

**Deterioro cognitivo asociado al virus de
inmunodeficiencia humana e inhibidores
de proteasa potenciados con ritonavir en
monoterapia**



Doctorando

D. Ignacio Pérez Valero

Directores

Dr. José Ramón Arribas López
Prof. Francisco Arnalich Fernández

Madrid, 2016

TESIS DOCTORAL POR COMPENDIO DE PUBLICACIONES

**Deterioro cognitivo asociado al virus de
inmunodeficiencia humana (VIH) e inhibidores de
proteasa potenciados con ritonavir en monoterapia**

Doctorando:

D. Ignacio Pérez Valero

Directores:

Dr. José Ramón Arribas López
Profesor Asociado en Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

Prof. Francisco Arnalich Fernández
Catedrático en Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

Agradecimientos

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas que han dedicado parte de su tiempo y dedicación a la elaboración de esta tesis doctoral:

En primer lugar, mi más amplio agradecimiento a los doctores José Ramón Arribas López y Francisco Arnalich Fernández, directores de la presente memoria. Al Dr. Arnalich por sus siempre acertadas orientaciones y por su apoyo. Y al Dr. Arribas por haberme dado la oportunidad de formarme como investigador Rio Hortega. Por haberme permitido desarrollar el estudio PICASSO, fruto del que ha surgido la presente tesis doctoral. Por haber sido estricto pero justo. Por haberme transmitido tantos conocimientos sobre el VIH. Y sobre todo por haberme permitido crecer como médico, como investigador y como persona.

A las doctoras Miriam Estébanez Muñoz y Alicia González Baeza, estrechas colaboradoras de este trabajo, con las que he aprendido cuestiones técnicas muy importantes que se reflejan en esta memoria y sin las que esta investigación no hubiese sido posible.

También quisiera hacer patente mi agradecimiento al resto de colaboradores en este proyecto: Carmen Bayón, Juan González, Marisa Montes, Federico Pulido, Rafael Rubio, Eduardo López-Collazo y Jesús Mingorance, José Ignacio Bernardino, Natalia Fernández, Francisco Zamora y María Lagarde, Juan Miguel Castro, Mario Mayoral, Marta Gálvez, Raquel Martín y Blanca Arribas, por las valiosas aportaciones que hicieron para mejorar la presente investigación y por su amistad.

A los doctores Scott Letendre, Ronald Ellis, Robert Heaton y demás miembros del HNRP de la Universidad de California, San Diego quienes me han transmitido gran parte de los conocimientos sobre el deterioro neurocognitivo asociado al VIH que poseo en la actualidad. Hoy y siempre les deberé gratitud por el tiempo que pasé entre ellos.

A mi familia y amigos. Ellos son los pilares de mi vida, los que me han transmitido siempre la fuerza necesaria para continuar, los que nunca me han fallado, los que me han acompañado en los buenos y malos momentos. En cada ejemplo, en cada línea y en cada palabra podría indicar la influencia de su apoyo, de sus sugerencias y de su compañía. Sólo espero ser capaz de devolverles algún día lo mucho que me han ayudado.

En especial quiero expresar mi más profunda gratitud a Gema. Por compartir mi vida, por aguantarme en los buenos y en los malos momentos, por los 8 meses en San Diego, por haberme alentado en la consecución de mis objetivos y sobre todo por hacerme enormemente feliz cada nuevo día.

Por último, agradecer al proyecto PI10/00483 (Instituto de Salud Carlos III) por financiar el trabajo y servirme en todo momento de soporte económico.

A todos mi mayor reconocimiento y gratitud.

Ignacio Pérez Valero

ÍNDICE DEL CONTENIDO

A. TESIS COMO COMPENDIO DE TRABAJOS PREVIAMENTE PUBLICADOS.....	7
B. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	9
1. La infección por el virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1.....	9
2. La Infección por VIH del Sistema Nervioso Central.....	22
3. Expresividad Clínica de la Infección por VIH del Sistema Nervioso Central.....	28
4. Diagnóstico de los trastornos neurocognitivos asociados al VIH.....	29
5. El tratamiento antirretroviral en la infección por VIH del SNC.....	37
6. Seguridad neurocognitiva de la monoterapia con inhibidores de proteasa.....	42
7. Resumen de la introducción.....	44
C. COPIA DE LOS TRABAJOS PUBLICADOS.....	46
I. Protease inhibitor monotherapy and the CNS: peace of mind?.....	47
II. Neurocognitive Impairment in Patients Treated with Protease Inhibitor Monotherapy or Triple Drug Antirretroviral Therapy.....	56
III. Pattern of neurocognitive function in patients receiving boosted protease inhibitor monotherapy: a detailed neuropsychological Study.....	63
IV. A Comparative Study of Neurocognitively impaired Patients Receiving Protease Inhibitor Monotherapy or Triple-Drug Antirretroviral Therapy.....	72
V. A prospective Cohort Study of Neurocognitive Funcion in Aviremic HIV-Infected Patients Treated With 1 or 3 Antirretrovirals.....	77
D. RESUMEN.....	85
1. Objetivos de investigación.....	85

2. Aportaciones del doctorando.....	86
3. Metodología utilizada.....	88
3.1. Sujetos.....	88
3.2. Diseño del estudio.....	90
3.3. Desarrollo de los objetivos del estudio.....	91
3.4. Técnicas utilizadas.....	93
3.4.1. Técnica 1: Evaluación de la función neurocognitiva.....	94
3.4.2. Técnica 2: Determinación de biomarcadores en sangre.....	97
3.4.3. Técnica 3: Determinación de biomarcadores en LCR.....	99
3.4.4 Técnica 4. Determinación de la carga viral de VIH ultrasensible.....	101
3.5. Análisis estadísticos.....	102
4. Principales resultados.....	105
5. Conclusiones.....	114
6. Perspectivas.....	115
7. Bibliografía.....	121
E. APÉNDICES	133
APÉNDICE 1: Factor de impacto y Área temática de las revistas	133
APÉNDICE 2: Justificación de la contribución del doctorando.....	134
F. ABREVIATURAS.....	137

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Proceso de transcripción.....	16
Figura 2: Proceso de integración.....	17
Figura 3: Procesos de ensamblaje, liberación y maduración del virión del VIH.....	21
Figura 4: Procesos neurotóxicos relacionados con la infección por VIH del SNC.....	26
Figura 5: Ventana terapéutica de neuroprotección de los antirretrovirales.....	41
Figura 6: Flujo de pacientes del estudio.....	89
Figura 7: Esquema del estudio.....	90
Figura 8: Algoritmo para el cálculo del GRS.....	97

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Adaptación de la clasificación de Frascati para la graduación de comorbilidades cognitivas.....	32
Tabla 2: Tests neurocognitivos recomendados para la evaluación de los trastornos neurocognitivos asociados al VIH.....	33
Tabla 3: CPE Score versión 2010.....	38
Tabla 4: Neurotoxicidad de los distintos antirretrovirales sobre el SNC.....	39
Tabla 5: Criterios de selección de estudio PICASSO.....	88
Tabla 6: Batería neurocognitiva utilizada en el estudio PICASSO.....	94
Tabla 7: Tabla de conversión de los T-Score en <i>Deficit Score</i> y <i>Rating Score</i>	96

A. TESIS COMO COMPENDIO DE TRABAJOS PREVIAMENTE PUBLICADOS

La presente tesis doctoral, de acuerdo con el informe correspondiente, autorizado por los Directores de Tesis y el Órgano Responsable del Programa de Doctorado, se presenta como un compendio de cinco trabajos previamente publicados. Las referencias completas de los artículos que constituyen el cuerpo de la tesis son los siguientes:

- I. Pérez-Valero I, Bayon C, Cambron I, Gonzalez A, Arribas JR. *Protease inhibitor monotherapy and the CNS: peace of mind?* J Antimicrob Chemother. 2011;66(9):1954-62.
- II. Pérez-Valero I, González-Baeza A, Estébanez M, Montes-Ramírez ML, Bayón C, Pulido F, Bernardino JI, Zamora FX, Monge S, Gaya F, Lagarde M, Rubio R, Hernando A, Arnalich F, Arribas JR. *Neurocognitive impairment in patients treated with protease inhibitor monotherapy or triple drug antiretroviral therapy.* PLoS One 2013;8(7):e69493.
- III. González-Baeza A, Carvajal F, Bayón C, Pérez-Valero I, Estébanez M, Bernardino JI, Monge S, Lagarde M, Hernando A, Arnalich F, Arribas JR. *Pattern of neurocognitive function in patients receiving boosted protease inhibitor monotherapy: a detailed neuropsychological study.* J Neurovirol. 2014;20(4):362-70.
- IV. Estébanez M, Stella-Ascariz N, Mingorance J, Pérez-Valero I, González-Baeza A, Bayón C, Lakatos B, Borobia A, Arnalich F, Arribas JR. *A comparative study of neurocognitively impaired patients receiving protease inhibitor monotherapy or triple-drug antiretroviral therapy.* J Acquir Immune Defic Syndr 2014;67(4):419-23.

- V. Pérez-Valero I, González-Baeza A, Estébanez M, Monge S, Montes-Ramírez ML, Bayón C, Pulido F, Bernardino JI, Zamora FX, González-García JJ, Lagarde M, Hernando A, Arnalich F, Arribas JR. *A prospective cohort study of neurocognitive function in aviremic HIV-infected patients treated with 1 or 3 antiretrovirals*. Clin Infect Dis. 2014;59(11):1627-34.

B. INTRODUCCIÓN GENERAL

1. La infección por el virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1

El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH) [1] es un lentivirus perteneciente a la familia Retroviridae [2, 3]. El virión del VIH es esférico. Su diámetro oscila para las partículas maduras entre los 100-130 nm y para las inmaduras entre los 120-140 nm [4]. Está compuesto por una envuelta formada por una bicapa lipídica que posee 72 prolongaciones formadas por las glicoproteínas (gp) gp120 y gp41. Una matriz formada por proteínas p17. Una cápside, formada por proteínas p24. Y una nucleocápside icosaédrica, compuesta por las proteínas p6 y p7, en cuyo interior se alojan dos filamentos idénticos de ácido ribonucleico (ARN) de cadena simple; un par de iniciadores de ARN transferente (ARN^tLys); las enzimas virales proteasa (p10), integrasa (p31), ARNasa (p15) y transcriptasa inversa (p50); y varias proteínas reguladoras y accesorias [5].

El genoma del VIH se compone de tres regiones codificantes básicas, “*group-specific antigen gene*” (gag), “*DNA polymerase gene*” (pol) y “*envelope glycoprotein gene*” (env) y seis genes adicionales: “*Trans-activator of transcription gene*” (tat), “*regulator of virión gene*” (rev), “*viral protein unknown gene*” (vpu), “*virion infectivity factor gene*” (vif) y “*negative factor gene*” (nef) [6]. Los genes gag, pol y env codifican las proteínas que forman la estructura del VIH. Los genes gag y pol sintetizan la poliproteína precursora Gag-Pol que por acción de la proteasa viral se escinde en las poliproteínas “*group-specific antigen*” (Gag) (p55) y “*DNA polymerase*” (Pol). Durante la maduración del virión la proteína p55 es cortada por la proteasa viral en 4 fragmentos: La proteína de la cápside p24, la proteína de la matriz p17 y las proteínas p6 y p7 que forman la nucleocápside [7].

Además de funciones estructurales, algunas de las proteínas escindidas de p55 tiene otras funciones durante ciclo replicativo del VIH. La p17 facilita la integración del ácido desoxirribonucleico (ADN) viral en el núcleo celular. La p6 es

responsable de la incorporación de la proteína accesoria Vpr, codificada por el gen *vpr*, al virión en formación y de la interacción con la membrana de la célula huésped que hace posible la gemación. Por último, la p7 es responsable de la incorporación del ARN al virión en formación y es facilitadora de la transcripción inversa [8].

La poliproteína Pol, tras escindirse del precursor Gag-Pol, es dividida por acción de la proteasa viral en cuatro proteínas con actividad enzimática: La proteasa (p10), la transcriptasa inversa (p50), la ARNasa (p15) y la integrasa (p31) [9]. La proteasa es una aspartil-proteasa que actúa como un dímero y cuya función es separar las distintas proteínas del complejo Gag-Pol [10]. La transcriptasa inversa es un ADN-polimerasa dependiente tanto de ADN como de ARN. Es capaz de sintetizar una cadena complementaria de ADN viral a partir del ARN viral o de otra cadena de ADN viral, previamente transcrita a partir de ARN. [11]. La ARNasa es la enzima que libera el ARN del complejo transcriptasa inversa ADN viral de cadena simple para permitir que la transcriptasa inversa pueda producir una cadena complementaria de ADN viral y así poder formar una hebra de ADN viral de doble cadena (ADN proviral). Por último la integrasa es la enzima responsable de la inserción del ADN proviral en el genoma de la célula huésped.

La integración del ADN proviral en el ADN del huésped se realiza mediante tres procesos regulados por la integrasa [12]. Primero la actividad exonucleasa de la integrasa corta dos nucleótidos del extremo 3' de ambas cadenas del ADN proviral. Posteriormente, la integrasa ejerce una acción como endonucleasa, cortando el ADN del hospedador en un punto de integración variable, pero siempre en una región muy accesible de la cromatina, a fin de que el provirus se integre en una región con alta probabilidad de transcripción [13]. Finalmente la integrasa presenta una función de ligasa, soldando el ADN proviral al ADN celular. En la actualidad existen diversos fármacos antirretrovirales que bloquean la actividad de las enzimas virales proteasa, transcriptasa inversa e integrasa, cuya función es impedir que el virión de VIH pueda completar un ciclo completo de replicación.

La envuelta viral está compuesta por una bicapa lipídica procedente de la membrana plasmática de la célula del huésped en la que integran 72 complejos proteicos codificados a partir del gen env. Éste gen codifica la proteína de la envuelta viral (Env) gp160. Esta proteína gp160 se sintetiza en el retículo endoplásmico y emigra a través del complejo de Golgi, donde se glicosila con 25-30 cadenas de carbohidratos en los residuos de asparagina. Esta glicosilación es importante para dotar de capacidad infectiva al virus [14]. Gp160 es escindida por una proteasa humana de la célula huésped en gp41, proteína transmembrana que se integra en la bicapa lipídica, y gp120. Ambas proteínas se unen mediante un enlace no covalente. La proteína gp120 es responsable del acoplamiento del virión con el exterior de la célula hospedadora previamente a su invasión. En la actualidad se han desarrollado fármacos para inhibir la fusión del virión con la membrana celular humana que bloquean la acción de la proteína gp41.

