatric spectrum disease project. *Pediatrics*; 97:710-716.
 16. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F et al. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*; 220:868-871.
 17. Becquet R, Marston M, Dabis F et al. (2012) Children who acquire HIV infection perinatally are at higher risk of early death than those acquiring infection through breastmilk: a meta-analysis. *Plos One*; 7:e28510.
 18. Beloukas A, Psarris A, Giannelou P, Kostaki E, Hatzakis A, Paraskevis D (2016) Molecular epidemiology of HIV-1 infection in Europe: An overview. *Infect Genet Evol*. S1567: 30257-X.
 19. Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D et al. (2009) Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PLoS One*; 4:e4724.
 20. Bertagnolio S, de Luca A, Vitoria M et al. (2012) Determinants of HIV drug resistance and public health implications in low- and middle-income countries. *Antivir Ther*; 17:941-953.
 21. Blanche S, Newell ML, Mayaux MJ et al. (1997) Morbidity and mortality in European children vertically infected by HIV-1: the French Pediatric HIV infection study group and the European Collaborative study. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*; 14:442-450.
 22. Blanche S, Tardieu M, Duliege A et al. (1990) Longitudinal study of 94 symptomatic infants with perinatally acquired human immunodeficiency virus infection. *Am J Dis Child*; 114:1210-1215.
 23. Bongiovanni M, Bini T, Adorni F et al. (2003) Virological success of lopinavir/ritonavir salvage regimen is affected by an increasing number of lopinavir/ ritonavir-related mutations. *Antivir Ther*; 8: 209-214.
 24. Brenner B, Turner D, Oliveira M et al. (2003) A V106M mutation in HIV-1 clade C viruses exposed to efavirenz confers cross-resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *AIDS*; 17:F1-5.
 25. Briones C y Domingo E (2008) Minority report: hidden memory genomes in HIV-1

- quasispecies and possible clinical implications. *AIDS Rev*; 10:93-109.
26. Cakır A, Demirel B (2011) A software tool for determination of breast cancer treatment methods using data mining approach. *J Med Syst*; 35:1503-1511.
 27. Carvajal-Rodriguez A, Posada D, Perez-Losada M et al. (2008) Disease progression and evolution of the HIV-1 env gene in 24 infected infants. *Infect Genet Evo*; 8:110-120.
 28. Castro-Nallar E, Pérez-Losada M, Burton GF, Crandall KA (2012) The evolution of HIV: Inferences using phylogenetics. *Mol Phylogenet Evol*; 62:777-792
 29. Castro H, Judd A, Gibb DM et al. (2011) Risk of triple-class virological failure in children with HIV: a retrospective cohort study PLATO II. *Lancet*; 377:1580-1587.
 30. Ceballos A, Andreani G, Ripamonti C et al. (2008) Lack of viral selection in human immunodeficiency virus type 1 mother-to-child transmission with primary infection during late pregnancy and/or breastfeeding. *J Gen Virol*; 89:2773-2782.
 31. Centers for Disease Control (CDC) (1994) Revised classification system for human immunodeficiency virus infection in children less than 13 years of age. *MMWR* 1994. En: <http://www.cdc.gov/MMWR/preview/mmwrhtml/00032890.htm>.
 32. Chakraborty R, Smith CJ, Dunn D et al. (2008) HIV-1 drug resistance in HIV-1 infected children in the United Kingdom from 1998 to 2004. *Pediatr Infect Dis J*; 27: 457-459.
 33. Cheong HT, Chow WZ, Takebe Y et al. (2015) Genetic Characterization of a Novel HIV-1 Circulating Recombinant Form (CRF74_01B) Identified among Intravenous Drug Users in Malaysia: Recombination History and Phylogenetic Linkage with Previously Defined Recombinant Lineages. *PLoS One*; 10:e0133883.
 34. Church JD, Mwatha A, Bagenda D et al. (2009) In utero HIV infection is associated with an increased risk of nevirapine resistance in Ugandan infants who were exposed to perinatal single dose nevirapine. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 25:673-677.
 35. Clavel F, Guétard D, Brun-Vézinet F et al. (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*; 233:343-346.
 36. COHERE, Collaboration of Observational HIV Epidemiological Research Europe Study Group (2008) Response to combination antiretroviral therapy: variation by age. *AIDS*; 22:1463-1473.
 37. Cossarini F, Spagnuolo V, Gianotti N, Carbone A, Lazzarin A, Castagna A. (2013) Management of HIV infection after triple class failure. *New Microbiol*; 36:23-39.
 38. Crowell, T.A. and Hatano, H., (2015) Clinical outcomes and antiretroviral therapy in “elite” controllers: a review of the literature. *Journal of virus eradication*; 1: 72-77.
 39. Cvetkovic R, Goa K (2003) Lopinavir/ritonavir: a review of its use in the management of HIV infection. *Drugs*; 63:769-802.

40. Dahl V, Palmer S (2009) Establishment of drug-resistant HIV-1 in latent reservoirs. *J Infect Dis*; 199:1258–1260.
41. Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods*; 9:772.
42. Davies MA, Gibb D, Turkova A (2016) Survival of HIV-1 vertically infected children. *Curr Opin HIV AIDS*; 11:455-464.
43. deCamp A, Hraber P, Bailer RT et al. (2014) Global panel of HIV-1 Env reference strains for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies. *J Virol*; 88:2489-2507.
44. de Jose MI, Jiménez de Ory S, Espiau M et al. (2013) A new tool for the paediatric HIV research: general data from the Cohort of the Spanish Paediatric HIV Network (CoRISpe). *BMC Infect Dis*; 13:2.
45. de Mulder M, Yebra G, Martín L (2011) Drug resistance prevalence and HIV-1 variant characterization in the *naïve* and pretreated HIV-1-infected paediatric population in Madrid, Spain. *J Antimicrob Chemother*; 66:2362-2371.
46. de Mulder M, Yebra G, Navas A et al. (2012a) High drug resistance prevalence among vertically HIV-infected patients transferred from pediatric care to adult units in Spain. *Plos One*; 7:e52155.
47. de Mulder M, Yebra G, Navas A et al. (2012b) Trends in drug resistance prevalence in HIV-1-infected children in Madrid: 1993 to 2010 analysis. *Pediatr Infect Dis J* 31:e213-e221.
48. Delaugerre C, Teglas JP, Treluyer JM et al. (2004) Predictive factors of virologic success in HIV-1-infected children treated with lopinavir/ritonavir. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 37: 1269–1275.
49. Descamps D, Chaix ML, Montes B, et al. (2010) Increasing prevalence of transmitted drug resistance mutations and non-B subtype circulation in antiretroviral-*naïve* chronically HIV-infected patients from 2001 to 2006/2007 in France. *J Antimicrob Chemother*; 65: 2620–2627.
50. Documento de consenso del CEVIHP/SEIP/AEP/SPNS respecto al tratamiento antirretroviral en niños y adolescentes infectados por el VIH. Panel de expertos del Colaborativo Español para la Infección VIH Pediátrica (CEVIHP), Sociedad Española de Infectología Pediátrica (SEIP) de la Asociación Española de Pediatría (AEP) y Secretaria del Plan nacional del SIDA. Disponible en:
http://www.msssi.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/publicaciones/profSanitarios/GuiasTAR_octubre2015completasFinal13_10_15.pdf
51. Dollfus C, Le Chenadec J, Faye A et al. (2010) Long-term outcomes in adolescents perinatally infected with HIV-1 and followed up since birth in the French perinatal

- cohort (EPF/ANRS CO10). *Clin Infect Dis*; 51:214-224.
52. Dumans AT, Barreto CC, Santos AF et al. (2009) Distinct resistance mutation and polymorphism acquisition in HIV-1 protease of subtype B and F1 from children and adults' patients under virological failure. *Infect Genet Evol*; 9: 62-70.
 53. Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*; 32:1792-1797.
 54. Emerman M y Malim MH (1998) HIV-1 regulatory/accessory genes: key to unraveling viral host and host cell biology. *Science*; 280:1880-1884.
 55. European Collaborative Study (1991) Children born to women with HIV-1 infection: natural history and risk of transmission. *Lancet* ; 337:253-260.
 56. Fernández-Cooke E, Rojas P, Holguin A et al. (2016) Description and consequences of prescribing off-label antiretrovirals in the Madrid Cohort of HIV-infected children over a quarter of a century (1988-2012). *Antivir Ther*; 21:65-70.
 57. Foster GM, Ambrose JC, Hué S et al. (2014) Novel HIV-1 recombinants spreading across multiple risk groups in the United Kingdom: the identification and phylogeography of circulating recombinant form (CRF) 50_A1D. *PLoS one*; 9:e83337.
 58. Frange P, Briand N, Avettand-fenoel V et al. (2011) Lopinavir/ritonavir-based antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus type 1-infected *naive* children: rare protease inhibitor resistance mutations but high lamivudine/emtricitabine resistance at the time of virologic failure. *Pediatr Infect Dis J*; 30: 684-688
 59. Frange P, Burgard M, Lachassinne E et al. (2010) Late postnatal HIV infection in children born to HIV-1-infected mothers in a high-income country. *AIDS*; 24:1771-1776.
 60. Frange P, Galimand J, Vidal N et al. (2008) New and old complex recombinant HIV-1 strains among patients with primary infection in 1996-2006 in France: the French ANRS CO06 primo cohort study. *Retrovirology*; 5:69.
 61. Frederick T, Mascola I, Eller A (1994) Progression of human immunodeficiency virus disease among infants and children infected perinatally with human immunodeficiency virus or through neonatal blood transfusion. *Pediatr Infect Dis J*; 13:1091-1092.
 62. Galimand J, Frange P, Rouzioux C et al. (2010) Short communication: evidence of HIV type 1 complex and second generation recombinant strains among patients infected in 1997-2007 in France: ANRS CO06 PRIMO Cohort. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 26: 645-651.
 63. Gallo R, Wong-Staal F, Montagnier L, Haseltine WA, Yoshida M (1998) HIV/HTLV gene