Completan el virión del VIH una serie de proteínas denominadas reguladoras y accesorias. Las proteínas reguladoras “*Trans-Activator of Transcription*” (Tat) [15] y “*Regulator of Virion*” (Rev) tienen como función incrementar la transcripción del VIH y la expresión de las proteínas virales. Ambas proteínas son esenciales para que se complete el ciclo replicativo del VIH. Tat y Rev actúan en dos fases del ciclo viral: Tras la integración del ADN proviral y su posterior activación, se produce una transcripción inicial de fragmentos de RNA mensajero de 2KB, que se transportan al citoplasma, codificando Tat, Rev y “*Negative factor*” (Nef). En este momento Tat y Rev son de nuevo transportadas al núcleo.

En el núcleo, Tat (en su isoforma de 72 aminoácidos) se une entonces a una región en forma de bucle de 59 nucleótidos situada en el extremo 5' del ARN viral llamada “*transactivator active region*” (TAR), actuando como transactivador del ARN producido a partir del ADN proviral, promoviendo la elongación de la cadena de ARN [16]. Tat puede así mismo regular la expresión de un número considerable de genes celulares, incluyendo el gen del factor de necrosis tumoral (TNF) [17], el gen bcl-2 [18] o el gen MIP-1a [19]. Igualmente, existe otra isoforma de Tat de 101

aminoácidos que actúa en una fase tardía del ciclo de replicación del VIH, favoreciendo la transcripción de regiones del ADN proviral concretas

Gracias a la acción de Tat, se pueden transcribir las cadenas de RNA mensajero de 9KB y de 4KB que codifican (Gag-Pol, Env, Vpr, Vif y Vpu). La migración de estas cadenas de ARN del núcleo al citoplasma celular está regulada por la acción de Rev [20]. Rev es absolutamente necesaria para la replicación de VIH; así, los provirus que carecen de la función Rev son transcripcionalmente activos pero no expresan genes virales tardíos y, por tanto, no producen viriones.

Además de las proteínas reguladoras, el VIH posee 4 proteínas accesorias: Vif, Vpr, Vpu y Nef que no son esenciales para la producción de partículas infecciosas “in-vitro”, pero representan factores de virulencia críticos in vivo.

Vif es un polipéptido de 23 kDa y 193 aminoácidos esencial para la replicación viral en linfocitos periféricos, macrófagos y en algunas líneas celulares [21]. En otras muchas líneas celulares Vif no es imprescindible y por ello a estas líneas se las conoce como permisivas para VIH-mutantes de Vif. Vif altera la respuesta antiviral de la enzima humana “*apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G*” (APOBEC3G) al favorecer su ubiquitinización y posterior destrucción. En ausencia de Vif, APOBEC3G entra en los viriones durante la fase de “*budding*”, produciendo una hipermutación del genoma viral del virión recién formado. Esto conlleva que el virión es capaz de invadir las células pero incapaz de sintetizar eficazmente ADN proviral y de producir una infección viable [22].

La proteína Vpr es un polipéptido de 14 kDa y 96 aminoácidos que posee una señal de localización nuclear (NLS) que regula su principal función, la importación al núcleo celular del complejo pre-integración del VIH [23]. Igualmente, Vpr es imprescindible para que se produzca replicación viral en células que no están en mitosis como los macrófagos. Vpr es capaz de detener la proliferación celular en fase G2 del ciclo celular al activar a la proteína de supresión tumoral p53 mediante

la interacción con la “*Vpr binding protein*” (VprBP) [24]. Esto favorece el aumento de la replicación viral por activación del promotor retroviral (LTR).

El polipéptido Vpu es una fosfoproteína de 16KDa y 81 aminoácidos, específica del VIH y de algunas variantes del virus de inmunodeficiencia simiana (SIVcpz, SIVgsn y SIVmon). Vpu se inserta en las membranas del aparato de Golgi y en endosomas celulares [25] donde realiza dos funciones separadas, la modulación del cúmulo de diferenciación 4 (CD4) y el incremento de la liberación de viriones [26]: Vpu actúa como un adaptador que conecta las moléculas de CD4 intracelulares con el complejo ubiquitin ligasa E3, favoreciendo la degradación del CD4 en proteosomas celulares. Esto evita que el CD4 intracelular fije la proteína gp160 y la inutilice a nivel del retículo endoplásmico. Este proceso, favorece la expresión de gp120 en la superficie celular de la célula infectada [27]. Por otro, Vpu favorece el desprendimiento de los viriones de VIH y de otros virus de la membrana celular [28]. En ausencia de Vpu, pueden observarse un alto número de viriones agregados a la superficie de la célula infectada

Por último, la proteína Nef es una pequeña proteína miristilada de 27-35 kDa que se expresa en el citoplasma y parcialmente en la membrana celular. Nef es un factor de virulencia del VIH cuya función es manipular la respuesta del huésped contra el patógeno, favoreciendo la replicación del VIH y que podría jugar un papel relevante en la evolución a SIDA. En fases precoces de la infección, la expresión de Nef favorece la activación de los linfocitos T y por tanto la persistencia de la infección. Nef induce cambios en la expresión de proteínas en la superficie de la membrana celular de las células infectadas como los CD4 [29], en el remodelado del cito esqueleto y en la transducción. Estos cambios producen una disminución del umbral de activación de los linfocitos T CD4+ en reposo ante estímulos exógenos, a través de la interacción de estas células con los receptores de las células T (TCR) infectadas [30]. Nef también es capaz de estimular la infectividad de los viriones [31]. Las partículas de VIH producidas en presencia de Nef pueden ser 10 veces más infectivas que los viriones producidos en su ausencia.

La función de todas estas proteínas virales es facilitar la replicación del ARN viral y la formación de nuevos viriones con capacidad infectiva dentro de las células del hospedador que expresen CD4 en su superficie. El VIH invade esencialmente los linfocitos T que expresan el receptor de membrana CD4 en su superficie. Igualmente pueden infectar, generalmente de manera menos efectiva, células con baja densidad de moléculas CD4 en su superficie celular como los monocitos/macrófagos, las células de Langerhans o la microglía cerebral [32]. Por último, el VIH podría unirse también a otras líneas celulares mediante receptores alternativos al CD4 como por ejemplo el esfingolípidido galactósido ceramida [33].

La replicación del VIH se desarrolla en diversas etapas. La primera de ellas es el enlace o fijación del virus a la célula hospedadora. Este proceso comienza con la interacción inespecífica de las partículas gp120 y gp41 de la envuelta de los viriones circulantes con los proteoglicanos heparan-sulfato de las células circulantes [34] o mediante la unión a proteínas más específicas de Env como la $\alpha\beta 7$ integrina [35]. Estas interacciones permiten que Env se aproxime a un receptor CD4 y a un correceptor, el receptor de quimiocinas C-C tipo 5 (CCR5) o el receptor de quimiocinas C-X-C tipo 4 (CXCR4), favoreciendo la eficacia infectiva. El segundo escalón de la entrada es la unión entre una molécula gp120 del trímero Env y un receptor CD4 de la superficie celular [36]. La subunidad gp120 contiene 5 regiones relativamente estables (C1-C5) y cinco regiones variables (V1-V5). Estas regiones variables, con la excepción de V5, tienen una estructura en bucle formado por un enlace disulfuro en su base. Estos bucles se sitúan en la superficie de gp120 y juegan un papel crítico en la evasión inmune y la unión del correceptor, en particular el bucle V3 [37]. Cuando se produce la unión entre gp120 y CD4, se produce el reordenamiento de las regiones variables V1-V3 y la formación de una lámina puente de cuatro hebras beta formada por dos hojas separadas entre sí. Tanto la lámina puente como el reposicionamiento de V3 juegan un papel crucial en el anclaje al correceptor [38].

El tercer escalón de la entrada consiste en la unión al correceptor que desencadena la potencial fusión de Env con la membrana celular. Los viriones de

VIH se clasifican en función del correceptor al que pueden unirse en R5 si se unen al correceptor CCR5, X4 si se unen al correceptor CXCR4 y duales si se unen a ambos [39]. En la actualidad se han comercializado fármacos capaces de interferir con la unión a CCR5 pero no a CXCR4. Una vez unido al correceptor, la partícula viral se mueve utilizando la maquinaria celular del hospedador hasta el sitio donde se encuentra la maquinaria celular endocítica que permite la fusión con la membrana celular.

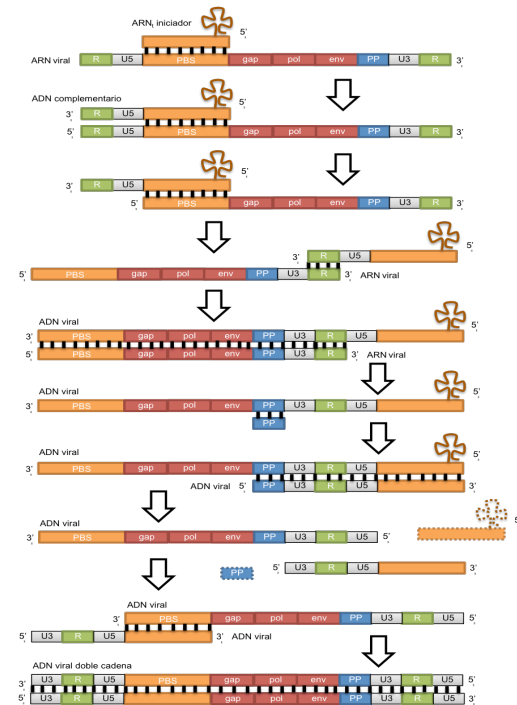
El último escalón de la entrada consiste en la fusión de membranas mediada por Env. Tras la unión al correceptor, se induce la exposición del péptido de fusión hidrofóbico gp41, el cual se inserta en la membrana de la célula hospedadora. Cada subunidad de gp41 forma un paquete de seis hélices (6HB) que permite la apertura y estabilización de un poro de fusión de la membrana celular que permite la posterior entrada de las partículas virales en el interior del citoplasma de la célula hospedadora [40]. Nuevos fármacos inhibidores de la fusión están actualmente en fase de desarrollo clínico.

Una vez que las dos cadenas de ARN y las demás partículas virales están en el citoplasma de la célula hospedadora, se produce la transcripción inversa del ARN viral en ADN. El ARN viral entra en el citoplasma como parte de un complejo núcleo- proteico no bien caracterizado. La síntesis del ADN viral depende de la actividad de dos enzimas, la retrotranscriptasa inversa, una DNA polimerasa que puede utilizar como modelo tanto ARN como ADN, y una nucleasa denominada ribonucleasa H.

La síntesis del ADN viral se inicia a través del extremo 3' de un ARN de transferencia específico celular parcialmente desenrollado que se hibrida en una parte complementaria del ARN viral (PBS). El proceso de transcripción avanza hasta que se alcanza el extremo 5' del ARN genómico viral, generándose un ADN complementario de unas 100-150 bases formado por las regiones U5 y R. A continuación la ribonucleasa H degrada las regiones U5 y R del ARN viral. Tras ello, el ADN complementario recién creado se une al extremo 3' del ARN viral a nivel de la región R complementaria.

Comienza entonces la síntesis del ADN a partir del ARN viral y la posterior degradación del ARN viral por parte de la ribonucleasa H. Una vez que la cadena de ADN se completa, la síntesis de la cadena complementaria de ADN se inicia desde una región del ARN viral resistente a la acción de la ribonucleasa H, el fragmento de polipurina, que se mantiene unido al ADN viral y permite la iniciación de la cadena de ADN complementaria en dirección contraria hasta conformar una doble cadena de ADN circular.

Figura 1. Proceso de transcripción



En la actualidad existen dos familias de fármacos capaces de inhibir la transcripción inversa del ARN viral en ADN, los inhibidores de la retrotranscriptasa inversa análogos de nucleósidos o de nucleótidos y los inhibidores de la retrotranscriptasa inversa no análogos de nucleósidos. Los primeros se unen en la zona catalítica de la enzima, con la cadena de ADN que se encuentra en formación interrumpiendo la formación de la misma. Los segundos se unen a una región no catalítica de la transcriptasa inversa, produciendo la inactivación de la misma.

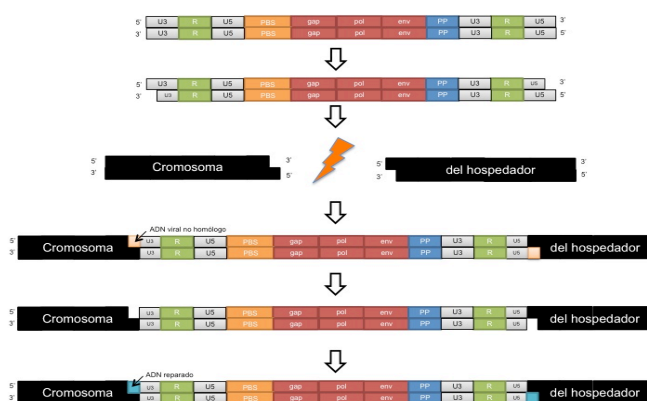
Tras la transcripción de la doble cadena de ADN viral se producen los mecanismos de traslación e integración. El primer paso del proceso ocurre en el citoplasma con la producción del complejo de preintegración, consistente en la unión de cada cadena de ADN circular con un dímero de integrasa; los cuales a su vez se unen a varias proteínas virales (nucleocápside, matriz, Vpr y transcriptasa inversa) y del hospedador. Posteriormente, la integrasa produce la escisión catalítica en el extremo 3' del ADN viral del dinucleótido GT, lo que genera un dinucleótido 5' saliente y un intermedio reactivo que contiene un grupo 3'-hidroxilo.

En un siguiente proceso, el complejo preintegración es transportado al núcleo a través de un poro nuclear. Una vez en el núcleo, la proteína humana lenticular factor de crecimiento derivado del epitelio/p75 (LEDGF/p75) sirve de puente entre el complejo preintegración y el ADN del hospedador, favoreciendo su unión. Una vez que el complejo preintegración está anclado al ADN del hospedador, la integrasa a través de una reacción catalítica permite que el extremo 3' del ADN viral se integre en el ADN del huésped de manera escalonada, con una diferencia entre hebras de 4-6 pares.

Esto produce que durante el proceso de transferencia se produzcan vacíos en los extremos del ADN recién unido que son reparados por los mecanismos de reparación del ADN celulares mediante las enzimas humanas polimerasa, nucleasa y ligasa [42].

En la actualidad los fármacos denominados inhibidores de la integrasa son capaces de inhibir el funcionamiento de la integrasa, impidiendo la formación del complejo preintegración y por tanto la integración del ADN viral dentro del genoma de la célula hospedadora.

Figura 2. Proceso de integración



Tras la integración del genoma viral dentro del ADN del hospedador, en la mayoría de las células infectadas se produce la transcripción del ADN viral en cadenas de ARN viral genómico y ARN viral mensajero que codificará las distintas proteínas virales que permitirán la creación de nuevos viriones potencialmente infectivos. El elemento del genoma viral que regula el proceso de transcripción es la LTR, que incluye cuatro elementos, la región activada por Tat, a la que en el contexto de un ARN naciente se une el transactivador Tat, el promotor, el potenciador y el

modulador negativo. A estos tres últimos elementos se puede unir una pléyade de factores transcripcionales que actuarán como activadores, represores y moduladores de la transcripción [43].

Una función de los factores de transcripción es reclutar complejos que influyeran en la organización de la cromatina. Para que se produzca la transcripción es necesario que se produzca el reclutamiento de acetil-transferasas de histonas que permitan la acetilación de las histonas próximas al LTR y desplazamiento del nucleosoma 1. Estas modificaciones de la cromatina permiten la unión de factores transcripcionales, iniciadores y la unión de la polimerasa II (RNAP II) al ADN viral que favorecen la transcripción [44].

Tras el inicio de la transcripción se produce la elongación. Para que este proceso ocurra, los factores transcripcionales reclutan otros factores como la propia RNAP II, la proteína de unión a TATA (TBP) y los factores asociados a TBP que se aseguran de ensamblar el promotor y del posicionamiento de RNAP II en el sitio transcripcional. Se sabe que la presencia de Tat favorece el reclutamiento de TBP y de sus factores asociados y por tanto regula los complejos transcripcionales tempranos [45]. Tat es responsable de la unión del promotor de la transcripción P-TEFb, responsable de la elongación transcripcional, al LTR viral [46]. Este proceso se encuentra contra regulado por el factor NELF, cuya misión cuando se une al LTR es pausar la acción de la RNAP II y la elongación de la cadena de ARN. De forma adicional, NELF también produce la acetilación de histonas y el desplazamiento de los nucleosomas [47].

Aunque en la mayoría de las células infectadas por VIH los factores promotores de la transcripción son efectivos produciendo el ADN mensajero y genómico necesario para la progresión de la infección, en algunos casos se produce la represión de la transcripción, lo que conduce al establecimiento de un estado de latencia post-integración, en los cuales el provirus no es capaz de expresar su genoma de forma efectiva, siendo silenciado dentro del genoma del hospedador tras la integración. La latencia post-integración es un fenómeno multifactorial, que en la mayoría de casos se debe a fenómenos de represión transcripcional [48].

La latencia post-integración se demuestra por el rebrote de la replicación viral tras la supresión de un tratamiento antirretroviral efectivo [49]. Suele producirse en células T memoria quiescentes, macrófagos tisulares y potencialmente en células pluripotentes hematopoyéticas [50]. Diversos son los factores que se han relacionado con el silenciamiento transcripcional: 1) mutaciones o presencia de una concentración subóptima del transactivador Tat [51]; 2) Ausencia de factores celulares transcripcionales [52]; 3) integración del provirus en sitios transcripcionalmente silentes [53]; o 4) supresión de los micro-ARN virales [54]. En la actualidad existen fármacos en fase de investigación, denominados inhibidores de la transcripción, capaces favorecer estos fenómenos de silencio transcripcional y por tanto capaces de bloquear la transcripción del VIH.

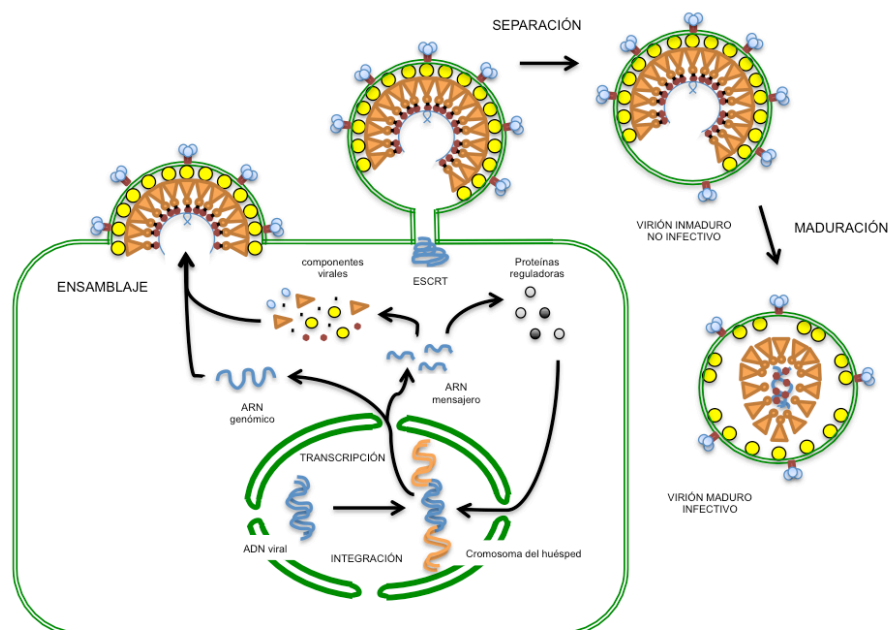
Una vez que el VIH ha conseguido transcribir el número suficiente de moléculas de ARN mensajero u genómico como para producir nuevos viriones, estos fragmentos migran del núcleo al citoplasma celular, donde los fragmentos de ARN mensajero codificarán las distintas proteínas virales. Una vez producidas estas proteínas virales, ocurre el proceso de ensamblaje del virión. Este proceso ocurre en unos dominios de la membrana plasmática especializados. La poliproteína Gag será la responsable de mediar en todos los eventos del proceso, incluyendo la unión a la membrana plasmática, las interacciones proteína-proteína necesarias para crear partículas esféricas, la concentración de la proteína Env y el empaquetado del ARN viral.

De una forma esquemática las funciones que realiza Gag son: 1) A través de su dominio MA es capaz de unir la membrana plasmática y de reclutar proteínas virales Env [55]; 2) A través de su dominio CA, favorece la interacción entre proteínas necesaria para el ensamblaje del virión inmaduro y la producción de la cápside; 3) A través de su dominio NC, Gag es capaz de capturar dos copias del genoma viral durante el ensamblaje; 4) Por último, a nivel de la región p6 de Gag se produce la unión de otras proteínas virales como Vpr [56].

Para que Gag pueda unirse a la membrana plasmática celular, ésta debe ser enriquecida previamente por moléculas de colesterol y diversos fosfolípidos, los cuales juegan un papel fundamental sirviendo de puentes de anclaje entre la membrana y las moléculas de Gag [57]. Una vez que Gag se une a la membrana celular, se dispone en forma de partículas esféricas inmaduras que deben sufrir un proceso de maduración para que el virión adquiera su capacidad infectiva.

La maduración viral ocurre al mismo tiempo que el ensamblaje y es consecuencia de la activación de la proteasa viral y de su acción proteolítica sobre 10 sitios a nivel de las poliproteínas Gag y Gag-Pro-Pol. El fenómeno de maduración permite el procesamiento de las enzimas virales (proteasa, integrasa y retrotranscriptasa) así como de las proteínas virales de la matriz, la cápsula, la nucleocápside, las proteínas p6 y los péptidos SP1 y SP2 [58]. En la actualidad existen diversos fármacos capaces de inhibir la acción de la proteasa viral, interfiriendo la maduración de los viriones y por tanto reduciendo drásticamente su capacidad infectiva [59].

Aunque Gag es el factor responsable de empaquetamiento y ensamblaje del virión, serán los “complejos cortos endosómicos necesarios para el transporte” (ESCRT) del huésped los que terminen la polimerización de Gag y permitan la liberación catalítica del virión de la célula. En resumen, las regiones p6 de Gag se unen directamente al dominio UEV de la subunidad TSG101 del complejo ESCRT-1 y al dominio V de la proteína accesoria humana ALIX [60]. Esta interacción permite el reclutamiento de las proteínas ESCRT-III que se polimeriza adquiriendo una forma de cúpula que permite la aproximación de los extremos de la membrana del virión [61]. La fusión de estos extremos es llevada a cabo por las ATPasas VPS4 que usan la energía del ATP para liberar ESCRT-II de la membrana y devolverlo al citoplasma.

Figura 3. Procesos de ensamblaje, liberación y maduración del virión del VIH

El ser sistema inmune innato del huésped ha desarrollado al menos dos vías que impiden la gemación y la liberación del virión. Por un lado la proteína antiviral terina bloquea el proceso de gemación de las partículas virales en la superficie celular. El VIH posee una proteína, Vpu, capaz de antagonizar la acción de la terina e de impedir la inhibición de la gemación de las partículas virales [62]. Por otro lado, la proteína ISG-15 inhibe la liberación del virión al unirse a ESCRT-III e inhibir su acción ATPasa [63].

Una vez liberados los nuevos viriones la infección de nuevas células puede ocurrir a través de dos mecanismos: 1) infección mediada por viriones liberados al medio extracelular; o 2) infección mediada por una interacción célula-célula. En ambos casos los procesos de ensamblaje, gemación y liberación de los viriones son los mismos.

Actualmente se cree que la interacción célula-célula es la principal vía de diseminación del VIH in vivo, especialmente a nivel del tejido linfóide. Las vesículas virales se acumulan en regiones celulares denominadas sinapsis virales en las que se produce el contacto de la célula infectada con otras células no

infectadas [64]. Estas interacciones se han visto no solo entre linfocitos T CD4+, sino también entre los linfocitos T CD4+, los macrófagos y las células dendríticas. La formación de las sinapsis virales es dependiente de la presencia de proteínas Env en la célula infectada y de receptores virales en la célula objetivo. Igualmente la formación de sinapsis virales requiere que se encuentren intactos los mecanismos de formación de microtúbulos, la actina del citoesqueleto y de la presencia de moléculas estabilizadoras de la adhesión celular como ICAM-1 y LFA-1 [65].

2. La Infección por VIH del Sistema Nervioso Central

Tras la infección por VIH, el virus se disemina rápidamente por la mayoría de órganos del hospedador, incluido el Sistema Nervioso Central (SNC). La infección por VIH del SNC suele producirse durante la primo-infección en la mayoría de pacientes, como demuestra el trabajo realizado por *Valcour* y colaboradores en 19 individuos recién infectados por VIH. En este estudio 13 de 16 pacientes presentaban una carga viral de VIH detectable en el líquido cefalorraquídeo (LCR) a los 5 días del contagio [66].

A pesar de su precocidad, la infección por VIH del SNC es menos efectiva que la observada en otros órganos. Esto se debe a la existencia de una barrera hemato-encefálica (BHE) que limita la entrada de los viriones de VIH desde el plasma hacia el SNC [67]. La forma en la que el VIH atraviesa la BHE no está del todo aclarada. La hipótesis más aceptada postula que el VIH atraviesa la BHE alojado en el interior de linfocitos CD4 infectados. Estos, sufren el proceso de piroptosis en el compartimento cerebral, lo que favorece la liberación de viriones infectivos en el espacio perivascular del SNC [68].

Otra teoría menos aceptada sugiere que el VIH podría atravesar la BHE infectando las células endoteliales que la componen [69]. Por último, el VIH podría penetrar la BHE a través de los espacios intercelulares [70]. Con independencia de su forma

de entrada, el VIH es capaz de perpetuar la infección del SNC infectando células del compartimento cerebral que expresen receptores CD4 y los correceptores CCR5 y CXCR4.

Las principales dianas celulares del VIH tras la infección son los macrófagos perivasculares y la microglia. Ambos tipos celulares expresan receptores CD4 en su superficie, pero en mucha menor cuantía que los linfocitos CD4. Es por ello que, en condiciones normales, la capacidad infectiva del VIH en macrófagos y microglia sea muy baja, lo que permite limitar la infección del SNC a los espacios perivasculares, principalmente a nivel de las estructuras subcorticales, quedando el tejido cerebral intacto [67]. Sin embargo, a medida que la infección avanza y aparece la depleción de linfocitos CD4, comienzan a seleccionarse cepas virales con una mayor capacidad de infectar células que expresen niveles bajos de CD4 en su superficie. Tras la selección de estas cepas neurotropas, la infección del SNC deja de estar conferida en los espacios perivasculares, se extiende por todo el parénquima cerebral, produciéndose entonces una encefalitis VIH que puede conducir al fallecimiento del individuo [71].

Las principales manifestaciones anátomo-patológicas observadas en muestras necrópsicas de pacientes con encefalitis VIH comprenden la infiltración del parénquima cerebral por macrófagos, la formación de nódulos microgliales, la presencia de células multinucleadas gigantes en la sustancia blanca y en la sustancia gris profunda, la pérdida neuronal particularmente en el hipocampo, ganglios basales y núcleo caudado y las alteraciones en de la mielina de la sustancia blanca [72].

Un aspecto que sorprende de la encefalitis VIH es la practica ausencia de neuronas infectadas por VIH observadas incluso en pacientes con un extenso daño cerebral. Tanto es así que se duda de que el VIH tenga capacidad infectiva sobre las neuronas adultas. No obstante, se han encontrado la presencia de DNA proviral y proteínas virales en células neuronales [73], por lo que es posible que la

incapacidad de los patólogos para ver neuronas infectadas por VIH in vivo se deba a una rápida destrucción de este tipo celular cuando es infectado por el VIH [67].

Sea o no posible la infección de las neuronas adultas por el VIH, ésta por si misma no puede explicar las alteraciones anatómo-patológicas observadas en los pacientes con encefalitis VIH. Por tanto deben existir mecanismos patogénicos adicionales como la infección de los astrocitos. El VIH puede infectar a los astrocitos, pero mientras que la infección de la microglía o de los macrófagos es infectiva, la infección de los astrocitos es restrictiva.

El VIH es capaz de infectar el astrocito pero no es capaz de completar su ciclo reproductivo dentro de él. Se piensa que esto se debe a que el astrocito es capaz de bloquear la entrada de Rev en el núcleo celular [74]. Los astrocitos infectados, ven afectada su función de soporte neuronal al liberar citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) o la Interleuquina-1 beta (IL-1 β) y partículas virales como la Gp120, Tat y Vpr [75].