- nomenclature. *Nature*; 333:504.
64. García-Merino I, de Las Cuevas N, Jiménez JL et al. (2010) Pediatric HIV BioBank: a new role of the Spanish HIV BioBank in pediatric HIV research. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 26:241-244.
 65. GeSIDA (2016) Documento de consenso de GeSIDA/Plan Nacional sobre el SIDA respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. Disponible en: www.msps.es.
 66. Giaquinto C, Penazzato M, Rosso R et al. (2010) Italian consensus statement on paediatric HIV infection. *Infection*; 38:301-319.
 67. Gilbert PB, Huang Y, Janes HE (2016) Modeling HIV vaccine trials of the future. *Curr Opin HIV AIDS* [Pendiente de publicar].
 68. Goetghebuer T, Haelterman E, Le Chenadec J et al. (2009) For the European Infant Collaboration group. Effect of early antiretroviral therapy on the risk of AIDS/death in HIV-infected infants. *AIDS*; 23: 597-604.
 69. González-Alba JM, Holguín A, Garcia R et al. (2011) Molecular surveillance of HIV-1 in Madrid, Spain: a phylogeography análisis. *J Virol*; 85:10755-10763.
 70. Grossman Z, Paxinos EE, Averbuch D, Maayan S, Parkin NT, Engelhard D, Lorber M, Istomin V, Shaked Y, Mendelson E, Ram D, Petropoulos CJ, Schapiro JM (2004) Mutation D30N is not preferentially selected by human immunodeficiency virus type 1 subtype C in the development of resistance to nelfinavir. *Antimicrob Agents Chemother*; 48:2159-2165.
 71. Guillén S, Prieto L, Jiménez de Ory S et al. (2011) New diagnosis of HIV infection in children. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 30:131-136.
 72. Häggblom A, Svedhem V, Singh K, Sönnernborg A, Neogi U (2016) Virological failure in patients with HIV-1 subtype C receiving antiretroviral therapy: an analysis of a prospective national cohort in Sweden. *Lancet HIV*; 3:e166-174
 73. Hall M, Frank E, Holmes G, Pfahringer B, Reutemann P, Witten IH (2009) The WEKA Data Mining Software: An Update. *SIGKDD Explorations*; 11: 1.
 74. Hammer SM, Vaida F, Bennett KK et al. (2002) Dual vs single protease inhibitor therapy following antiretroviral treatment failure: a randomized trial. *JAMA*; 2:169-180.
 75. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S; WHO-UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterisation (2011) Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. *AIDS*; 25:679-689.
 76. Hemelaar J (2013) Implications of HIV diversity for the HIV-1 pandemic. *J Infect*; 66:391-400.

77. Hirsch MS, Günthard HF, Schapiro JM et al. (2008) Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: 2008 recommendations of an International AIDS Society-USA panel. *Clin Infect Dis*; 47:266-285.
78. Holguín A, Erazo K, Escobar G et al. (2011) Drug resistance prevalence in human immunodeficiency virus type 1 infected pediatric populations in Honduras and el Salvador during 1989–2009. *Pediatr Infect Dis J*; 30: e82–e87.
79. Holguín Á, Hertogs K, Soriano V (2003) Performance of drug resistance assays in testing HIV-1 non-B subtypes. *Clin Microbiol Infect*; 9:323-326.
80. Holguín A, López M, Molinero M, Soriano V (2008a) Performance of three commercial viral load assays, Versant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA bDNA v3.0, Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1, and NucliSens HIV-1 EasyQ v1.2, testing HIV-1 non-B subtypes and recombinant variants. *J Clin Microbiol*; 46:2918-2923.
81. Holguín A, Lospitao E, López M, et al. (2008b) Genetic characterization of complex inter-recombinant HIV-1 strains circulating in Spain and reliability of distinct rapid subtyping tools. *J Med Virol*; 80:383-391.
82. Holguín A, de Mulder M, Yebra G, López M, Soriano V (2008c) Increase of non-B subtypes and recombinants among newly diagnosed HIV-1 native Spaniards and immigrants in Spain. *Curr HIV Res*; 6:327-334.
83. Holguín A, Paxinos E, Hertogs K, Womac C, Soriano V (2004) Impact of frequent natural polymorphisms at the protease gene on the in vitro susceptibility to protease inhibitors in HIV-1 non-B subtypes. *J Clin Virol*; 31:215-220.
84. Holguín A, Ramirez de Arellano E, Rivas P, Soriano V (2006a) Efficacy of antiretroviral therapy in individuals infected with HIV-1 non-B subtypes. *AIDS Reviews*; 8:98-107.
85. Holguín A, Suñe C, Hamy F, Soriano V, Klimkait T (2006b) Natural polymorphisms in the protease gene modulate the replicative capacity of non-B HIV-1 variants in the absence of drug pressure. *J Clin Virol*; 36:264-271.
86. Huang X, Xu Y, Yang Q, Chen J et al. (2015) Efficacy and biological safety of lopinavir/ritonavir based anti-retroviral therapy in HIV-1-infected patients: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Sci Rep*; 5: 8528.
87. Jetzt AE, Yu H, Klarmann GJ, Ron Y, Preston BD, Dougherty JP (2000) High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J Virol*; 74:1234-1240.
88. Judd A, Doerholt K, Tookey PA et al. (2007) Morbidity, mortality, and response to treatment by children in the United Kingdom and Ireland with perinatally acquired HIV infection during 1996–2006: planning for teenage and adult care. *Clin Infect Dis*; 45:918–924.

89. Judd A, European Pregnancy and Paediatric HIV Cohort Collaboration (EPPICC) study group in EuroCoord (2011) Early antiretroviral therapy in HIV-1-infected infants, 1996-2008: treatment response and duration of first-line regimens. *AIDS*; 25:2279-2287.
90. Karchava M, Pulver W, Smith L et al. (2006) Prevalence of drug-resistance mutations and nonsubtype B strains among HIV-infected infants from New York State. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 42:614-619.
91. Kearney MF, Spindler J, Shao W et al. (2014) Lack of detectable HIV-1 molecular evolution during suppressive antiretroviral therapy. *PLoS Pathog*; 10:e1004010.
92. Kempf DJ, King MS, Bernstein B et al. (2004) Incidence of resistance in a double-blind study comparing lopinavir/ritonavir plus stavudine and lamivudine to nelfinavir plus stavudine and lamivudine. *J Infect Dis*; 189: 51–60.
93. Kinomoto M, Appiah-Opong R, Brandful JA et al. (2005) HIV-1 proteases from drug-naïve West African patients are differentially less susceptible to protease inhibitors. *Clin Infect Dis*; 41:243-251.
94. Korber B y Gnanakaran S (2009) The implications of patterns in HIV diversity for neutralizing antibody induction and susceptibility. *Curr Opin HIV AIDS*; 4:408-417.
95. Kosakovsky Pond SL, Frost SD (2005) Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Mol Biol Evol* 22:1208-1222
96. Kuritzkes DR, Lalama CM, Ribaud HJ et al. (2008) Preexisting resistance to nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitors predicts virologic failure of an efavirenz-based regimen in treatment-naïve HIV-1-infected subjects. *J Infect Dis*; 197:867-870.
97. Lemey P, Rambaut A, Pybus OG (2006) HIV evolutionary dynamics within and among hosts. *AIDS Rev*; 8:125-140.
98. Leoz M, Feyertag F, Charpentier C et al. (2013) Characterization of CRF56_cpx, a new circulating B/CRF02/G recombinant form identified in MSM in France. *AIDS*; 27: 2309-2312.
99. Levy JA (1993) Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol Rev*; 57:183-289.
100. Lima VD, Gill VS, Yip B et al. (2008) Increased resilience to the development of drug resistance with modern boosted protease inhibitor-based highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis*; 198: 51–58.
101. Lohse N, Jørgensen LB, Kronborg G et al. (2007) Danish HIV cohort study genotypic drug resistance and long-term mortality in patients with triple-class antiretroviral drug failure. *Antivir Ther*; 12:909–217.