Tanto la Gp120 como Tat producen toxicidad neuronal directa cuando son liberadas en el tejido cerebral. Ambas interaccionan con los receptores neurales que regulan la homeostasis del calcio intraneuronal, lo que induce la apoptosis neuronal mediada por caspasa-8 [76-77] y la producción de radicales libres que lesionan a la neurona [78]. Gp120 también es capaz de estimular los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), lo que en presencia de proteína tumoral p53 (p53) induce la apoptosis neuronal [79].

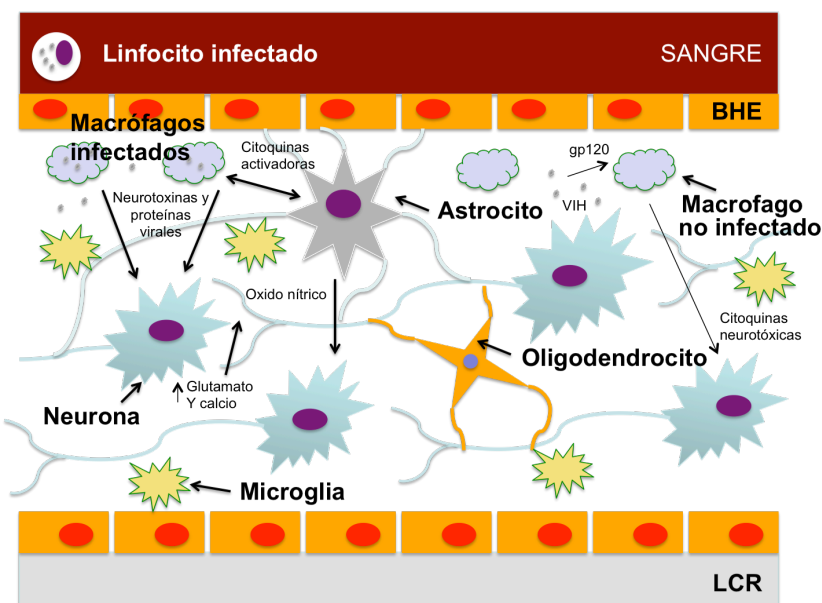
Respecto a Vpr, esta proteína es capaz de alterar el ciclo celular, lo que puede conducir a la muerte neuronal [80]. Igualmente se ha observado la implicación de Vpr en procesos relacionados con la regulación de la apoptosis neuronal. Vpr al igual que Tat es capaz de activar la caspasa-8 tanto en precursores neuronales como en neuronas maduras, induciendo su apoptosis [81] y de inactivar a la molécula anti-apoptótica mitocondrial proteína X-1 asociada al HCLS1 (HAX-1) [82].

Todas las células cerebrales expresan receptores de quimiocinas de la familia C-X-C (CXCR). De forma habitual, las neuronas y la glía expresan receptores de quimiocinas C-C tipo 2 (CCR2), tipo 3 (CCR3) y CXCR4, mientras que los receptores CCR5 suelen expresarse en los macrófagos perivasculares y la microglia [83]. Tanto Gp120, como Tat y Vpr bloquean los receptores CXCR, entorpeciendo la señalización de las citoquinas que inhiben el proceso de apoptosis neuronal. Para evitar este fenómeno, las neuronas reaccionan sobre-expresando receptores CXCR, concretamente CCR1, CCR3, CXCR4 y CCR5 (no expresado normalmente en condiciones no patológicas) [58]. Se cree que la expresión de CCR5 en estas condiciones puede inducir la infección neuronal por VIH, lo que favorecería la expansión de la encefalitis VIH.

Gp120, Tat y Vpr son capaces de activar los receptores CCR5 de los macrófagos perivasculares y la microglía, lo que favorece la liberación de moléculas inflamatorias como TNF- α , interleuquina-1 (IL-1) o interleuquina-8 (IL-8), la hiperactivación neuronal inducida por inhibición de la recaptación de glutamato por los astrocitos y la activación de procesos de neuro-fagocitosis [78]. Igualmente Tat aumenta la liberación de moléculas de adhesión como la proteína-1 quimio-atrayente de monocitos (MCP-1) que favorecen el reclutamiento de nuevas células inmunes proinflamatorias desde el torrente sanguíneo [84].

Por último, se ha observado un aumento de las quimioquinas que interactúan con los receptores CXCR en LCR (MCP-1/quimioquina C-C ligando tipo 2 (CCL2), proteína inflamatoria macrófaga-1 alfa (MIP-1 α)/ quimioquina C-C tipo 3 (CCL3), proteína inflamatoria macrófaga-1 beta (MIP-1 β)/ quimioquina C-C tipo 4 (CCL4), RANTES/ quimioquina C-C tipo 5 (CCL5), IL-8/ quimioquina C-X-C ligando tipo 8 (CXCL8) y fractalquina/quimioquina C-X3-C ligando tipo 1 (CX3CL1) en respuesta a la liberación de Gp120, Tat y Vpr. Probablemente en un primer momento este fenómeno juegue un papel de neuroprotección, pero a la larga puede contribuir al aumento de la neurotoxicidad.

Figura 4. Procesos neurotóxicos relacionados con la infección por VIH del SNC



Al igual que ocurre de forma sistémica, la historia natural de la infección VIH del SNC se ve modificada por el uso del tratamiento antirretroviral. El control de la replicación viral en el SNC evita la infección de nuevas células, disminuye la liberación de proteínas virales neurotóxicas y disminuye la activación inmune y sus efectos deletéreos sobre la homeostasis neuronal. El tratamiento antirretroviral es por tanto eficaz previniendo o revirtiendo la encefalitis por VIH. Sin embargo, el tratamiento antirretroviral no es capaz de prevenir todos los efectos deletéreos producidos por el VIH en el SNC.

En primer lugar, en pacientes que han desarrollado una encefalitis VIH, van a existir ya lesiones neuronales que van a ser irreversibles a pesar de que se consiga el control de la infección. En segundo lugar, la presencia de astrocitos infectados defectivamente va a favorecer la liberación de proteínas virales neurotóxicas (Tat y gp120) [75]. En tercer lugar, la presencia de células crónicamente infectadas en estado de latencia va a desencadenar el mantenimiento de estados de inmunoadactivación que van a favorecer un aumento

de liberación de moléculas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , ácido araquidónico, factores activadores de las plaquetas (PAF) u óxido nítrico) dentro del SNC [85].

Como respuesta al aumento del stress oxidativo, la neurona se protege aumentando la producción antioxidantes como la proteína antioxidante precursora del amiloide (APP) [86-87]. A pesar del papel neuroprotector del APP, la presencia de niveles elevados de TNF- α e IL-1 β favorece su degradación en moléculas de beta-amiloide neurotóxicas como la 1-42, relacionada con la enfermedad de Alzheimer [88]. La neurona se protege frente a estas formas de beta-amiloide degradándolas y secretándolas al medio extracelular. Cuando la degradación se ve inhibida por moléculas de Tat liberadas por los astrocitos infectados [89] o cuando la respuesta frente a la inflamación supera los mecanismos de eliminación de beta-amiloide, se produce el depósito intraneuronal de beta-amiloide que conduce a la disfunción e incluso a la muerte neuronal.

Otro aspecto que puede favorecer el desarrollo de alteraciones neuro-psiquiátricas asociada al VIH en pacientes infectados por VIH que reciben tratamiento antirretroviral efectivo es el envejecimiento. Ambos factores se relacionan con una reducción de la complejidad sináptico-dendrítica y con disfunción a nivel los circuitos prefronto-estriato-tálamo-corticales y de las redes temporolímbicas. Por esa razón algunos autores han sugerido que ambos factores podrían tener un factor sinérgico, mientras otros rechazan esta posibilidad [90-91].

Por último, diversos autores han sugerido que algunos tratamientos antirretrovirales podrían favorecer la aparición de alteraciones neuro-psiquiátricas asociada al VIH en pacientes suprimidos en plasma. Por un lado se ha sugerido que algunos tratamientos antirretrovirales no tendrían la suficiente penetración a través de la BHE como para suprimir completamente la replicación del VIH en el tejido cerebral. Y por otro, es posible que algunos fármacos antirretrovirales puedan resultar neurotóxicos a nivel del SNC. Abordaremos con más detalle este aspecto en el punto 5 de esta introducción.

3. Expresividad Clínica de la Infección por VIH del Sistema Nervioso Central

Como se ha descrito en el capítulo previo, la infección por VIH del SNC desencadena una serie de procesos neurotóxicos, directos o mediados por la activación del sistema inmunitario, capaces de alterar el normal funcionamiento de las estructuras cerebrales. La expresividad clínica de estas alteraciones es variable y depende de diversos factores: la neurovirulencia de los clones virales y el grado de inmunodepresión del huésped, el tiempo de exposición al VIH o la presencia de otras comorbilidades neuropsiquiátricas [92].

Mientras el VIH está confinado en los espacios perivasculares de las regiones subcorticales, los pacientes suelen mantenerse asintomáticos o paucisintomáticos. En este estadio las alteraciones más comúnmente identificadas afectan a los dominios cognitivos, redes neurales responsables de planificar, realizar y controlar funciones cognitivas específicas [93]. De éstos se considera que el VIH es capaz de interferir en la función de 8 de ellos: la velocidad de procesamiento de la información, el dominio verbal, el aprendizaje, la memoria de recuerdo, la atención, la memoria de trabajo, la ejecución de tareas y la función psicomotriz.

A medida que la infección progresa, comienzan a aparecer alteraciones neurocognitivas cada vez más severas, alteraciones motoras y alteraciones psiquiátricas graves [92, 94]. Una vez que la encefalitis VIH se instaura, el paciente desarrolla una forma de demencia subcortical, el complejo demencia-síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), que cursa con bradiquinesia, bradifrenia, alteraciones en la función ejecutiva y déficits en la memoria de procesamiento y de recuerdo [92, 95].

Sin tratamiento específico el complejo demencia-SIDA progresa hacia un deterioro cada vez mayor que termina condicionando la muerte del individuo. Con tratamiento antirretroviral, el complejo demencia-SIDA es potencialmente reversible tras la resolución del cuadro de encefalitis VIH. A pesar de ésta

potencial reversibilidad, la mayoría de pacientes que presentaron el complejo demencia-SIDA mantienen alteraciones neurocognitivas, cuya severidad dependerá, como hemos explicado en el capítulo previo, de múltiples factores como el grado de inflamación residual, el porcentaje de astrocitos crónicamente infectados o la efectividad y neurotoxicidad del tratamiento antirretroviral en el SNC.

Las manifestaciones clínicas producidas por la acción del VIH sobre el SNC no son las únicas manifestaciones neurocognitivas o psiquiátricas que pueden presentarse en los individuos infectados por VIH. Con frecuencia los pacientes VIH presentan síntomas ansiosos y depresivos, así como otros trastornos psiquiátricos [96]. Igualmente los pacientes infectados por VIH pueden presentar comorbilidades con impacto neurocognitivo como la infección por el virus de la hepatitis C [97], los traumatismos cerebrales, la enfermedad cerebrovascular, las infecciones oportunistas del SNC o el consumo de drogas recreacionales [98]. La presencia de estas comorbilidades hace que en muchos casos sea difícil distinguir si un síntoma neurocognitivo o psiquiátrico es consecuencia de la infección por VIH o de alguna de estas comorbilidades.

Con independencia de que su causa etiológica, la presencia de alteraciones neurocognitivas o psiquiátricas en pacientes infectados por VIH es muy prevalente. Se estima que la mitad de las personas infectadas por VIH manifestarán algún tipo de trastorno psicopatológico a lo largo de su vida [99]. Que las personas seropositivas refieren mayores niveles de ansiedad y depresión que la población general [100]. Y que la prevalencia de alteraciones neurocognitivas en la población seropositiva, esta es igualmente elevada (18-75%) [92, 95, 101,102].

4. Diagnóstico de los trastornos neurocognitivos asociados al VIH

El diagnóstico del trastorno neurocognitivo-psiquiátrico asociado al VIH es un diagnóstico de exclusión que se establece mediante la demostración de

alteraciones propias de ésta entidad y el despistaje de otras comorbilidades asociadas con similar expresión clínica. La primera guía para el diagnóstico del deterioro neurocognitivo asociado al VIH fue publicada en 1991 por la “*AIDS Task Force*” de la “*American Academy of Neurology (AAN)*” e incluía dos entidades nosológicas. La demencia asociada al VIH o HAD y los trastornos cognitivos y motores menores cuyas siglas en inglés son MCMD [103]. Ya en esta clasificación se excluyeron las alteraciones psiquiátricas, debido a la dificultad de esclarecer el papel etiológico del VIH sobre las mismas.

En 2007, tras el desarrollo del tratamiento antirretroviral de alta actividad (TARGA), con el objeto de adaptar la clasificación de 1991 a los cambios en la expresividad clínica de las alteraciones neurocognitivas asociadas al VIH, el “*National Institute of Mental Health*” y el “*National Institute of Neurological Diseases and Stroke*” encargaron a un grupo de expertos una revisión crítica de la literatura que permitiese la actualización de los criterios diagnósticos de 1991 [93]. De esta reunión salió una nueva clasificación cuyas novedades fueron la inclusión de las alteraciones neurocognitivas subclínicas en el diagnóstico, la exclusión de las alteraciones motoras del mismo y el requerimiento de excluir otras comorbilidades neurocognitivas antes de establecer el diagnóstico de trastorno neurocognitivo asociado al VIH o HAND, acrónimo inglés por el que se suele conocer a esta entidad y que utilizaremos en adelante para referirnos a ella.

Esta clasificación de 2007 tiene defensores y detractores y posiblemente sea modificada en el futuro próximo. El aspecto más controvertido de la misma fue la inclusión de las alteraciones neurocognitivas asintomáticas. Mientras para algunos grupos estas alteraciones no son más que artificios de las pruebas neurocognitivas, para otros son la misma entidad clínica [104] que presenta o no expresividad clínica dependiendo de las demandas cognitivas del individuo y de la forma de evaluar estas demandas cognitivas [105]. Un aspecto importante respecto que refuerza a la clasificación de 2007 frente a la de 1991 es que demostró una mayor concordancia frente al patrón de referencia histopatológico, la

encefalitis por VIH. La clasificación de 2007 mejoró la sensibilidad del 56% al 67%, la especificidad del 83% al 92% y el valor predictivo positivo del 88% al 95% [106].