102. Mackie NE, Dunn DT, Dolling D et al. (2013) The impact of HIV-1 reverse transcriptase polymorphisms on responses to first-line nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-based therapy in HIV-1-infected adults. *AIDS*; 27:2245-2253.
103. Maldarelli F, Kearney M, Palmer S et al. (2013) HIV populations are large and accumulate high genetic diversity in a nonlinear fashion. *J Virol*; 87:10313-10323.
104. Mani I, Gilbert P, Sankalé JL, Eisen G, Mboup S, Kanki PJ (2002) Inpatient diversity and its correlation with viral setpoint in human immunodeficiency virus type 1 CRF02_AG-IbNG infection. *J Virol*; 76:10745-10755.
105. Markham RB, Wang WC, Weisstein AE et al. (1998). Patterns of HIV-1 evolution in individuals with differing rates of CD4 T cell decline. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 95:12568-12573.
106. Martin DP, Murrell B, Golden M, Khoosal A, Muhire B (2015) RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution*; 1: vev003
107. Martínez-Cajas JL, Pant-Pai N, Klein MB, Wainberg MA (2008) Role of genetic diversity amongst HIV-1 non-B subtypes in drug resistance: a systematic review of virologic and biochemical evidence. *AIDS Rev*; 10:212-223.
108. Martinez-Picado, Deeks SG (2016) Persistent HIV-1 replication during antiretroviral therapy. *Current opinion in HIV and AIDS* [Pendiente de publicación].
109. Masquelier B, Chaix ML, Burgard M et al. (2001) Zidovudine genotypic resistance in HIV-1-infected newborns in the French perinatal cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 27:99-104.
110. Mayaux MJ, Burgard M, Teglas JP et al. (1996) For the French Pediatric HIV infection study group. Neonatal characteristics in rapidly progressive perinatally acquired HIV disease. *JAMA*; 275:606-610.
111. McKinney RE Jr y Wilfert C (1994) Growth as a prognostic indicator in children with human immunodeficiency virus infection treated with zidovudine. AIDS Clinical Trials Group, protocol 043 Study group. *J Pediatr*; 125:728-733.
112. Meyers T, Sawry S, Wong JY et al. (2015) Virologic failure among children taking lopinavir/ritonavir-containing first-line antiretroviral therapy in South Africa. *Pediatr Infect Dis J*; 34: 175-179.
113. Miller V, Larder BA (2001) Mutational patterns in the HIV genome and crossresistance following nucleoside and nucleotide analogue drug exposure. *Antivir Ther*; 3:25-44.
114. Monge S, Guillot V, Alvarez M, Peña A et al. (2012) Analysis of transmitted drug resistance in Spain in the years 2007-2010 documents a decline in mutations to the non-nucleoside drug class. *Clin Microbiol Infect*; 18: E485-E490.

115. Monge S, Guillot V, Alvarez M, Chueca N et al. (2012) Clinically relevant transmitted drug resistance to first line antiretroviral drugs and implications for recommendations. *PLoS One*; 7: e9071
116. Muesing MA, Smith DH, Cabradilla CD, Benton CV, Lasky LA, Capon DJm (1985) Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature*; 313:450-458.
117. Musiime V, Kaudha E, Kayiwa J et al. (2013) Antiretroviral drug resistance profiles and response to second-line therapy among HIV type 1-infected Ugandan children. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 29: 449–455.
118. Neogi U, Häggblom A, Santacatterina M et al. (2014) Temporal trends in the Swedish HIV-1 epidemic: increase in non-B subtypes and recombinant forms over three decades. *PLoS One*; 9:e99390.
119. Neogi U, Sahoo PN, de Costa A, Shet A (2012) High viremia and low level of transmitted drug resistance in anti-retroviral therapy-naïve perinatally infected children and adolescents with HIV-1 subtype C infection. *BMC Infect Dis*; 12: 317.
120. Newell ML, Peckham C, Dunn D et al. (1994) Natural history of vertically acquired immunodeficiency virus-1 infection: The European Collaborative Study. *Pediatrics*; 94:815-859.
121. Novitsky V, Wester CW, DeGruttola V et al. (2007) The reverse transcriptase 67N 70R 215Y genotype is the predominant TAM pathway associated with virologic failure among HIV type 1C-infected adults treated with ZDV/ddI-containing HAART in Southern Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 23:868–878.
122. Novitsky V, Wang R, Rossenkhan R, Moyo S, Essex M (2013) Intra-host evolutionary rates in HIV-1C env and gag during primary infection. *Infect Genet Evol*; 19:361-368.
123. Obimbo EM, Mbori-Ngacha DA, Ochieng JO et al. (2004) Predictors of early mortality in a cohort of human immunodeficiency virus type 1-infected african children. *Pediatr Infect Dis J*; 23:536-543.
124. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Tratamiento antirretroviral de la infección por el VIH en niños en Latinoamérica y el Caribe: en la ruta hacia el acceso universal. Recomendaciones para un enfoque de salud pública. Disponible en: <http://www2.paho.org/hq/dmdocuments/2008/GuiaARVninos.pdf>.
125. Palladino C, Briz V, González-Tomé MI, et al. (2010) Short communication: evaluation of the effect of enfuvirtide in 11 HIV-1 vertically infected pediatric patients outside clinical trials. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 26:301-305.
126. Pagan, I., Rojas, P., Ramos, J.T., Holguín, A. (2016) Clinical determinants of HIV-1B between-host evolution and their association with drug resistance in pediatric

- patients. Enviado a *Plos One*
127. Pant Pai N, Shivkumar S y Martinez-Cajas JL (2012) Does genetic diversity of HIV-1 non-B subtypes differentially impact disease progression in treatment-naïve HIV-1 infected individuals?: a systematic review of evidence: 1996-2010. *J Acquir Immune Defic Synd*; 59:382-388.
 128. Peeters M, Aghokeng AF, Delaporte E (2016) Genetic diversity among human immunodeficiency virus-1 non-B subtypes in viral load and drug resistance assays. *Clin Microbiol Infect*; 16:1525-1531.
 129. Penazzato M, Dominguez K, Cotton M, Barlow-Mosha L, Ford N (2015) Choice of antiretroviral drugs for postexposure prophylaxis for children: a systematic review. *Clin Infect Dis*; 60: 177-181.
 130. Penazzato M, Prendergast AJ, Muhe LM, Tindyebwa D, Abrams EJ (2014) Optimization of antiretroviral therapy in HIV-infected children under 3 years of age. *Cochrane Database Syst Rev*; 22: CD004772.
 131. Pennings PS (2012) Standing genetic variation and the evolution of drug resistance in HIV. *PLoS Comput Biol* 8: e1002527.
 132. Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD (1996) HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span and viral generation time. *Science*; 271:1582-1586.
 133. Persaud D, Palumbo P, Ziemniak C, et al. (2007) Early archiving and predominance of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-resistant HIV-1 among recently infected infants born in the United States. *J Infect Dis*; 195:1402-1410.
 134. Piñeiro R, Mellado MJ Holguín Á, et al. (2009) Identificación de las diferentes variantes genéticas del VIH-1 en niños de procedencia no española. *An Pediatr (Barc)*; 70:20-26.
 135. Prendergast A, Tudor-Williams G, Jeena P, Burchett S, Goulder P (2007) International perspectives, progress, and future challenges of paediatric HIV infection. *Lancet*; 370:68-80.
 136. Rambaut A, Posada D, Crandall KA, Holmes EC (2004) The causes and consequences of HIV evolution. *Nat Rev Genet*; 5:52-61.
 137. Ramos J (2009) Boosted protease inhibitors as a therapeutic option in the treatment of HIV-infected children. *HIV Med*; 10: 536-457.
 138. Rath BA, von Kleist M, Castillo ME et al (2013) Antiviral resistance and correlates of virologic failure in the first cohort of HIV-infected children gaining access to structured antiretroviral therapy in Lima, Peru: a cross-sectional analysis. *BMC Infect Dis* 2013; 13:1.

139. Rath BA, Yousef KP, Katzenstein DK et al. (2013) Evolution in Response to Triple Reverse Transcriptase Inhibitors & In Silico Phenotypic Analysis. *PLoS One*; 8:e61102.
140. Reddy EA, Agala CB, Maro VP et al. (2016) Test site predicts HIV care linkage and antiretroviral therapy initiation: a prospective 3.5 year cohort study of HIV-positive testers in northern Tanzania. *BMC Infect Dis* 16:497.
141. Riordan A, Judd A, Boyd K et al. (2009) Tenofovir use in human immunodeficiency virus-1-infected children in the United Kingdom and Ireland. *Pediatr Infect Dis J*; 8:204–209.
142. Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, et al. (200) HIV-1 nomenclature proposal. *Science*; 288:55-56.
143. Rodríguez-Da Silva A, Miralles C, Ocampo A, Valverde D. et al. (2015) Prevalence study of the genetic markers associated with slow progression of human immunodeficiency virus type 1 in the Galician population (Northwest of Spain). *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X15001536>.
144. Rojas Sánchez, P, Holguín, A (2014) Drug resistance in the HIV-1-infected paediatric population worldwide: a systematic review. *J Antimicrob Chemother*; 69:2032-6042.
145. Rojas Sánchez P, de Mulder M, Fernandez-Cooke E et al. (2015) Clinical and virologic follow-up in perinatally HIV-1-infected children and adolescents in Madrid with triple-class antiretroviral drug-resistant viruses. *Clin Microbiol Infect*; 21:605.e1-e9.
146. Rojas Sánchez P, Dominguez S, Jiménez de Ory S, et al. (2016a) Trends in drug resistance prevalence, HIV-1 variants and clinical status in HIV-1- infected paediatric population in Madrid: 1993-2015 Analysis. Aceptado en *Pediatr Infect Dis J*.
147. Rojas Sánchez P, Prieto L, Jiménez de Ory S, et al. (2016b) Impact of exposure to lopinavir-ritonavir in HIV-1 infected children and adolescents in Madrid, Spain during 2000-2014. Enviado a *PLoS One*.
148. Ross HA, Rodrigo AG (2002) Immune-mediated positive selection drives human immunodeficiency virus type 1 molecular variation and predicts disease duration. *J Virol*; 76:11715-11720.
149. Ryland EG, Tang Y, Christie CD, Feeney ME (2010) Sequence evolution of HIV-1 following mother-to-child transmission. *J Virol*; 84:12437-12444.
150. Sahle G (2016) Ethiopian maternal care data mining: discovering the factors that affect postnatal care visit in Ethiopia. *Health Inf Sci Syst*; 4:4.
151. Sainz T, Serrano-Villar S, Díaz L et al. (2013) The CD4/CD8 ratio as a marker T-cell activation, senescence and activation/exhaustion in treated HIV-infected children and young adults. *AID*;S 27: 1513–1519.

152. Sanchez JM, Ramos Amador JT, Fernández de Miguel S et al. (2003) Impact of highly active antiretroviral therapy on the morbidity and mortality in Spanish human immunodeficiency virus-infected children. *Pediatr Infect Dis J*; 22:863–867.
153. Santoro MM, Perno CF (2013) HIV-1 Genetic Variability and Clinical Implications. *Microbiol*; 17:481314.
154. Santos AF, Tebit DM, Lalonde MS, et al. (2012) Effect of natural polymorphisms in the HIV-1 CRF02_AG protease on protease inhibitor hypersusceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*; 56:2719-2725.
155. Saravanan S, Vidya M, Balakrishnan P et al. (2012). Viremia and HIV-1 drug resistance mutations among patients receiving second-line highly active antiretroviral therapy in Chennai, Southern India. *Clin Infect Dis*; 54:995–1000
156. Serrano-Villar S, Deeks SG (2015) CD4/CD8 ratio: an emerging biomarker for HIV. *Lancet HIV*; 2:e76-e77
157. Serrano-Villar S, Gutiérrez C, Vallejo A et al. (2013) The CD4/CD8 ratio in HIV-infected subjects on effective ART could be a surrogate marker of immune activation and possibly of immunosenescence. *J Infect*; 66:57-66
158. Serrano-Villar S, Pérez-Elías MJ, Drona F et al. (2014) Increased risk of serious non-AIDS-related events in HIV-infected subjects on antiretroviral therapy associated with a low CD4/CD8 ratio. *PLoS One*; 9:e85798.
159. Serrano-Villar S, Sainz T, A Lee S, et al. (2014) HIV-Infected Individuals with low CD4/CD8 ratio despite effective antiretroviral therapy exhibit altered T Cell subsets, heightened CD8+ T Cell activation, and increased risk of non-AIDS morbidity and mortality. *PLoS Pathog*; 10: e1004078.
160. Shacker TW, Colier AC, Hughes J, et al. (1996) Clinical and epidemiological features of primary HIV infection. *Ann Inter Med*; 125:257-64.
161. Shet A, Neogi U, Sahoo PN et al. 2013) Effectiveness of first-line antiretroviral therapy and acquired drug resistance among HIV-1 infected children in India. *Pediatr Infect Dis J*; 32: e227–e229.
162. Shriner D, Liu Y, Nickle DC, Mullins JI (2006) Evolution of intrahost HIV-1 genetic diversity during chronic infection. *Evolution*; 60:1165-1176.
163. Simonetti FR, Lai A, Monno L, et al. (2014) Identification of a new HIV-1 BC circulating recombinant form (CRF60_BC) in Italian young men having sex with men. *Infect Genet Evol*; 23:176-181.
164. Simonetti SR, Schatzmayr HG, Simonetti JP (2003) Human immunodeficiency virus type 1: drug resistance in treated and untreated Brazilian children. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 98: 831–837.

165. SINIVIH (2015) Vigilancia Epidemiológica del VIH/SIDA en España: Sistema de Información sobre Nuevos Diagnósticos de VIH y Registro Nacional de Casos de Sida. Secretaría del Plan Nacional sobre el Sida/Centro Nacional de Epidemiología. Madrid. Disponible en:
http://www.msssi.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/vigilancia/InformeVIH_SIDA_2015.pdf
166. Soto-Ramirez LE, Rodriguez-Diaz R, Harris DR et al.(2010) HIV drug resistance-associated mutations in antiretroviral *naive* HIV-1 infected Latin American children. *Adv Virol*; 2010: 407476.
167. Stadeli KM, Richman DD (2013) Rates of emergence of HIV drug resistance in resource-limited settings: a systematic review. *Antivir Ther*; 18: 115–123.
168. Stephens D, Diesing M.A (2014) A comparison of supervised classification methods for the prediction of substrate type using multibeam acoustic and legacy grain-size data. *PLoS One*; 9:e93950.
169. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol*; 30:2725-2729.
170. Tatarelli P, Taramasso L, Di Biagio A, et al. (2016) HIV-1 RNA quantification in CRF02_AG HIV-1 infection: too easy to make mistakes. *New Microbiol*; 39:150-152.
171. Thomson MM, Nájera R (2007) Increasing HIV-1 genetic diversity in Europe. *J Infect Dis*; 196:1120-1124.
172. Tovo PA, de Matlino M, Gabiano C, et al. (1992) Prognostic factors and survival in children with perinatal HIV infection. *Lancet*; 339:1249-1253.
173. Towler WI, Barlow-Mosha L, Church JD et al.(2010) Analysis of drug resistance in children receiving antiretroviral therapy for treatment of HIV-1 infection in Uganda. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 26: 563–568.
174. UNAIDS (2016a) Global report on AIDS. Disponible en:
http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/global-AIDS-update-2016_en.pdf.
175. UNAIDS (2015) Global report on AIDS by the number. Disponible en:
http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/AIDS_by_the_numbers_2015_en.pdf.
176. UNAIDS (2016b) On the fast track to an AIDS free generation. Disponible en:
http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/GlobalPlan2016_en.pdf
177. UNAIDS PCB3 (2016). UNAIDS 2016-2012 strategy. Disponible en:
http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/20151027_UNAIDS_PCB37_15_18_EN_rev1.pdf
178. Van de Vijver DA, Wensing AM, Angarano G, et al.(2005) Differences in the frequency

- of minor substitutions between HIV-1 subtypes and their potential impact on the genetic barrier for resistance to protease inhibitors. *Antivir Ther*; 10:S145.
179. Vercauteren J, Wensing AM, van de Vijver DA, et al. (2009) Transmission of drug-resistant HIV-1 is stabilizing in Europe. *J Infect Dis*; 200:1503-1508.
 180. Violari A, Cotton MF, Gibb DM, et al. CHER Study Team. (2008) Early antiretroviral therapy and mortality among HIV-infected infants. *N Engl J Med*; 359:2233-2244.
 181. von Wyl V, Kouyos RD, Yerly S, et al. (2011) The role of migration and domestic transmission in the spread of HIV-1 non-B subtypes in Switzerland. *J Infect Dis*; 204:1095-1103.
 182. Welch S, Sharland M, Lyall EG et al. (2009) PENTA 2009 guidelines for the use of antiretroviral therapy in paediatric HIV-1 infection. *HIV Med* 2;10:591-613.
 183. Wensing AM, Calvez V, Günthard HF et al. (2015) Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1. *Top Antivir Med*; 23:132-141.
 184. Wensing AM, Calvez V, Günthard HF et al. (2014) Update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Top Antivir Med*; 22:642-650.
 185. Wiznia A, Church J, Emmanuel P, et al. (2007) Safety and efficacy of enfuvirtide for 48 weeks as part of an optimized antiretroviral regimen in pediatric human immunodeficiency virus 1-infected patients. *Pediatr Infect Dis J*; 26:799-805.
 186. World Health Organization (WHO) (2010a) Antiretroviral therapy for HIV infection in infants and children: Towards universal access. Recommendations for a public health approach: 2010 revision Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599801_eng.pdf.
 187. World Health Organization (WHO) (2016a) Consolidate guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/208825/1/9789241549684_eng.pdf?ua=1
 188. World Health Organization (WHO) (2016b) Global action plan on HIV drug resistance (2017-2021). Draft zero for consultation. Disponible en: http://who.int/hiv/drugresistance/hivdr_darft_gap.pdf
 189. World Health Organization (WHO)(2010b) Manual for HIV drug resistance testing using dried blood spot specimens. Disponible en: http://www.who.int/hiv/pub/drugresistance/dried_blood_spots/en/
 190. World Health Organization (WHO) (2014) Optimizing treatment options and improving access to priority products for children living with HIV Brief Disponible . Disponible en: http://www.who.int/hiv/pub/toolkits/pediatric_art_optimisation-brief/en/
 191. World Health Organization (WHO) (2015) WHO guideline on when to start

- antiretroviral therapy and on pre-exposure prophylaxis for HIV. Disponible en:http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/186275/1/9789241509565_eng.pdf
192. World Health Organization (WHO) (2010c) WHO recommendations on the diagnosis of HIV infection in infants and children. Disponible en: <http://www.who.int/hiv/pub/paediatric/diagnosis/en/>
193. Yebra G, de Mulder M, del Romero J, et al. (2010) HIV-1 non-B subtypes: High transmitted NNRTI-resistance in Spain and impaired genotypic resistance interpretation due to variability. *Antiviral Res*; 85:409-417.
194. Yebra G, de Mulder M, Martín L, et al. (2012) Most HIV type 1 non-B infections in the Spanish cohort of antiretroviral treatment-naïve HIV-infected patients (CoRIS) are due to recombinant viruses. *J Clin Microbiol*; 50:407-413.
195. Yebra G, de Mulder M, Martín L, et al. (2011) Sensitivity of seven HIV subtyping tools differs among subtypes/recombinants in the Spanish cohort of naïve HIV-infected patients (CoRIS). *Antivir Res*; 89:19-25.
196. Yin DE, Warshaw MG, Miller WC et al. (2014) Using CD4 percentage and age to optimize pediatric antiretroviral therapy initiation. *Pediatrics*; 134: e1104-1116.
197. Zhang M, Foley B, Schultz AK, et al. (2010) The role of recombination in the emergence of a complex and dynamic HIV epidemic. *Retrovirology*; 7:25.
198. Zhuang J, Jetzt AE, Sun G, et al. (2002) Human immunodeficiency virus type 1 recombination: rate, fidelity, and putative hot spots. *J Virol*; 76:11273-11282.