Como se ha comentado uno de los aspectos novedosos del consenso de 2007 fue la inclusión de las comorbilidades como criterio de exclusión. Se las clasificó en tres categorías: comorbilidades incidentales, comorbilidades que pueden contribuir al deterioro y comorbilidades confusoras en el deterioro. Se estableció la posibilidad de diagnosticar HAND en ausencia de comorbilidades confusoras. En la tabla 1 se reportan las principales comorbilidades identificadas en el consenso de Frascati y su gradación como incidentales, contribuyentes o confusoras [93].

La evaluación de las comorbilidades neurocognitivas en el diagnóstico del HAND tiene que ser realizada por un clínico experto y requiere diversas pruebas complementarias como una exploración física completa, una revisión de la historia clínica y de los antecedentes personales del paciente, un análisis de sangre que incluya hormonas tiroideas y vitamina B12, una resonancia magnética cerebral convencional y una punción lumbar con cuantificación de VIH en LCR, con el fin de excluir la presencia de otras entidades patológicas.

En la actualidad existen otras pruebas diagnósticas en fase de evaluación para el despistaje de las comorbilidades neurocognitivas asociadas al VIH. Entre ellas destacan los biomarcadores en LCR y la resonancia magnética cerebral de alta resolución. Ninguna de ellas ha demostrado la suficiente rentabilidad diagnóstica como para ser recomendada en el diagnóstico habitual del HAND.

La base del diagnóstico del HAND de acuerdo con los criterios de 2007 consiste en la evaluación de la función neurocognitiva del individuo mediante una serie de test neuropsicológicos específicos que evalúan las áreas más comúnmente afectadas por el VIH: Funciones verbal/lenguaje; atención/memoria de trabajo; abstracción/función ejecutiva; memoria (de aprendizaje, de recuerdo); velocidad de procesamiento de la información; funciones sensoriales/perceptivas; y funciones motoras.

Se considera que para que una evaluación neurocognitiva sea adecuada, cada función cognitiva debe ser evaluada por un neuropsicólogo experto, mediante el uso de al menos dos tests neurocognitivos por cada función cognitiva evaluada y utilizando baremos de corrección para cada test adecuados. Es decir, normalizados en la población del individuo en función de las variables demográficas del mismo. Otro aspecto importante cuando un paciente ha sido sometido a varias evaluaciones neurocognitivas es ajustar los resultados de su evaluación neurocognitiva por el efecto de la práctica [107].

Tabla 1. Adaptación de la clasificación de Frascati para la graduación de comorbilidades cognitivas.

Comorbilidad	HAND		No HAND
	Incidental	Contribuyente	Confusora
Depresión	Depresión sin síntomas psicóticos ni falta de motivación	Depresión mayor con síntomas psicóticos +/- falta de motivación reversible	Depresión mayor con síntomas psicóticos +/- falta de motivación persistente
Daño cerebral	Leve traumatismo craneoencefálico sin aparente declinar cognitivo secundario	Leve/severo traumatismo craneoencefálico con secuencia funcional leve	Leve/severo traumatismo craneoencefálico con secuela funcional grave
Problemas académicos/ cognitivos	Problema educativo aislado (sin pérdida de cursos) sin afectación funcional	Problema educativo/cognitivo leve-moderado (≤ 1 curso perdido) sin afectación funcional	Retraso mental y/o alteración educativa severa con afectación funcional posterior
Uso de alcohol o sustancias de abuso	Uso previo de sustancias sin abuso ni dependencia (últimos 6 meses) y sin afectación funcional significativa	Uso previo de sustancias sin criterios (DSM-IV) de abuso o dependencia (últimos 30 días) O actual con un cambio cognitivo evidente sin cambio en el hábito de consumo	Uso actual de sustancias con un impacto significativo en el funcionamiento O evidencia de intoxicación o abstinencia
Enfermedad oportunista SNC	Historia de LOE cerebral sin afectación cognitiva secundaria	Historia de LOE cerebral con afectación cognitiva leve + empeoramiento posterior	LOE cerebral activa
Enfermedad neurológica no asociada al VIH	ACVA sin afectación cognitiva secundaria al evento	ACVA con afectación cognitiva leve + empeoramiento posterior	Otras enfermedades neurológicas activas no relacionadas con el VIH
Enfermedad sistémica	Enfermedad sistémica crónica sin aparentes secuelas cognitivas	Enfermedad sistémica crónica con afectación cognitiva leve + empeoramiento posterior	Malnutrición déficits de B12 o B1, síndrome constitucional. Enfermedades oportunistas activas sistémicas.
Hepatitis C	Hepatitis C curada sin fallo hepático.	Hepatitis C activa sin cirrosis descompensada.	Cirrosis descompensada

En la tabla 2 exponemos los tests neurocognitivos recomendados por el consenso de Frascati para la evaluación de la función cognitiva en individuos infectados por el VIH:

Tabla 2. Tests neurocognitivos recomendados para la evaluación de los trastornos neurocognitivos asociados al VIH.

Fluidez verbal	Funciones ejecutivas	Velocidad de procesamiento de la información	Atención/ memoria de trabajo	Aprendizaje verbal y visual	Visual	Memoria verbal y visual	Habilidades motoras
Controlled Oral Word Association Test (FAS)	Stroop Color and Word Test	WAIS-III Digit Symbol Subtest	WAIS-III Digit Span Subtest	California Verbal Learning Test (Original and Revised; Total Learning)	WMS-III Visual Reproduction-I	Resultados demorados de los 11 tests de memoria y aprendizaje de las dos columnas anteriores	Grooved Pegboard Test
Thurstone Word Fluency Test	Trailmaking Test – Part B	WAIS-III Symbol Search Subtest	WAIS-III Letter-Number Sequencing Subtest	Rey Auditory Verbal Learning Test (Total Learning)	WMS-III Family Pictures-I		Purdue Pegboard Test
Category Fluency	Color Trails – II	Symbol Digit Modalities Test	WMS-III Spatial Span Subtest	Story Memory Test (Learning component)	Brief Visuospatial Memory Test – Revised (Total Learning)		Arendt Central Motor Test Battery
Action Fluency	Wisconsin Card Sorting Test	Trailmaking Test – Part A	Paced Auditory Serial Addition Test	Hopkins Verbal Learning Test-Revised (Total Learning)	Figure Memory Test (Learning component)		Finger Tapping Test
Design Fluency Tests	Halstead Category Test	Color Trails – I	Digit Vigilance Test (error component)	Buschke Selective Reminding Test	Rey-Osterreith Complex Figure Test (Immediate Recall)		Timed Gait
	Tower Tests	Stroop Color Naming		WMS-III Logical Memory I			

Con independencia de los tests utilizados, para evaluar el funcionamiento cognitivo del individuo, el resultado crudo obtenido en cada test evaluado se compara con los resultados obtenidos por sujetos sanos de la misma población y con las mismas características demográficas (edad, genero, años de educación, etnia). Los resultados obtenidos son expresados en forma de z o un t-scores. El z-score refleja el numero de desviaciones estándar que separan los resultados de la media poblacional, mientras que el t-score estandariza los resultados poblacionales en una escala del 0 al 100 en la que la media poblacional equivale a un t-Score de 50 y $\pm 1DS$ equivale a unos t-Score de 40 y 60.

La clasificación de 2007 estableció tres categorías de gravedad para el HAND: 1) los trastornos neurocognitivos asintomáticos o “Asymptomatic neurocognitive

impairment” (ANI); 2) los trastornos neurocognitivos leves o “Mild neurocognitive disorders” (MND); Y 3) el HAD. Para adecuarnos a la denominación estándar para estas entidades, al igual que en el caso del HAND, utilizaremos las abreviaturas inglesas para referirnos a estos términos [93].

Se definió ANI por: 1) la presencia de una afectación cognitiva adquirida que afecte al menos a dos funciones cognitivas, documentada por un funcionamiento inferior o igual a -1 desviación estándar (DS) en los tests neurocognitivos utilizados, tras estandarizados y normalizados por edad y nivel de educación. Siendo las funciones cognitivas evaluadas al menos: verbal/lenguaje; atención/memoria de trabajo; abstracción/función ejecutiva; memoria (de aprendizaje, de recuerdo); velocidad de procesamiento de la información; funciones sensoriales/perceptivas; y funciones motoras. 2) El deterioro cognitivo no interfiere en las actividades de la vida diaria del paciente. 3) El deterioro no cumple criterios de delirium ni de demencia. 4) Ausencia de comorbilidades confusoras.

Se definió MND por: 1) la presencia de una afectación cognitiva adquirida que afecte al menos a dos funciones cognitivas, documentada por un funcionamiento inferior o igual a -1 desviación estándar (DS) en los tests neurocognitivos utilizados, tras estandarizados y normalizados por edad y nivel de educación. Siendo las funciones cognitivas evaluadas al menos: verbal/lenguaje; atención/memoria de trabajo; abstracción/función ejecutiva; memoria (de aprendizaje, de recuerdo); velocidad de procesamiento de la información; funciones sensoriales/perceptivas; y funciones motoras. 2) El deterioro cognitivo interfiere de forma leve en las actividades de la vida diaria del paciente. 3) El deterioro no cumple criterios de delirium ni de demencia. 4) Ausencia de comorbilidades confusoras.

Y se definió HAD por: 1) la presencia de una afectación cognitiva adquirida marcada que afecte al menos a dos funciones cognitivas (generalmente más), especialmente a nivel del procesamiento de información nueva, enlentecimiento en el procesamiento de la información y/o defectos en la atención/concentración,

documentada por un funcionamiento inferior o igual a -2 desviaciones estándar (DS) en los tests neurocognitivos utilizados, tras estandarizados y normalizados por edad y nivel de educación. Siendo las funciones cognitivas evaluadas al menos: verbal/lenguaje; atención/memoria de trabajo; abstracción/función ejecutiva; memoria (de aprendizaje, de recuerdo); velocidad de procesamiento de la información; funciones sensoriales/perceptivas; y funciones motoras. 2) El deterioro cognitivo interfiere de forma severa en las actividades de la vida diaria del paciente. 3) El deterioro no cumple criterios de delirium. 4) Ausencia de comorbilidades confusoras.

De forma adicional a la evaluación del grado de deterioro y de la presencia o no de comorbilidades neurocognitivas confusoras, un elemento clave para graduar el HAND es la presencia o no de interferencias en las actividades diarias del individuo. En la clasificación de 2007 se establecieron tres métodos diferentes para evaluar la presencia de deterioro en el funcionamiento diario: 1) el uso de cuestionarios auto administrados al paciente; 2) el uso de cuestionarios administrados a un familiar que conviva con el paciente; o 3) el uso de tests objetivos que evalúen el funcionamiento cognitivo. Existen discrepancias importantes en estos métodos que hacen que un paciente pueda ser diagnosticado de ANI o MND en función del sistema utilizado [108]. Este hecho contribuye al debate existente sobre la entidad patológica del ANI.

Una de las principales limitaciones de los criterios de Frascati de 2007 es que solo evalúan el deterioro de forma cualitativa (si/no). Cambios significativos en el funcionamiento cognitivo que no alcanzan los criterios de HAND, como por ejemplo una reducción del funcionamiento cognitivo del percentil 99 al 50, pasarían desapercibidos si solo se tuviese en cuenta esta clasificación. Para evitar esta deficiencia de los criterios de Frascati se han establecido “scores” cognitivos que permiten evaluar la funcionalidad del individuo de una forma cuantitativa.

En la actualidad existen tres métodos para evaluar cuantitativamente el deterioro neurocognitivo: el NPZ, el global rating score (GRS) y el global déficit score (GDS).

El NPZ es el más sencillo de ellos y el primero que se utilizó. Consiste en establecer la media de los Z-scores obtenidos por el individuo en cada test evaluado. Su principal limitación es su falta de sensibilidad para reflejar cambios significativos en funciones neurocognitivas aislada cuando el funcionamiento en el resto es normal.

El GRS se obtiene mediante un algoritmo diagnóstico a partir de una transformación en rangos (0-9) de los resultados medios de los Z-score obtenidos al evaluar cada función cognitiva. Este score tiene la ventaja de ponderar la afectación de las funciones cognitivas más frecuentemente afectadas en VIH pero sigue presentando dos limitaciones fundamentales: 1) el resultado obtenido es ordinal y por tanto no cuantitativo; y 2) la presencia de resultados muy positivos en algún test puede conducir a la sobreestimación del funcionamiento cognitivo global del individuo.

Por último el GDS se creó con el objetivo de minimizar el impacto de los resultados muy positivos en la evaluación final del deterioro [109]. Para ello, una vez calculados los T-scores de cada test evaluado, los resultados considerados normales (> 40) se agruparon en un mismo rango 0, mientras los resultados patológicos (0 – 40) se graduaron progresivamente entre 1 y 5. Una vez realizada la transformación de los resultados en valores entre 0 y 5, el GDS se calcula hallando el resultado medio de todos los test evaluados [110].

El diagnóstico de HAND es laborioso, requiere tiempo y personal especializado. Por ello, se han intentado encontrar métodos más sencillos que permitan seleccionar pacientes con un alto riesgo de presentar HAND y excluir pacientes con muy baja probabilidad de presentar HAND. Diversos son los métodos que se han utilizado como herramientas de despistaje del HAND, siendo los más empleados las baterías neurocognitivas abreviadas. La mayoría de las baterías abreviadas fueron creadas para el diagnóstico del HAD y han sufrido cambios en sus puntos de corte para poder adaptarse al despistaje de las formas de deterioro cognitivo leve (ANI y MND). Su ventaja es que pueden administrarse en 5-20 min

por personal no experto. En la actualidad las más utilizadas son el *HIV Dementia Score* (HDS) [111] y el *Brief Neuro-Cognitive Screen* (BNCS) [112].

5. El tratamiento antirretroviral de la infección por VIH del SNC

La historia natural de la encefalitis por VIH y de su manifestación clínica, la demencia asociada al VIH se modificó drásticamente tras el advenimiento de tratamientos antirretrovirales capaces de suprimir y mantener el control de la replicación viral. El control sistémico del VIH supuso una mejora significativa del funcionamiento neurocognitivo de muchos pacientes diagnosticados de demencia VIH [113]. Sin embargo y pesar de este gran avance, la prevalencia de las alteraciones neurocognitivas leves y moderadas asociadas al VIH se ha mantenido estable [92], aunque varía significativamente en función de la población donde se ha estimado (18-63%) [101, 114].