ANEXO I

RECURSOS EN INTERNET

RECURSOS EN INTERNET

- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios - AEMPS
www.aemps.gob.es
- Agencia Europea de Medicina (European Medicines Agency, EMA)
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Other/
- ClustalX
<http://www.clustal.org/>
- Cohorte nacional de pacientes pediátricos con infección VIH (CORISPE)
<http://www.corispe.org>
- CPR (*Calibrated Population Resistance*, Universidad de Stanford, EE. UU.)
<http://cpr.stanford.edu/cpr.cgi>
- HIValg (Universidad de Stanford, EE. UU.)
<http://sierra2.stanford.edu/sierra/servlet/JSierra?action=hivalgs>
- Listado de CRF del LANL
<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>
- PHYLIP (Phylogeny Inference Package)
<http://www.phylip.com/>
- Sociedad Internacional de Sida de los EE. UU. (IAS-USA)
<http://www.iasusa.com/>

ALGORITMOS DE INTERPRETACIÓN GENOTÍPICA DE RESISTENCIAS

- HIVdb (Universidad de Stanford, EE. UU.)
<http://sierra2.stanford.edu/sierra/servlet/JSierra>

ANEXO II

MATERIAL ADICIONAL

LISTADOS DE MUTACIONES DE RESISTENCIA A ANTIRRETROVIRALES UTILIZADOS

Listado OMS actualización 2009

Listado IAS-USA actualización 2015

IP	ITIAN	ITINAN	IP mayor	IP minor	ITIAN	ITINAN
L23I	M41L	L100I	D30N	L10V/I/R/F/C	M41L	V90I
L24I	K65R	K101E/P	V32I	V11I	A62V	A98G
D30N	D67N/G/E	K103N/S	M46I/L	G16E	K65R	L100I
V32I	T69D/ins	V106M/A	I47V/A	K20R/M/I/T/V	D67N	K101E/H/P
M46I/L	K70R/E	V179F	G48V	L24I	T69ins	K103N/S
I47V/A	L74V/I	Y181C/I/V	I50L/V	L33I/V/F	K70R/E	V106M/A/I
G48V/M	V75M/T/A/S	Y188L/H/C	I54M/L	E34Q	L74V	V108I
I50V/L	F77L	G190A/S/E	Q58E	M36I/L/V	V75I	E138A/G/K/Q/R
F53L/Y	Y115F	P225H	T74P	K43T	F77L	V179D/F/T/L
I54V/L/M/A/T/S	F116Y	M230L	L76V	F53L/Y	Y115F	Y181C/I/V
G73S/T/C/A	Q151M		V82A/T/F/S/L	I54V/T/A/S	F116Y	Y188C/L/H
L76V	M184V/I		N83D	D60E	Q151M	G190S/A
V82A/T/F/S/C/M/L	L210W		I84V	I62V	M184V/I	H221Y
N83D	T215Y/F/I/S/C/D/V/E		N88S	L63P	L210W	P225H
I84V/A/C	K219Q/E/N/R		L90M	I64L/M/V	T215Y/F/rev	P227C
I85V				H69K/R	K219Q/E	M230L/I
N88D/S				A71V/I/T/L		
L90M				G73C/S/T/A		
				V77I		
				V82I		
				N83D		
				I85V		
				N88D		
				L89M/V/I		
				I93L/M		

En azul, sustituciones no incluidas en el otro listado.

Material suplementario S1. Evaluación de la bondad de 6 algoritmos (clasificadores) para cada uno de los parámetros evolutivos del VIH-1B y la frecuencia de MDR como variables a predecir.

	<i>d</i>					
	<i>Naive Bayes</i>	TAN	Árbol J48	IB-1	Regresión logística	IB-K
Instancias clasificadas correctamente	126(64,9%)	122(62,9%)	135(69,6%)	152(78,4%)	127(65,5%)	144 (74,2%)
Instancias clasificadas incorrectamente	68(35,1%)	72(37,1%)	59(30,4%)	42(21,65)	67(34,5%)	50 (25,8%)
TP	0,649	0,629	0,696	0,7847	0,655	0,742
TN	0,187	0,196	0,19	0,117	0,179	0,157
Precisión	0,65	0,64	0,684	0,778	0,652	0,732
Cobertura	0,649	0,629	0,696	0,784	0,655	0,742
Medida de F	0,65	0,631	0,682	0,78	0,653	0,73
AUC	0,807	0,803	0,847	0,833	0,782	0,88
Matriz de confusión	a b c	a b c	a b c	a b c	a b c	a b c
a	69 10 13	62 7 23	83 2 7	85 3 4	72 14 6	87 3 2
b	13 26 10	14 26 9	48 22 9	5 33 11	12 21 16	9 29 11
c	9 13 31	8 11 34	11 12 30	9 10 34	8 11 34	14 11 28

	<i>d_N</i>					
	<i>Naive Bayes</i>	TAN	Árbol J48	IB-1	Regresión logística	IB- K
Instancias clasificadas correctamente	111(57,5%)	111(57,5%)	128(66,3%)	142(73,6%)	112(58%)	137(71%)
Instancias clasificadas incorrectamente	82(42,5%)	82(42,5%)	65(33,7%)	51(26,4%)	81(42%)	56(29%)
TP	0,575	0,575	0,663	0,736	0,58	0,71
TN	0,189	0,215	0,204	0,14	0,213	0,174
Precisión	0,642	0,594	0,667	0,73	0,591	0,698
Cobertura	0,575	0,575	0,663	0,736	0,58	0,71
Medida de F	0,589	0,582	0,658	0,732	0,585	0,697
AUC	0,781	0,773	0,835	0,798	0,711	0,853
Matriz de confusión	a b c	a b c	a b c	a b c	a b c	a b c
a	55 3 32	56 5 29	73 3 14	81 1 8	63 8 19	83 2 5
b	5 21 23	10 29 10	12 25 12	4 31 14	7 24 18	11 28 10
c	6 13 35	12 16 26	18 6 30	12 12 30	15 14 25	15 13 26

	<i>ds</i>					
	<i>Naive Bayes</i>	TAN	Árbol J48	IB-1	Regresión logística	IB- K
Instancias clasificadas correctamente	132(67,7%)	136(69,7%)	141(72,3%)	148(75,9%)	130(66,7%)	147(75,4%)
Instancias clasificadas incorrectamente	63(32,3%)	59(30,3%)	54(27,7%)	47(24,1%)	65(33,3%)	48(24,6%)
TP	0,677	0,697	0,723	0,759	0,667	0,754
TN	0,179	0,16	0,159	0,135	0,179	0,188
Precisión	0,679	0,7	0,722	0,757	0,671	0,769
Cobertura	0,677	0,697	0,723	0,759	0,667	0,754
Medida de F	0,677	0,698	0,717	0,758	0,668	0,744
AUC	0,802	0,849	0,811	0,812	0,76	0,868
Matriz de confusión	a b c	a b c	a b c	a b c	a b c	a b c
a	72 16 6	74 12 8	76 9 9	80 10 4	70 9 15	88 5 1
b	9 33 10	10 31 11	15 26 11	9 33 10	9 33 10	19 30 3
c	13 9 27	8 10 31	6 4 39	8 6 35	12 10 27	15 5 29

	MDR					
	<i>Naive Bayes</i>	TAN	Árbol J48	IB-1	Regresión logística	IB- K
Instancias clasificadas correctamente	143(89,9%)	140(88,1%)	142(89,3%)	147(92,5%)	139(87,4%)	148(93,1%)
Instancias clasificadas incorrectamente	16(10,1%)	19(11,9%)	17(10,7%)	12(7,5%)	20(12,6%)	11(6,9%)
TP	0,899	0,881	0,893	0,9258	0,874	0,931
TN	0,169	0,401	0,513	0,203	0,173	0,202
Precisión	0,918	0,878	0,881	0,928	0,907	0,932
Cobertura	0,899	0,881	0,893	0,925	0,874	0,931
Medida de F	0,906	0,879	0,881	0,926	0,885	0,931
AUC	0,936	0,918	0,755	0,861	0,845	0,917
Matriz de confusión	a b	a b	a b	a b	a b	a b
a	125 12	128 9	133 4	130 7	121 16	131 6
b	4 18	10 12	13 9	5 1 7	4 18	5 17

	MDR a ITIAN					
	<i>Naive Bayes</i>	TAN	Árbol J48	IB-1	Regresión logística	IB- K
Instancias clasificadas correctamente	149(76%)	149(76%)	158(80,6%)	164(83,7%)	150(76,5%)	163(83,2%)
Instancias clasificadas incorrectamente	47(23,9%)	47(23,9%)	38(19,4%)	32(16,3%)	46(23,5%)	33(16,8%)
TP	0,76	0,76	0,806	0,837	0,765	0,832
TN	0,24	0,24	0,197	0,161	0,235	0,166
Precisión	0,76	0,76	0,81	0,842	0,765	0,836
Cobertura	0,76	0,76	0,806	0,837	0,765	0,832
Medida de F	0,76	0,76	0,805	0,836	0,765	0,831
AUC	0,843	0,86	0,84	0,838	0,833	0,9
Matriz de confusión	a b	a b	a b	a b	a b	a b
a	72 24	73 23	71 25	86 10	72 24	85 11
b	23 77	24 76	13 87	22 78	22 78	22 78