Diversas hipótesis han intentado explicar a lo largo del tiempo la presencia de alteraciones neurocognitivas en pacientes VIH que reciben tratamiento antirretroviral efectivo y que no presentan comorbilidades neurocognitivas confusoras: Cronológicamente, la primera hipótesis planteada sugería que algunos tratamientos antirretrovirales efectivos a nivel sistémico podrían no serlo dentro del SNC. La segunda postula además la existencia de neurotoxicidad directa asociada al uso de algunos fármacos antirretrovirales y por tanto la existencia de una ventana terapéutica de neuroprotección para los antirretrovirales. Por último, ha surgido una tercera hipótesis que plantea la ineficacia del tratamiento antirretroviral para controlar aspectos relacionados con la infección por VIH del SNC como la inflamación o la liberación de partículas virales por los astrocitos crónicamente infectados.

Respecto a la primera hipótesis planteada, para que el tratamiento antirretroviral resulte efectivo es necesario que difunda de forma efectiva en los reservorios

virales y alcance en éstos la suficiente concentración como para inhibir la replicación viral. Diversos son los grupos que han evaluado la penetración de los diferentes fármacos antirretrovirales a través de la BHE y su neuroeficacia alcanzando concentraciones eficaces a nivel del LCR. Basándose en estos estudios, Scott Letendre y col en 2008 establecieron un score de neuropenetración y neuroeficacia para los distintos fármacos antirretrovirales (CPE Score) [115], que fue revisado en 2010 con la inclusión de nuevos fármacos [116].

Este score de 2010 clasificó a los fármacos antirretrovirales en cuatro categorías de neuropenetración/neuroeficacia: Muy alta, alta, moderada o baja (tabla 3). Igualmente estableció que el CPE score para la combinación de varios fármacos antirretrovirales se obtenía sumando los scores individuales de los fármacos que componían el régimen. Esta aproximación se basó en la existencia de estudios previos que sugerían que la eficacia del TAR suprimiendo la replicación viral del VIH en el LCR dependía del número de fármacos con alta neuroeficacia que contenía el régimen [117].

Tabla 3. CPE Score versión 2010

Familia	Penetración Score	Muy alta 4	Alta 3	Moderada 2	Baja 1
Análogos de nucleos(t)idos		zidovudina	Abacavir Emtricitabina	Didanosina Lamivudina Stavudina	Tenofovir Zalcitabina
No análogos de nucleos(t)idos		Nevirapina	Efavirenz Delavirdina	Etravirina	
Inhibidores de proteasa		Indinavir/r	Darunavir/r Fosamprenavir/r Lopinavir/r Indinavir	Atazanavir Atazanavir/r Fosamprenavir	Nelfinavir Ritonavir Saquinavir Saquinavir/r Tripanavir/r
Inhibidores de la Fusión/Entrada			Maraviroc		Enfuvirtida
Inhibidores de la Integrasa			Raltegravir		

El CPE score fue validado en la cohorte “*CNS HIV Anti-Retroviral Therapy Effects Research*” (CHARTER) por el propio Letendre como herramienta para predecir el

riesgo de que un paciente en tratamiento antirretroviral, efectivo o no, presentase replicación del VIH en el LCR [115, 116] y pero no como herramienta predictora del riesgo de desarrollar alteraciones neurocognitivas. Varios estudios han intentado validar externamente el CPE score como herramienta para predecir el riesgo de replicación viral persistente en el SNC y de deterioro neurocognitivo.

Los resultados de los mismos han sido dispares. Mientras algunos han demostrado relación entre CPE scores mayores y un menor riesgo de presentar carga viral de VIH detectable en el LCR [118, 119] o un mejor rendimiento cognitivo [118, 120-122], otros no han confirmado la relación entre el CPE score y el rendimiento cognitivo [105, 123-126]. Es especialmente reseñable que el CPE score no haya demostrado relación con el funcionamiento neurocognitivo en la propia cohorte CHARTER donde fue validado ni en un ensayo clínico diseñado a tal efecto, si bien es cierto que dicho ensayo clínico tuvo que ser suspendido de forma precoz por falta de reclutamiento.

Tabla 4. Neurotoxicidad de los distintos antirretrovirales sobre el SNC.

Antirretroviral	Resumen de la evidencia disponible			
	In-vitro	Animal	imagen	Clínica
Tenofovir	+/-	+		
Abacavir	++		+/-	
Emtricitabina	+/-			
Lamivudina	+/-	+	-	
Zidovudina	+/-	+	+/-	
Efavirenz	++	+	+/-	++
Nevirapina	+	+		
Etravirina	+			
Darunavir	-			
Atazanavir	+	+	+/-	
Raltegravir				+/-
Dolutegravir				+
Maraviroc	-			

Leyenda: - toxicidad improbable, +/- toxicidad posible toxicidad sin significación clínica o datos contradictorios, + alguna evidencia de toxicidad a dosis terapéuticas y ++ evidencia razonable de toxicidad a dosis terapéuticas.

Esta disparidad de resultados sugieren que de forma adicional a la neuropenetración / neuroeficacia del tratamiento antirretroviral deben existir otros factores que condicionen el desarrollo de deterioro neurocognitivo. A raíz de esta constatación, surgió la segunda hipótesis que pretendía explicar la existencia de deterioro neurocognitivo en individuos infectados por VIH que reciben tratamiento antirretroviral efectivo: la neurotoxicidad de los antirretrovirales sobre el SNC.

La evidencia disponible actualmente para atribuir un efecto neurotóxico a los antirretrovirales es limitada (tabla 4). Se basa principalmente en los trabajos in vitro del grupo de Liner y col. de la universidad de *Chapel Hill* y en los de Akay y col. de la universidad de California, San Diego [126-127]. Estos trabajos demuestran que todos los fármacos antirretrovirales cuando alcanzan determinadas concentraciones son capaces de alterar el funcionamiento neuronal e incluso de inducir muerte neuronal. De forma adicional, estudios de neuroimagen del SNC han constatado la existencia de efectos neurotóxicos asociados al uso de algunos fármacos antirretrovirales [128].

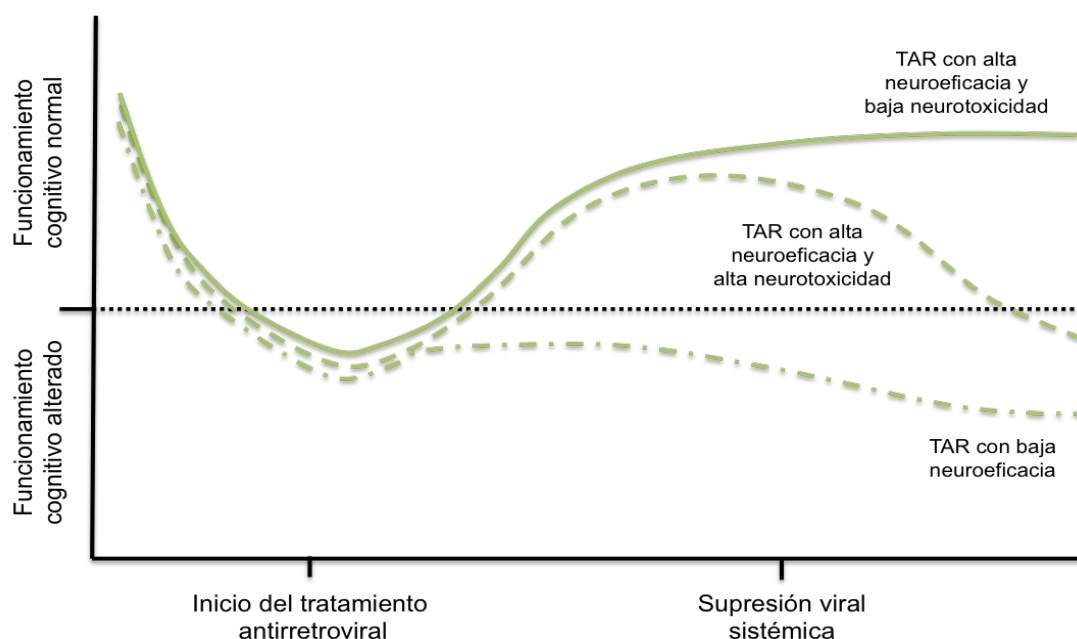
In vivo, la demostración de neurotoxicidad por antirretrovirales se limita prácticamente al uso de efavirenz [129-131]. Aunque la mejoría cognitiva observada en 167 pacientes, la mayoría de ellos suprimidos (64%), que recibían diversos regímenes antirretrovirales, al suspender el tratamiento antirretroviral en el ACTG 5170 sugiere la existencia de neurotoxicidad más allá de este fármaco [132].

La constatación de cierto grado de neurotoxicidad asociada a los antirretrovirales, con independencia de que su grado de relevancia clínica esté por confirmar, ha permitido introducir el concepto de ventana terapéutica de los antirretrovirales en la prevención del HAND (figura 5). Este concepto sugiere que la concentración óptima de los antirretrovirales en el SNC debe ser aquella que permita la supresión de la replicación viral del VIH sin alcanzar niveles que puedan producir daño neuronal [133]. Aunque la existencia de una ventana terapéutica de acción de los

antirretrovirales en el SNC no ha sido completamente confirmada, diversas observaciones sugieren su existencia [119, 128, 134-135].

Por último, algunos autores han postulado que con independencia de su neuroeficacia y neurotoxicidad, el tratamiento antirretroviral no es eficaz bloqueando algunos procesos patogénicos como la liberación de partículas virales neurotóxicas en los astrocitos crónicamente infectados. Esta liberación de sustancias neurotóxicas puede favorecer el mantenimiento de niveles elevados de inflamación cerebral y ambos factores pueden a su vez favorecer el desarrollo de alteraciones neurocognitivas, especialmente en pacientes que hayan tenido infecciones extensas del SNC [136].

Figura 5: Ventana terapéutica de neuroprotección de los antirretrovirales



Esta hipótesis se sustenta en la constatación, en muestras cerebrales necrópsicas, de dos perfiles de infección no replicativa del SNC: La infección latente y la infección controlada. Aunque en ambas no se detecta ARN viral en el tejido cerebral, en la infección latente se observan niveles elevados de ADN proviral y de proteínas virales, reducción de la expresividad dendrítica y sináptica y proliferación

de la microglia y la astrogliosis. Por el contrario en la infección controlada, no suele detectarse ADN viral, las proteínas virales se detectan en niveles bajos, la expresividad dendrítica y sináptica están conservadas y no existe proliferación significativa de la microglia o la astrogliosis [137]. La evidencia in vivo de menores tasas de deterioro neurocognitivo en pacientes con infecciones menos avanzadas y por tanto con nadires de CD4 más altos refuerza la plausibilidad de esta hipótesis [138].

En resumen, la capacidad de un tratamiento antirretroviral para controlar la infección por VIH y por tanto para prevenir el deterioro neurocognitivo va a depender de su capacidad para controlar la replicación del VIH en el SNC y de su perfil neurotóxico. En pacientes con infecciones del SNC controladas, el tratamiento antirretroviral puede ser suficiente para prevenir la aparición de deterioro cognitivo. Mientras, en pacientes con infecciones del SNC latentes se producen fenómenos neurotóxicos que favorecen el desarrollo de alteraciones neurocognitivas y que no son modificables por la acción del tratamiento antirretroviral.

6. Seguridad neurocognitiva de la monoterapia con inhibidores de proteasa.

La monoterapia con inhibidores de proteasa es una estrategia terapéutica, alternativa al tratamiento antirretroviral convencional con tres antirretrovirales, cuya finalidad es evitar la toxicidad asociada con el uso de análogos de nucleos(t)idos. Su uso está aceptado como tratamiento de mantenimiento en pacientes muy adherentes, con al menos seis meses de supresión viral, que no hayan experimentado fracasos terapéuticos previos con un régimen que contuviese un inhibidor de proteasa [139].

En la actualidad solo dos fármacos, darunavir y lopinavir, ambos potenciados con ritonavir, cuentan con datos que justifiquen su uso en monoterapia. Aunque la eficacia de la monoterapia con estos dos fármacos es levemente inferior a la de la

terapia convencional [140-141], los pacientes que fracasan con este tratamiento generalmente vuelven a controlar la infección tras la reintroducción de una triple terapia, sin que por tanto pierdan opciones terapéuticas futuras]. Tanto con lopinavir como con darunavir, los fracasos de la monoterapia suelen producirse en pacientes con infecciones evolucionadas y nadires de CD4 bajos [143-144].

EL perfil de fracasos de la monoterapia en pacientes avanzados junto con la constatación de varios casos documentados de fracaso del tratamiento antirretroviral en el SNC con aparición de deterioro neurocognitivo en pacientes que recibían inhibidores de proteasa en monoterapia puso en cuestión la capacidad de esta estrategia para controlar la infección por VIH del SNC, especialmente en pacientes avanzados [145-146].

Diversos autores plantearon, basados la baja penetración de los inhibidores de proteasa en el SNC (entre el 1-5% de la concentración plasmática) y en el bajo CPE score que teóricamente tendría la monoterapia con inhibidores de proteasa, que los pacientes que recibirán este tratamiento podrían tener un insuficiente control de la replicación viral en el LCR y por ende un riesgo aumentado de desarrollar un deterioro neurocognitivo asociado al VIH.

Para evaluar esta hipótesis, el grupo de la cohorte Suiza llevó a cabo un ensayo clínico cuyo objetivo era comparar el control de la infección por VIH del SNC y la evolución neurocognitiva en pacientes que recibían lopinavir/ritonavir en monoterapia o con dos análogos de nucleos(t)idos [147]. Desafortunadamente este estudio fue parado antes de su finalización por el comité de seguridad ante la aparición de una mayor tasa de fallos virológicos en plasma entre los pacientes que recibían monoterapia. Los resultados parciales del estudio mostraron cuatro casos de alteraciones neurológicas transitorias, con niveles elevados de replicación en el LCR, entre los pacientes que recibían monoterapia con lopinavir/ritonavir y fracasaron en plasma. En los 4 casos las alteraciones neurológicas se resolvieron tras la reintroducción de un régimen antirretroviral con tres fármacos.

Con independencia de estos cuatro casos, el estudio demostró el mismo número de casos de escape viral en el LCR entre los pacientes que recibieron monoterapia o terapia triple (3 casos en cada brazo) y no evidenció diferencias en la evolución neurocognitiva entre ambas ramas del estudio. La ausencia de un resultado concluyente de este estudio, junto con la contradicción existente entre los casos de escape viral neuro-sintomático reportados y la ausencia de casos de deterioro neurocognitivo clínico entre los pacientes que recibieron monoterapia con lopinavir o darunavir en ensayos clínicos, motivó primero la realización de un análisis de la evidencia disponible sobre este tema (primero de los artículos presentados en la presente tesis, que completa este apartado de la introducción) y posteriormente la realización del presente proyecto de tesis doctoral, el estudio PICASSO.