	MDR a ITINAN					
	<i>Naive Bayes</i>	TAN	Árbol J48	IB-1	Regresión logística	IB- K
Instancias clasificadas correctamente	158(84,9%)	158(84,9%)	148(79,6%)	161(86,6%)	142(76,3%)	162(87,1%)
Instancias clasificadas incorrectamente	28(15,1%)	28(15,1%)	38(20,4%)	25(13,4%)	44(23,7%)	24(12,9%)
TP	0,849	0,849	0,796	0,866	0,763	0,871
TN	0,185	0,189	0,279	0,15	0,257	0,138
Precisión	0,852	0,854	0,821	0,865	0,763	0,871
Cobertura	0,849	0,849	0,796	0,866	0,763	0,871
Medida de F	0,847	0,846	0,783	0,865	0,763	0,871
AUC	0,877	0,888	0,783	0,865	0,829	0,934
Matriz de confusión	a b	a b	a b	a b	a b	a b
a	56 20	55 21	42 34	62 14	53 23	64 12
b	8 102	7 103	4 106	11 99	21 89	12 98

	MDR a IP					
	<i>Naive Bayes</i>	TAN	Árbol J48	IB-1	Regresión logística	IB- K
Instancias clasificadas correctamente	161 (75,6%)	174(81,7%)	166(77,9%)	197 (92,5%)	175(82,2%)	183(85,9%)
Instancias clasificadas incorrectamente	52(24,4%)	39(18,3%)	47(22,1%)	16(7,5%)	38(17,8%)	30(14,1%)
TP	0,756	0,817	0,779	0,925	0,822	0,859
TN	0,247	0,2	0,258	0,092	0,197	0,177
Precisión	0,763	0,817	0,777	0,925	0,822	0,859
Cobertura	0,756	0,817	0,779	0,9258	0,822	0,859
Medida de F	0,758	0,817	0,777	0,9258	0,822	0,857
AUC	0,86	0,884	0,841	0,917	0,858	0,906
Matriz de confusión	a b	a b	a b	a b	a b	a b
a	62 21	64 19	56 27	73 10	4 19	63 20
b	31 99	20 110	20 110	6 124	19 111	10 120

d , distancia genética; TAN, *Tree-augmented Naive Bayesian Network* ; IB, vecino más cercano (donde $K = 3$); TP, tasa de verdaderos positivos; TN, tasa de verdaderos negativos; $F=2*Precisión*Cobertura/(Precisión+Cobertura)$; AUC, área bajo la curva ROC; ROC, *Receiver Operating Characteristic*; d_N tasa de sustituciones nucleotídicas no sinónimas, d_S tasa de sustituciones nucleotídicas sinónimas; MDR, mutaciones de resistencia; ITIAN, inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos; ITINAN, inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos; IP, inhibidor de la proteasa.

Material suplementario S2. Selección de variables predictoras para cada uno de los parámetros evolutivos del VIH-1B y la frecuencia de MDR como variables a predecir mediante el método *wrapper*^a.

<i>d</i>		
IB-1 (%)	IB- K (%)	Árbol J48 (%)
Año de diagnóstico VIH-1 (100%)	Año de la toma del primer TAR (100%)	Edad de diagnóstico VIH-1 (100%)
MDR a IP (80%)	Edad de diagnóstico VIH-1 (100%)	Año de la toma del primer TAR (100%)
Edad de diagnóstico VIH-1 (70%)	T CD8 céls/mm ³ (60%)	
Coinfección con VHC y/o VHB (60%)		
Nº de regímenes/TAR previos (60%)		
Nº de ARV (60%)		
Experiencia IF (60%)		
Origen del paciente (60%)		
<i>d_N</i>		
IB-1 (%)	IB- K (%)	Árbol J48 (%)
Año de diagnóstico VIH-1 (90%)	Edad al primer TAR (100%)	Edad al primer TAR (100%)
Experiencia a IP (90%)	Experiencia a ITINAN (80%)	Edad de diagnóstico VIH-1 (70%)
T CD8 céls/mm ³ (70%)	T CD8 céls/mm ³ (60%)	
Coinfección con VHC y/o VHB (70%)	Experiencia a IP (60%)	
Experiencia a IF (70%)	Origen del paciente (60%)	
MDR a IP (60%)		
<i>d_s</i>		
IB-1 (%)	IB- K (%)	Árbol J48 (%)
Año de infección (100%)	Edad de diagnóstico VIH-1 (90%)	Año de diagnóstico VIH-1 (70%)
Año de diagnóstico VIH-1 (100%)	Año de infección (80%)	Origen del paciente (70%)
Edad al primer TAR (80%)	Coinfección con VHC y/o VHB (60%)	Año de la toma del primer TAR (70%)
Coinfección con VHC y/o VHB (60%)	Edad al primer TAR (60%)	Coinfección con VHC y/o VHB (60%)
Edad de diagnóstico VIH-1 (60%)		
MDR a ITIAN (60%)		

MDR		
IB-1 (%)	IB- K (%)	Árbol J48 (%)
-	T CD4 céls/mm ³ (100%)	Año de secuencia (60%)
-	Nº de regímenes/TAR previos (60%)	

MDR a ITIAN		
IB-1 (%)	IB- K (%)	Árbol J48 (%)
Año de infección (90%)	Año de infección (90%)	Año de infección (90%)
Nº de ARV (90%)	Coinfección con VHC y/o VHB (80%)	Coinfección con VHC y/o VHB (80%)
Año de diagnóstico VIH-1 (80%)	%CD8 (60%)	%CD8 (70%)
Año de secuencia (60%)		Edad de diagnóstico VIH-1 (60%)
Origen del paciente (60%)		

MDR a ITINAN		
IB-1 (%)	IB- K (%)	Árbol J48 (%)
Edad al primer TAR (90%)	Experiencia a ITINAN (100%)	Ratio CD4/CD8 (60%)
Nº de ARV (80%)	Ratio CD4/CD8 (70%)	
Experiencia a ITINAN (80%)	Edad al primer TAR (70%)	
Año de secuencia (70%)	Experiencia a IF (80%)	
Experiencia a IF (70%)	Experiencia a IP (60%)	

MDR a IP		
IB-1 (%)	IB- K (%)	Árbol J48 (%)
Año de infección (90%)	Año de infección (90%)	Año de infección (100%)
Nº de ARV (70%)	Experiencia a ITINAN (90%)	Edad al primer TAR (100%)
Origen del paciente (70%)	Edad al primer TAR (80%)	Coinfección con VHC y/o VHB (90%)
Coinfección con VHC y/o VHB (70%)	Origen del paciente (70%)	Año de diagnóstico VIH-1 (80%)
Edad al primer TAR (60%)	Coinfección con VHC y/o VHB (70%)	

^aEn todas las tablas se muestran únicamente aquellas variables que resultaron ser relevantes en un porcentaje superior al 50% usando el método *wrapper*. N^o, número; T CD4, linfocitos CD4; T CD8, linfocitos T CD8; IB, vecino más cercano (donde K = 3); *d*, distancia genética; TAR, tratamiento antirretroviral; ARV, antirretroviral; *d_N*, tasa de sustituciones nucleotídicas no sinónimas; *d_S*, tasa de sustituciones nucleotídicas sinónimas; MDR, mutaciones de resistencia; ITIAN, inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos; ITINAN, inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos; IP, inhibidor de la proteasa. IF, inhibidor de fusión. Valores de IB-1 igual a “-”, indica que ninguna variable fue relevante en un valor superior al 50%. VHC, virus de la hepatitis C; VHB, virus de la hepatitis B.

Material suplementario S3. Selección de variables predictoras para cada uno de los parámetros evolutivos del VIH-1B y la frecuencia de MDR mediante análisis Univariante (InfoGainAttributeEva y GainRatioAttributeEval) y multivariante (CFS).

<i>d</i>		
UNIVARIANTE		MULTIVARIANTE
InfoGainAttributeEval	GainRatioAttributeEval	CFS (%)
Edad al primer TAR (0,2818)	Año de diagnóstico VIH-1 (0,2631)	T CD8 céls/mm ³ (100%)
T CD4 céls/mm ³ (0,1512)	Edad al primer TAR (0,211)	Nº de regímenes/TAR previos (100%)
T CD8 céls/mm ³ (0,1499)	Experiencia a INI (0,1763)	Experiencia a ITINAN (100%)
Año de infección (0,1278)	Origen del Paciente (0,1501)	Edad de diagnóstico VIH-1 (80%)
Ratio CD4/CD8 (0,1263)	ITINANexperience (0,1335)	Experiencia a lint (80%)
Experiencia a ITINAN (0,1148)	Año de infección (0,1214)	Año de diagnóstico VIH-1 (70%)
Nº de regímenes/TAR previos (0,1059)	Nº de regímenes/TAR previos (0,1165)	Año del primer ART (50%)
	Naive (0,1164)	
	Edad de diagnóstico VIH-1 (0,105)	

<i>d_N</i>		
UNIVARIANTE		MULTIVARIANTE
InfoGainAttributeEval	GainRatioAttributeEval	CFS (%)
Edad al primer TAR (0,4651)	Naive (0,2492)	Edad al primer TAR (60%)
Año de diagnóstico VIH-1 (0,3678)	Edad al primer TAR (0,2264)	Nº de ARV (70%)
Año de secuencia (0,1704)	Año de diagnóstico VIH-1 (0,2111)	Experiencia a ITINAN (100%)
T CD4 céls/mm ³ (0,1609)	Experiencia a INI (0,1641)	
Experiencia a ITINAN (0,1575)	Experiencia a ITINAN (0,1396)	
Nº de ARV (0,1307)	Nº de ARV (0,1313)	
Año de infección (0,1294)	Año de infección (0,1308)	
T CD8 céls/mm ³ (0,1235)	MDR a ITINAN (0,1005)	
CD8% (0,1142)		
Ratio CD4/CD8 (0,1085)		
Carga viral (0,1071)		

<i>d_N</i>		
UNIVARIANTE		MULTIVARIANTE
InfoGainAttributeEval	GainRatioAttributeEval	CFS (%)
Año del primer TAR (0,3714)	Año de infección (0,2595)	Año de infección (100%)
Año de infección (0,3548)	Año del primer TAR (0,2249)	Año de diagnóstico VIH-1 (50%)
Año de diagnóstico VIH-1 (0,222)	Origen del paciente (0,2188)	Ratio CD4/CD8 (100%)
MDR a IP (0,1220)	Coinfección con VHC y/o VHB (0,1662)	Edad al primer TAR (100%)
Ratio CD4/CD8 (0,1137)	Experiencia a INI (0,1536)	Nº de regímenes/TAR previos (60%)
Carga viral (0,1061)	Año de diagnóstico VIH-1 (0,1506)	
	MDR a IP (0,1302)	
	Nº de regímenes/TAR previos (0,1185)	

MDR		
UNIVARIANTE		MULTIVARIANTE
InfoGainAttributeEval	GainRatioAttributeEval	CFS (%)
T CD4 céls/mm ³ (0,1480)	Año de secuencia (0,1167)	Año de infección (100%)
CD8% (0,1177)	Año de infección (0,1160)	Año de secuencia (100%)
Año de diagnóstico VIH-1 (0,1160)	Nº de regímenes/TAR previos (0,1147)	CD8% (100%)
Año de secuencia (0,1134)	Edad de diagnóstico VIH-1 (0,1070)	T CD4 céls/mm ³ (100%)
Nº de regímenes/TAR previos (0,1110)		Nº de regímenes/TAR previos (100%)
Edad al diagnóstico VIH-1 (0,1018)		Año de diagnóstico VIH-1 (90%)

MDR a ITIAN		
UNIVARIANTE		MULTIVARIANTE
InfoGainAttributeEval	GainRatioAttributeEval	CFS (%)
Año de infección (0,2915)	Año de diagnóstico (0,1970)	Coinfección con VHC y/o VHB (100%)
% CD4 (0,1586)	Nº de ARV (0,1823)	%CD4 (100%)
Ratio CD4/CD8 (0,1396)	%CD4 (0,1586)	Año de diagnóstico (90%)
%CD8 (0,1205)	Coinfección con VHC y/o VHB (0,1501)	Año de secuencia (90%)

MDR a ITIAN		
UNIVARIANTE		MULTIVARIANTE
InfoGainAttributeEval	GainRatioAttributeEval	CFS (%)
Nº de ARV (0,1127)	Año de infección (0,1492)	Nº de ARV (70%)
T CD4 céls/mm ³ (0,1097)	Origen del paciente (0,1382)	Año de infección (60%)

MDR a ITINAN		
UNIVARIANTE		MULTIVARIANTE
InfoGainAttributeEval	GainRatioAttributeEval	CFS (%)
Experiencia a ITINAN (0,2289)	Experiencia a ITINAN (0,2634)	%CD4 (100%)
Ratio CD4/CD8 (0,1671)	Nº de ARV (0,1885)	Nº de ARV (100%)
T CD4 céls/mm ³ (0,1667)	Experiencia a IP (0,1552)	Experiencia a ITINAN (100%)
T CD8 céls/mm ³ (0,1574)	Origen del paciente (0,1383)	Edad al primer TAR (90%)
Nº de ARV (0,1559)	%CD4 (0,1055)	%CD8 (90%)
Carga viral (0,1230)		T CD4 céls/mm ³ (70%)
Edad al primer TAR (0,1171)		Experiencia a IP (70%)
%CD4 (0,1054)		Año de secuencia (50%)

MDR a IP		
UNIVARIANTE		MULTIVARIANTE
InfoGainAttributeEval	GainRatioAttributeEval	CFS (%)
Año de infección (0,4630)	Origen del paciente (0,1907)	Año de infección (100%)
Carga viral (0,1057)	Nº de regímenes/TAR previos (0,175)	Año de secuencia (60%)
Ratio CD4/CD8 (0,1032)	Año de infección (0,1685)	Nº de regímenes/TAR previos (70%)
	Experiencia a IP (0,1298)	Origen del paciente (100%)
	Coinfección con VHC y/o VHB (0,1014)	Nº de ARV (50%)
		Experiencia a IP (50%)

Nº, número; T CD4, linfocitos T CD4; T CD8, linfocitos T CD8; TAR, tratamiento antirretroviral; ARV, antirretroviral; d , distancia genética; d_N tasa de sustituciones nucleotídicas no sinónimas, d_S tasa de sustituciones nucleotídicas sinónimas; MDR, mutaciones de resistencia; ITIAN, inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos; ITINAN, inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos; IP, inhibidor de la proteasa; INI, inhibidores de integrasa.

Material suplementario S4. Evaluación de los 6 clasificadores tras la implementación de la herramienta FSS (*feature subset selection techniques*) para cada uno de los parámetros evolutivos del VIH-1B y la frecuencia de MDR.

d									
FSS	Clasificadores	Instancias clasificadas correctamente	TP	TN	Precisión	Cobertura	Medida de F	Área bajo la curva ROC	Matriz de confusión a b c
InfoGain Attribute Eval	Árbol J48	134(69,1%)	0,691	0,192	0,678	0,691	0,677	0,846	82 2 7 18 22 9 11 13 29
	IB-K	144(74,2%)	0,742	0,157	0,732	0,742	0,73	0,88	87 3 2 9 29 11 14 11 28
	IB-1	152(78,4%)	0,784	0,177	0,778	0,784	0,78	0,833	85 3 4 5 33 11 9 10 34
GainRatio Attribute Eval	Árbol J48	134(86,1%)	0,691	0,192	0,678	0,691	0,677	0,846	83 2 7 18 2 9 11 13 29
	IB-K	144(74,2%)	0,742	0,157	0,732	0,742	0,73	0,88	87 3 2 9 29 11 14 11 28
	IB-1	152(78,4%)	0,784	0,177	0,788	0,784	0,78	0,833	85 3 4 5 33 11 9 10 34
CFS	Árbol J48	132(68%)	0,68	0,172	0,679	0,68	0,676	0,831	77 10 5 10 29 10 11 16 26
	IB-K	143(73,7%)	0,737	0,169	0,732	0,737	0,726	0,837	85 3 4 12 30 7 15 10 28
	IB-1	148(76,3%)	0,763	0,119	0,767	0,763	0,764	0,822	78 5 9 5 32 12 7 8 38

d_N									
FSS	Clasificadores	Instancias clasificadas correctamente	TP	TN	Precision	Cobertura	Medida de F	Área bajo la curva ROC	Matriz de confusión a b c
InfoGain Attribute Eval	Árbol J48	129(66,8%)	0,668	0,202	0,671	0,668	0,663	0,842	74 3 13 12 25 12 18 6 30
	IB-K	137(70,9%)	0,71	0,174	0,698	0,71	0,697	0,853	83 2 5 1 28 10 15 13 26
	IB-1	142(73,6%)	0,736	0,14	0,73	0,736	0,732	0,798	81 1 8 4 31 14 12 12 30

d_N									
FSS	Clasificadores	Instancias clasificadas correctamente	TP	TN	Precision	Cobertura	Medida de F	Área bajo la curva ROC	Matriz de confusión a b c
GainRatio Attribute Eval	Árbol J48	129(66,8%)	0,668	0,202	0,671	0,668	0,663	0,842	74 3 13 12 25 12 18 6 30
	IB-K	137(70,9%)	0,71	0,171	0,698	0,71	0,697	0,853	83 2 5 1 28 10 15 13 26
	IB-1	142(73,6%)	0,736	0,14	0,73	0,736	0,732	0,798	81 1 8 4 31 14 12 12 30
CFS	Árbol J48	133(68,9%)	0,689	0,185	0,67	0,689	0,675	0,857	74 1 15 4 40 5 23 12 19
	IB-K	132(68,4%)	0,684	0,201	0,677	0,684	0,676	0,812	73 0 17 10 36 3 22 9 23
	IB-1	132(68,4%)	0,684	0,19	0,675	0,684	0,677	0,747	73 2 15 8 35 6 20 10 24

d_s									
FSS	Clasificadores	Instancias clasificadas correctamente	TP	TN	Precision	Cobertura	Medida de F	Área bajo la curva ROC	Matriz de confusión a b c
InfoGain Attribute Eval	Árbol J48	144(73,8%)	0,738	0,154	0,737	0,738	0,735	0,827	76 9 9 15 29 8 6 4 39
	IB-K	147(75,4%)	0,754	0,188	0,769	0,754	0,744	0,868	88 5 1 19 30 3 15 5 29
	IB-1	148(75,9%)	0,759	0,135	0,757	0,759	0,758	0,812	80 10 4 9 33 10 8 6 35
GainRatio Attribute Eval	Árbol J48	142(72,8%)	0,728	0,157	0,7227	0,728	0,723	0,815	76 9 9 15 27 10 6 4 39
	IB-K	147(75,4%)	0,754	0,188	0,769	0,7554	0,744	0,868	88 5 1 19 30 3 15 5 29
	IB-1	148(75,9%)	0,759	0,135	0,757	0,759	0,758	0,812	80 10 4 9 33 10 8 6 35
CFS	Árbol J48	124(63,6%)	0,636	0,197	0,645	0,636	0,64	0,78	66 21 7 17 26 9 6 11 32
	IB-K	125(64,1%)	0,641	0,21	0,637	0,641	0,638	0,799	72 16 6 14 27 11 14 9 26
	IB-1	132(67,7%)	0,677	0,159	0,698	0,667	0,681	0,759	61 24 9 8 35 9 7 6 36