7. Resumen de la introducción

La infección por VIH es capaz de penetrar e infectar el SNC y secundariamente de producir una serie de procesos neuropatogénicos que se manifiestan como trastornos del funcionamiento neurocognitivo.

El diagnóstico de los trastornos neurocognitivos asociados al VIH es un diagnóstico de exclusión que se realiza mediante la aplicación una batería estandarizada de pruebas que miden el rendimiento del individuo en diferentes áreas cognitivas.

El tratamiento antirretroviral, cuando alcanza concentraciones terapéuticas adecuadas en el LCR, es capaz de controlar la replicación del VIH en el SNC y en muchos casos de revertir y prevenir el desarrollo de trastornos neurocognitivos asociados al VIH.

Cuando el tratamiento antirretroviral no alcanza concentraciones adecuadas en el SNC, cuando su uso produce toxicidad neuronal o cuando el VIH produce

fenómenos patogénicos no relacionados con su replicación, los pacientes infectados por VIH en tratamiento antirretroviral efectivo pueden desarrollar trastornos neurocognitivos asociados al VIH.

La monoterapia con lopinavir o darunavir potenciados con ritonavir es una alternativa al tratamiento convencional con tres antirretrovirales en pacientes seleccionados con infecciones por VIH controladas que han desarrollado toxicidad por el uso de análogos de nucleós(t)idos.

La baja penetración de los inhibidores de proteasa en el SNC y la constatación de varios casos de escape viral en el LCR en pacientes, algunos neuro-sintomáticos, tratados con un inhibidor de proteasa en monoterapia ha puesto en tela de juicio la seguridad a nivel neurocognitivo de esta estrategia.

C. COPIA DE LOS TRABAJOS PUBLICADOS

J Antimicrob Chemother 2011; **66**: 1954–1962
doi:10.1093/jac/dkr229 Advance Access publication 13 June 2011

Protease inhibitor monotherapy and the CNS: peace of mind?

Ignacio Perez-Valero¹, Carmen Bayon², Irene Cambron², Alicia Gonzalez¹ and Jose R. Arribas^{1*}

¹Servicio de Medicina Interna, Unidad VIH, Hospital La Paz, IdiPAZ, Madrid, Spain; ²Servicio de Psiquiatría, Hospital La Paz, IdiPAZ, Madrid, Spain

*Corresponding author. Consulta Medicina Interna 2, Hospital La Paz, Paseo de la Castellana 261, 28046, Madrid, Spain. Tel: +34-91-207-1676; Fax: +34-91-729-0033; E-mail: jrarribas.hulp@salud.madrid.org

Boosted protease inhibitor (bPI) monotherapy has demonstrated high efficacy for maintaining viral suppression in the blood. bPI monotherapy has the theoretical advantage of avoiding the long-term toxicity associated with the use of nucleoside reverse transcriptase inhibitors. Concern about the efficacy of bPI monotherapy in preventing HIV replication in the CNS is one reason that has precluded the widespread use of this therapeutic strategy. In several studies, a low CNS penetration-effectiveness (CPE) score has been associated with a higher risk of virological failure in the CNS and with neurocognitive impairment. Since the CPE score is substantially lower for bPI monotherapy than for triple-drug highly active antiretroviral therapy (HAART), it has been postulated that bPI monotherapy might have a higher risk for CNS virological failure and neurocognitive impairment. However, the available evidence, although limited, does not support this notion. Lopinavir and darunavir achieve CSF drug levels that are sufficient to fully suppress HIV replication. In clinical trials, when compared with triple-drug HAART, patients receiving bPI monotherapy with lopinavir and darunavir who maintain full virological suppression in plasma do not appear to be at a higher risk of discordant HIV replication in the CSF or of neuropsychiatric adverse events. It should be noted that several studies have suggested that nucleoside reverse transcriptase inhibitors might have neurotoxic effects and, consequently, bPI monotherapy might be able to avoid the CNS toxicity induced by nucleosides. It is clear that more studies including detailed neurocognitive testing are needed to completely establish the risk/benefit ratio of bPI monotherapy or triple-drug HAART for preserving neurocognitive function in HIV-infected patients.

Keywords: PIs, CNS, HIV

Introduction

Triple-drug highly active antiretroviral therapy (HAART) is the gold standard for the initial therapy of HIV-infected patients.¹ Using three antiretroviral drugs avoids the selection of drug-resistant HIV natural mutants that pre-exist in antiretroviral-naïve patients with high levels of viral replication. However, when HIV suppression has been achieved, do we still need to continue treatment with three drugs? The results of several clinical trials^{2,3} have suggested that the use of boosted protease inhibitor (bPI) monotherapy can be almost as efficacious as triple therapy in maintaining viral suppression in the blood.^{4,5}

The main reasons for treating HIV-infected patients with a single antiretroviral instead of triple-drug HAART are to avoid drug-related toxicity and to reduce treatment costs.⁶ The main objective of a lifetime treatment such as HAART has to be a trade-off between the efficacy and long-term toxicity. We still do not know for an individual patient what the right number of antiretrovirals is that offers the optimal balance between long-term efficacy and toxicity.

HIV, HAART and the CNS

HIV is a neurotropic virus that can cause a spectrum of neurocognitive disorders, globally denominated HIV-associated neurocognitive disorders (HAND).⁷ Despite the global uptake of HAART, the frequency of HAND has not decreased in the HAART era.⁸ If HAND is occurring in patients receiving triple-drug HAART, it is logical that one of the main concerns among clinicians and researchers about bPI monotherapy is its possible lower ability to protect patients from the effects of HIV in the CNS reservoir.

Reservoirs are anatomical sites or cell types in which replication-competent HIV accumulates and persists, despite the effects of HAART. HAART suppresses HIV replication in plasma if adequate drug concentrations are achieved. However, it is unclear whether HAART can uniformly suppress HIV replication in anatomical reservoirs such as the CNS. Complete HIV suppression in plasma but not in the CNS has been described (Table 1). A lack of efficacy in HAART controlling HIV replication in the CNS has been associated with HAND.⁹ Active HIV replication releases neurotoxic proteins, such as Tat and

© The Author 2011. Published by Oxford University Press on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

1954

Table 1. Studies including data on the percentage of patients on conventional antiretroviral treatment with detectable HIV RNA levels in the CSF and HIV RNA <50 copies/mL in plasma

Study	n	HIV RNA cut-off used in CSF (copies/mL)	Percentage of patients above HIV RNA cut-off in CSF and <50 HIV RNA copies/mL in plasma	CPE score predictive value
Eden <i>et al.</i> ^{26a}	69	50	10	no
Letendre <i>et al.</i> ⁹	300	2	26	NA
Letendre <i>et al.</i> ⁵⁵	842	50	4	NA
Marra <i>et al.</i> ²²	NA	50	0	NA
Yilmaz <i>et al.</i> ⁵⁶	94	50	2	NA
Antinori <i>et al.</i> ²⁴	107	50	15.2	yes

NA, not available.

^aThis study included only neuro-asymptomatic patients.

gp120. Microglial cells infected with HIV release proinflammatory cytokines, and infected oligodendrocytes release low concentrations of glutamate, nitric oxide and calcium. These mechanisms might contribute to HAND.¹⁰ It has been estimated that ~50% of HIV-infected patients suffer HAND in the HAART era.¹¹

HAART prevents HAND¹² and appears to be more efficacious when it is started in patients who still have high CD4 cell counts.¹³ It has been suggested that when the CD4 cell count drops, HIV has fewer available lymphocytes to infect.¹⁴ In an environment depleted of CD4 cells, HIV increases its avidity for cells expressing low levels of HIV receptors, such as microglial cells and oligodendrocytes. Subsequently, the number of cells infected in the CNS rises, increasing proinflammatory cytokines, neuronal dysfunction and CNS cell destruction.¹⁵

The efficacy of HAART in preventing HAND probably relies on its ability to achieve HIV suppression in plasma and in the CNS. Suppression in plasma avoids the trafficking of HIV towards the CNS and suppression in the CNS avoids local HIV replication. The concentrations of antiretrovirals in the CNS depend on the capacity of antiretroviral drugs to cross the blood-brain barrier (BBB) and the ability of the BBB to expel antiretrovirals outside the CNS.¹⁶ Antiretroviral concentrations and HIV replication are not directly measurable in the brain; therefore, drug concentrations are measured in the CSF. Since antiretroviral concentrations and HIV replication in the brain and in the CSF seem to be related,¹⁷ CSF has been used as a valid substitute of brain tissue for evaluating the effect of antiretrovirals suppressing HIV replication.

CPE score, bPI monotherapy and HAND

Detectable HIV RNA in the CSF has been associated with a higher risk of HAND development and/or progression.⁹ The CHARTER group has postulated that when levels of antiretrovirals in the CNS are not sufficient to fully suppress HIV, local viral replication in the CSF could be ongoing while suppressed in plasma. Based on studies that have measured the pharmacokinetic profile of antiretrovirals in the CSF, along with other characteristics of the drugs, the CHARTER group had proposed a CPE score for antiretrovirals as a tool to predict the risk of HIV replication in CSF and neurocognitive impairment.¹⁸

The CPE score for a specific HAART regimen is calculated by adding up the individual value of each antiretroviral included in the regimen. The CHARTER group and others have reported that patients receiving a HAART regimen with a low CPE score have a higher risk of HAND and HIV virological failure in CSF.¹⁸⁻²⁰ However, other studies have communicated conflicting results. The ALLRT cohort²¹ only confirmed the CPE score utility in patients receiving more than three antiretrovirals. A recent update of the CHARTER cohort, including a higher number of patients, did not confirm the results observed previously.¹¹ Marra *et al.*²² observed worse neurocognitive outcomes in patients receiving HAART regimens with high CPE scores. An updated version of the CPE score was presented in 2010.²³

The CPE score of bPI monotherapy is considerably lower than that of triple-drug HAART (Table 2). Given these large differences, it appears logical to hypothesize that bPI monotherapy might be associated with a higher risk of CNS virological failure and HAND. It is important to emphasize that one important caveat of the studies evaluating the CPE score is that typically they have included a diverse population of patients, with both active and suppressed HIV replication in plasma.¹⁸⁻²⁴ In patients receiving triple-drug HAART, if HIV replication is suppressed in plasma, it is also generally suppressed in CSF (Table 1). Conversely, when HIV RNA is detectable in plasma, active HIV replication in CSF should also be expected, with a potential risk of CNS injury.²⁵ Another issue is to determine whether for patients who have plasma HIV RNA levels of <50 copies/mL, the risk of active replication in the CSF is different depending on the CPE score of each HAART regimen. Antinori *et al.*²⁴ have reported that the updated version of the CPE score predicts CSF viral suppression in patients with undetectable HIV viral load in plasma. Conversely, the CPE score was not a predictor of CSF escape in the study by Eden *et al.*²⁶

Levels of PIs in the CSF, CSF viral suppression and bPI monotherapy

The ability of antiretroviral therapy to inhibit HIV viral replication in the CSF depends on several factors: the origin of the HIV viral load detected in the CSF; the levels of free drug achieved in the CSF; and the IC₅₀ for antiretrovirals in the CSF.

Review

Table 2. Clinical trials of bPI monotherapy: efficacy, CPE score and neuropsychiatric outcomes

Study	Group (n)	CPE score 2010	Percentage HIV RNA <50 copies/mL (plasma); ITT, M and S=F ^a (week of follow-up)	Neurocognitive performance, mean ± SD (weeks of follow-up)	Percentage of patients with CNS adverse events (week of follow-up)
OREY ⁵⁷	atazanavir/r (61)	2	67% (48)	NA	8% (48) ^b
OKO4 ⁴	lopinavir/r (100)	3	77% (96)	NA	NA
	lopinavir/r+2 NRTIs (98)	7–9	77.6% (96)	NA	NA ^c
Sprinz et al. ⁴⁶	lopinavir/r (27)	3	63% (96)	NA	NA ^d
MOST ⁴⁰	lopinavir/r (29+13) ^e	3	79.3% (96) ^f	NA ^g	NA ^h
	lopinavir/r+2 NRTIs (31)	7–9	100% (96) ^f	NA ^g	NA
MONET ^{48,49}	darunavir/r (127)	3	84.3% (48)–74.8% (96)	8.9 ± 2.8 (48) ⁱ	16% (48)–21% (96)
	darunavir/r+2 NRTIs (129)	7–9	85.3% (48)–80.6% (96)	9.0 ± 2.6 (48) ⁱ	16% (48)–19% (96)
MONOI ⁴⁴	darunavir/r (103)	3	88% (96)	NA	NA ^j
	darunavir/r+2 NRTIs (104)	7–9	84% (96)	NA	

NA, not available; r, ritonavir.

^aIntention to treat, missing and switches equal failure.

^bHeadache. Only adverse events with a frequency >5% were reported. Two patients with CNS serious adverse events (one cerebral ischaemia and one headache). Data were obtained from www.clinicaltrials.gov.

^cInsomnia resulted in discontinuation in one patient in the triple-therapy arm.

^dTransient neurocognitive impairment in a patient receiving lopinavir/ritonavir monotherapy resolved after reinduction with two NRTIs.

^eTwenty-nine patients started the trial in the monotherapy arm and 13 patients changed from triple therapy to monotherapy after 48 weeks of follow-up.

^fTrial prematurely stopped. Not all patients completed 96 weeks of follow-up.

^gNo differences between monotherapy and triple therapy were reported. Detailed data not provided.

^hFive patients in the monotherapy arm had transient acute neuropsychiatric symptoms that resolved after reinduction with two NRTIs.

ⁱFAHI score used to measure neurocognitive performance.

^jTransient acute neurological symptoms (seizures in an epileptic patient and atypical headache) in two patients in the monotherapy arm resolved after reinduction with two NRTIs.

It has not been clarified whether the HIV viral load in the CSF derives mainly from plasma HIV replication or is the result of local production in the CNS. CD4 cells trafficking from plasma seem to be responsible for most of the HIV viral load detected in the CSF.²⁷ Local active HIV replication in the CNS is increased in advanced patients with a low nadir CD4 cell count.²⁷ The CSF antiretroviral levels needed to fully suppress HIV replication in patients with a low level of local CNS HIV replication could be lower than the antiretroviral levels needed when local CNS HIV replication is high.