MDR									
FSS	Clasificadores	Instancias clasificadas correctamente	TP	TN	Precision	Cobertura	Medida de F	Área bajo la curva ROC	Matriz de confusión a b c
InfoGainAttribute Eval	Árbol J48	142(89,3%)	0,893	0,513	0,881	0,893	0,881	0,7554	133 4 13 9
	IB-K	148(93,1%)	0,931	0,202	0,932	0,931	0,931	0,916	131 6 5 17
	IB-1	147(92,5%)	0,925	0,203	0,928	0,925	0,926	0,861	130 7 5 17
GainRatioAttribute Eval	Árbol J48	142(89,3%)	0,893	0,513	0,881	0,893	0,881	0,755	133 4 13 9
	IB-K	148(93,1%)	0,931	0,202	0,932	0,931	0,931	0,917	131 6 5 17
	IB-1	147(92,5%)	0,925	0,203	0,928	0,925	0,926	0,861	130 7 5 17
CFS	Árbol J48	144(90,6%)	0,906	0,511	0,899	0,906	0,892	0,737	135 2 13 9
	IB-K	151(94,9%)	0,95	0,161	0,95	0,95	0,95	0,934	133 4 4 18
	IB-1	148(93,1%)	0,931	0,164	0,936	0,931	0,933	0,884	130 7 4 18

MDR a ITIAN									
FSS	Clasificadores	Instancias clasificadas correctamente	TP	TN	Precision	Cobertura	Medida de F	Área bajo la curva ROC	Matriz de confusión a b
InfoGainAttribute Eval	Árbol J48	158(80,6%)	0,806	0,197	0,81	0,806	0,805	0,84	71 25 13 87
	IB-K	163(83,2%)	0,832	0,166	0,836	0,832	0,831	0,9	85 11 22 78
	IB-1	164(83,7%)	0,837	0,161	0,842	0,837	0,836	0,838	86 10 22 78
GainRatioAttribute Eval	Árbol J48	158(80,6%)	0,806	0,197	0,81	0,806	0,805	0,84	71 25 13 87
	IB-K	163(83,2%)	0,832	0,166	0,836	0,832	0,831	0,9	85 11 22 78
	IB-1	164(83,7%)	0,837	0,161	0,842	0,837	0,836	0,838	86 10 22 78
CFS	Árbol J48	126(85,1%)	0,851	0,191	0,851	0,851	0,851	0,843	37 11 11 89
	IB-K	132(89,2%)	0,892	0,139	0,892	0,892	0,892	0,903	40 8 8 92
	IB-1	122(82,4%)	0,824	0,247	0,821	0,824	0,822	0,789	33 15 11 89

MDR a ITINAN									
FSS	Clasificadores	Instancias clasificadas correctamente	TP	TN	Precision	Cobertura	Medida de F	Área bajo la curva ROC	Matriz de confusión a b
InfoGainAttribute Eval	Árbol J48	148(79,6%)	0,796	0,279	0,821	0,796	0,783	0,738	42 34 4 106
	IB-K	162(87,1%)	0,871	0,138	0,871	0,871	0,871	0,934	64 12 12 98
	IB-1	161 (86,6%)	0,866	0,15	0,865	0,866	0,865	0,858	62 14 11 99
GainRatioAttribute Eval	Árbol J48	148(79,6%)	0,796	0,279	0,821	0,796	0,783	0,783	42 34 4 106
	IB-K	162(87,1%)	0,871	0,138	0,871	0,871	0,871	0,934	64 12 12 98
	IB-1	161 (86,6%)	0,866	0,15	0,865	0,866	0,865	0,858	62 14 11 99
CFS	Árbol J48	149(80,1%)	0,801	0,272	0,825	0,801	0,789	0,751	43 33 4 106
	IB-K	159(85,5%)	0,855	0,153	0,855	0,855	0,855	0,908	63 13 14 96
	IB-1	155(83,3%)	0,833	0,172	0,835	0,833	0,834	0,9831	62 14 17 93

MDR a IP									
FSS	Clasificadores	Instancias clasificadas correctamente	TP	TN	Precision	Cobertura	Medida de F	Área bajo la curva ROC	Matriz de confusión a b
InfoGainAttribute Eval	Árbol J48	166(77,9%)	0,779	0,258	0,777	0,779	0,777	0,841	56 27 20 110
	IB-K	183(85,9%)	0,859	0,177	0,859	0,859	0,857	0,906	63 20 10 120
	IB-1	197(92,5%)	0,925	0,092	0,925	0,925	0,925	0,917	73 10 6 123
GainRatioAttribute Eval	Árbol J48	166(77,9%)	0,779	0,258	0,777	0,779	0,777	0,841	56 27 20 110
	IB-K	183(85,9%)	0,859	0,177	0,859	0,859	0,857	0,906	60 23 10 120
	IB-1	197(92,5%)	0,925	0,092	0,925	0,925	0,925	0,917	73 10 6 124
CFS	Árbol J48	173(81,2%)	0,812	0,194	0,816	0,812	0,813	0,875	66 17 23 107
	IB-K	157(73,7%)	0,737	0,29	0,737	0,737	0,737	0,859	55 28 28 102
	IB-1	182(85,5%)	0,854	0,15	0,857	0,854	0,855	0,852	70 13 18 112

FSS, *feature subset selection techniques*; TAN, *tree-augmented Naive Bayesian Network*; IB, vecino más cercano (donde K = 3); TP, Tasa de verdaderos positivos; TN, Tasa de verdaderos negativos; ROC, Receiver Operating Characteristic; $F=2*Precisión*Cobertura/(Precisión+Cobertura)$; CFS, *Correlation Feature Selection*; d , distancia genética; d_n tasa de sustituciones nucleotídicas no sinónimas, d_s tasa de sustituciones nucleotídicas sinónimas; MDR, mutaciones de resistencia; ITIAN, inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos; ITINAN, inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos; IP inhibidor de la proteasa.

ANEXO III

PUBLICACIONES

PUBLICACIONES SURGIDAS DE ESTA TESIS (incluidas al final de este anexo)

Rojas Sánchez P, Cobos A, Navaro ML, Ramos JT, Pagán P and Holguín A. Impact of clinical parameters in the intra-host evolution of HIV-1 subtype B in pediatric patients. Manuscrito en preparación.

Rojas Sánchez P, Prieto L, Jiménez de Ory S, et al. (2016) Impact of exposure to lopinavir-ritonavir in HIV-1 infected children and adolescents in Madrid, Spain during 2000-2014. En revision en *Plos One*.

Rojas Sánchez P, Dominguez S, Jiménez de Ory S, et al. (2016) Trends in drug resistance prevalence, HIV-1 variants and clinical status in HIV-1- infected paediatric population in Madrid: 1993-2015 Analysis. Aceptado en *Pediatrics Infection Disease Journal*

Rojas Sánchez P, de Mulder M, Fernandez-Cooke E, et a. (2015) Clinical and virological follow-up in perinatally HIV-1infected children and adolescents in Madrid with triple-class antiretroviral drug resistant viruses. *Clin Microbiol Infect*; 21:605.e1-9.

Rojas Sánchez P and Holguín A (2014) Drug resistance in HIV-1 infected paediatric population worldwide: a systematic review. *J Antimicrob Chemother*; 69:2032-2042

OTRAS PUBLICACIONES

Pagán I, **Rojas Sánchez P**, Holguín A (2016) Antiretroviral treatment, age and CD4 affect HIV-1B evolutionary dynamics in children. Enviado a *Plos One*.

Clutter D, **Rojas Sánchez P**, Rhee SY and Shafer R (2016) Genetic Variability of HIV-1 for Drug Resistance Assay Development. *Viruses*; 8:48.

Fernandez-Cooke E, **Rojas Sánchez P**, Jimenez de Ory S, et al (2016) Description and consequences of prescribing off-label antiretrovirals in the Madrid Cohort of HIV-infected children over a quarter of a century (1988-2012). *Antivir Ther* ;21(1):65-70.

Prieto LM, González-Tomé MI, Muñoz et al. (2014) Madrid Cohort of HIV-Infected Mother-Infant Pairs. Birth defects in a cohort of infants born to HIV-infected women in Spain, 2000-2009. *BMC Infect Dis*; 24;14:700.