The levels of antiretrovirals achieved in the CSF depend on different factors. Antiretroviral penetration into the CSF is modulated by the blood–CSF barrier (BCB). Different factors, such as molecular size, lipophilicity, ionization and plasma protein binding, modify antiretroviral penetration across the BCB.²⁸ The

CSF/plasma ratio for an antiretroviral is used to measure the effect of factors favouring drug penetration or making drug penetration difficult into the CSF.

Total CSF levels for an antiretroviral drug depend on the total plasma concentration for that antiretroviral and its CSF/plasma ratio. Antiretroviral levels in plasma are variable, depending on adherence, drug interactions and other factors. The CSF/plasma ratio remains constant, except in the presence of conditions that alter the permeability of the BBB and the BCB, such as CNS infections.

The total level of an antiretroviral in a biological fluid represents a proportion of the drug bound to proteins and a proportion of unbound free drug. Only the free drug component is active against HIV replication. More relevant than the CSF/plasma ratio for total antiretroviral levels is the CSF/plasma

ratio for free antiretroviral levels. Free levels of an antiretroviral in the CSF depend on the free plasma concentration and the CSF/plasma ratio for free antiretroviral levels.

The IC₅₀, the concentration of an antiretroviral that inhibits the replication of HIV in 50% of infected cells, is the cut-off used to evaluate the capacity of an antiretroviral to suppress HIV replication in the CSF. The IC₅₀ is typically assessed in a protein-free medium (PFM) and in the presence of plasma. Values for the IC₅₀ are lower when assessed in PFM than when assessed with plasma, because in PFM there is a higher proportion of unbound drug.

The IC₅₀ in the presence of CSF is normally not assessed because of methodological problems. Therefore, a precise activity cut-off for total antiretroviral levels in the CSF, a low-protein fluid, is not available. To solve this problem, three approaches have been tried. First, to compare the total level of the antiretroviral in the CSF with the IC₅₀ in plasma; second, to compare the total level of the antiretroviral in the CSF with the IC₅₀ in PFM; and third, if the unbound antiretroviral levels in the CSF can be measured, to compare the unbound level of the antiretroviral in the CSF with the IC₅₀ in PFM. This last option is the most accurate, because it compares the effect of the drug under the same testing conditions (in a PFM).

bPIs are large lipophilic molecules that are highly bound to plasma proteins.²⁹⁻³¹ The CSF/plasma ratio of total levels of PIs tested as monotherapy³¹⁻³³ are low and, subsequently, concentrations achieved in the CSF are also low.^{31,32,34} However, the IC₅₀ in PFM for the PIs used as monotherapy is also very low (~1-2 ng/mL).^{32,35,36} Therefore, although total levels of PIs in the CSF are low, they might be theoretically sufficient to exceed the IC₅₀ in PFM in most of cases (Table 3).

Factors interfering with antiretroviral drug levels in plasma, such as adherence or the presence of drug interactions, are very relevant when bPI monotherapy is used. The reduction of PI levels in plasma induces the reduction in levels of the antiretroviral in the CSF. To prevent this situation, it is very important for a bPI monotherapy that CSF levels of free drug are, in standard situations, several fold greater than the IC₅₀ in PFM.

Several studies have evaluated the pharmacokinetic profile of the PIs tested as monotherapy (Table 3). These and other studies presented below have evaluated if the drug levels achieved in the CSF when atazanavir/ritonavir, lopinavir/ritonavir and darunavir/

ritonavir are used as bPI monotherapy are enough to suppress the HIV viral load.

Atazanavir/ritonavir

Best *et al.*³⁴ studied 11 CSF/plasma sample pairs for patients receiving atazanavir and 68 for patients receiving atazanavir/ritonavir. Median CSF concentrations for atazanavir/ritonavir and atazanavir were 10.3 ng/mL [interquartile range (IQR) <5-38 ng/mL] and 7.9 ng/mL (IQR <5-40 ng/mL), respectively. Eleven of the paired samples (16%) had undetectable atazanavir levels in the CSF. Compared with patients with detectable atazanavir levels in the CSF, patients with undetectable levels were more likely to have detectable HIV RNA in the CSF (20% versus 37%).

In the ATARITMO trial, CSF viral suppression was analysed in 20 patients who remained with suppressed HIV replication in plasma after 24 weeks of treatment with atazanavir/ritonavir monotherapy.³³ Three patients (15%) had a detectable viral load in the CSF without evidence of genotypic resistance mutations. This proportion of patients was consistent with the 16% of patients without detectable levels in the CSF in the study performed by Best *et al.*³⁴ The lower IQR of the atazanavir concentrations measured in CSF in the ATARITMO trial was less than the IC₅₀ in PFM for atazanavir.

Lopinavir/ritonavir

Capparelli *et al.*³² performed a study with 24 CSF/plasma sample pairs to analyse if CSF concentrations of lopinavir exceeded the IC₅₀ in PFM. After excluding seven pairs for poor adherence, results showed a median lopinavir CSF concentration of 17 ng/mL. The measured CSF concentration exceeded the IC₅₀ in PFM for lopinavir by a median of 5.3-fold. Similar results were obtained by Yilmaz *et al.*³⁷ in 12 patients, 12 and 48 weeks after starting lopinavir/ritonavir-based HAART. The mean concentration of lopinavir in the CSF in those patients was 25 ng/mL.

CSF viral suppression in patients receiving lopinavir/ritonavir monotherapy was analysed in three studies. In the first study, published by Letendre *et al.*,³⁸ a reduction in the CSF viral load was observed after 3 weeks of lopinavir/ritonavir monotherapy in all 10 patients assessed. In the substudy of the IMANI-II

Downloaded from <http://jac.oxfordjournals.org/> at Hospital La Paz on September 8, 2014

Table 3. PIs used as monotherapy: relevant characteristics with regard to activity in the CNS reservoir

PI	CPE score	Protein binding		CSF/plasma level ratio	CSF drug level, IQR (ng/mL)	IC ₅₀ (ng/mL)		CSF concentration above PFM IC ₅₀
		plasma	CSF			PFM	plasma	
Atazanavir/ritonavir	2 ²⁵	86% ³⁰	NA	0.9% ³³	<5-38 ³⁴	1 ³⁶	11 ³⁶	NA
Lopinavir/ritonavir	3 ²⁵	98%-99% ²⁹	NA	0.23% ³²	12.1-22.7 ³²	2 ³²	NA	5-fold ³²
Darunavir/ritonavir	3 ²⁵	95% ³¹	<10% ⁴³	1.5% and 9% ^{35,43a}	39.6-80.5 ³¹	0.6-2.8 ³⁵	12-55 ³⁵	18.5-fold ^{35a}

NA, not available.

^aThese values are for unbound levels of darunavir instead of total darunavir levels.

Review

clinical trial,³⁹ the CSF HIV suppression rate was evaluated in 11 patients suppressed in plasma after 24 weeks of lopinavir/ritonavir monotherapy. Virological failure without evidence of genetic resistance mutations was observed in only one patient, who had high expression of MPC-1, a molecule related to the recruitment of blood lymphocytes and monocytes into the CNS. In this study, lopinavir/ritonavir concentrations exceeded at least three times the IC_{50} in PFM in all patients. Lastly, the MOST clinical trial⁴⁰ was designed to compare, after 48 weeks of follow-up, CSF virological suppression in patients receiving lopinavir/ritonavir monotherapy or triple-drug therapy. Unexpectedly, the MOST trial was suspended prematurely after six patients (21%) receiving lopinavir/ritonavir monotherapy had a virological failure in plasma without development of genotypic resistance. Five of these six patients also had a detectable CSF viral load and four of these patients had symptoms consistent with acute retroviral syndrome.

Although the MOST study appears to suggest that the risk of discordant HIV replication (active replication in CSF while replication is suppressed in plasma) might be higher for patients receiving lopinavir/ritonavir monotherapy, a closer look at the data does not support this notion. Indeed, in the group of patients fully suppressed in plasma (HIV RNA <50 copies/mL), 4/29 patients in the monotherapy arm and 4/31 patients in the triple-drug HAART arm had a detectable CSF viral load. Only one patient receiving lopinavir/ritonavir monotherapy fulfilled the criteria of CSF virological failure defined in the study.

Darunavir/ritonavir

The CSF pharmacokinetic profile of darunavir/ritonavir was analysed in three studies. The first study, published by Yilmaz *et al.*,⁴¹ included 14 CSF/plasma paired samples and the other two, presented by the CHARTER group, both included 29 CSF/plasma paired samples.^{42,43}

The Yilmaz *et al.*⁴¹ study included patients receiving darunavir/ritonavir during a median of 12.5 weeks. All 14 CSF samples showed detectable levels of darunavir with a median concentration of 34.2 ng/mL (range 15.9–212 ng/mL). All concentrations were above the IC_{50} in PFM estimated for this study (2.75 ng/mL). Results from the CHARTER group,^{42,43} first presented at the 49th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy and at the 18th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, were very similar and are presented together. Total darunavir concentrations (IQR 39.6–80.5 ng/mL) and the unbound concentration (IQR 36–73.6 ng/mL) in the CSF were detectable in all samples. Unbound CSF darunavir was a median of 18.5-fold above the IC_{50} in PFM for darunavir. This study was the first where the IC_{50} in PFM was compared with the unbound instead of the total drug concentration in the CSF, ensuring that the CSF protein rate did not interfere with the results.

In the Yilmaz *et al.*⁴¹ study, the CSF HIV viral load was analysed in the 14 CSF samples. Eleven patients had undetectable HIV RNA in the CSF. Detectable CSF viral load was associated with a shorter period of receiving triple-drug HAART including darunavir/ritonavir (1 week for two patients and 5 weeks for the third patient, whose CSF viral load was close to being undetectable). Unfortunately, there are no studies published that have evaluated the ability of darunavir/ritonavir to suppress

HIV viral replication in the CSF. In MONOI,⁴⁴ two patients with CSF virological failure without emergence of genotypic mutations were reported in the presence of mild acute neurological symptoms.

Fosamprenavir/ritonavir

Fosamprenavir/ritonavir monotherapy has been tested unsuccessfully recently.⁴⁵ The study was stopped prematurely due to a high proportion of HIV virological failure in plasma at 48 weeks (45%). The CSF HIV viral load was tested in 10 patients with an undetectable HIV viral load in plasma at week 24. All patients had undetectable HIV viral loads in the CSF using a cut-off of <40 copies/mL.

Neuropsychiatric events in bPI monotherapy trials

Neuropsychiatric events have been explored as part of the safety analysis of bPI monotherapy clinical trials. Although clinical neuropsychiatric events are less sensitive for detecting neurocognitive impairment than neurocognitive tests, no gross negative effects of bPI monotherapy in cognitive performance have been detected (Table 2). Of note, in most of these trials the actual proportion of patients with CNS adverse events was not reported, probably due to the low number of events.

Atazanavir/ritonavir

All atazanavir/ritonavir monotherapy clinical trials have been designed as single-arm studies. This design does not allow us to compare the rate of neuropsychiatric adverse events between atazanavir/ritonavir monotherapy and triple-drug HAART based on atazanavir/ritonavir. Neuropsychiatric adverse events in atazanavir/ritonavir monotherapy trials were low (Table 2).

Lopinavir/ritonavir

In the OK04 trial,⁴ patients randomized to receive lopinavir/ritonavir monotherapy did not have an increased incidence of neuropsychiatric events after 2 years of follow-up. A case of neurocognitive impairment associated with HIV virological failure in plasma was described in a single patient included in a single-arm trial of lopinavir/ritonavir monotherapy in Brazil after a year of follow-up.⁴⁶ Neurological recovery was observed after the patient regained suppression after adding two nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs). A CSF assessment returned normal results. Unfortunately, the CSF viral load was not available. Transient areas of cerebral hypoperfusion were detected in a scintigraphy with ^{99m}Tc-ECD.

In the MOST trial,⁴⁰ four of the six patients in the monotherapy arm with virological failure in plasma presented with neurological symptoms as part of an acute retroviral syndrome. Interestingly, in the MOST study changes in neuropsychological test results did not differ between patients receiving triple-drug HAART or lopinavir/ritonavir monotherapy, or between patients who had detectable HIV RNA in CSF versus those with suppressed RNA in CSF. Neurological symptoms after loss of virological

suppression have not been reported in other bPI monotherapy trials or trials evaluating the interruption of triple-drug HAART.⁴⁷

Darunavir/ritonavir

The MONOI⁴⁴ and MONET⁴⁸ trial patients randomized to receive darunavir/ritonavir as bPI monotherapy had a similar incidence of neuropsychiatric events after 2 years of follow-up when compared with patients receiving triple-drug HAART. In the MONOI trial, two patients in the monotherapy arm presented with neurological symptoms (one case of unusual headaches in a woman and one case of seizures in a known epileptic patient) with low levels of viral load in the CSF (HIV RNA 330 and 580 copies/mL). The addition of abacavir and lamivudine to darunavir/ritonavir in the two patients led to an improvement in clinical symptoms and a decrease in the CSF viral load to the lower limit of quantification (<200 copies/mL).

The MONET study included a memory and concentration self-scored assessment as a part of the Functional Assessment of HIV Infection (FAHI) quality of life questionnaire.⁴⁹ Results of this self-scored questionnaire were used to evaluate cognitive functioning, clarity of thought, memory and ability to concentrate. Of the 206 patients who completed the FAHI questionnaire at weeks 0, 24 and 48, there were no differences at baseline or week 48 between patients included in the bPI monotherapy arm or in the triple-drug HAART arm (Table 2).

The MONET study also included a small substudy in which six patients underwent computerized neurocognitive assessment (CogStateTM) and cerebral proton magnetic resonance spectroscopy.⁵⁰ Three patients in the monotherapy arm and two in the triple-drug arm completed all procedures. An improvement in neurocognitive performance tests was observed in both treatment groups after 48 weeks of follow-up, without differences between groups. Improvements in brain inflammatory markers (choline and myo-inositol) but not in neuronal integrity markers [N-acetyl aspartate (NAA)] were observed in all patients after follow-up, without differences between groups. The absence of differences between groups could be related to the small number of patients included in the study. The decrease in the inflammatory markers after darunavir/ritonavir was started either as bPI monotherapy or as part of triple-drug therapy could be related to a better CPE score of darunavir/ritonavir compared with the PI used previously (atazanavir/ritonavir and saquinavir/ritonavir).

The other side of the coin: possible CNS toxicity of NRTIs

While the concern about the capacity of bPI monotherapy to suppress HIV replication in the CNS has been frequently postulated as a limitation before this strategy becomes more generally used, the potential benefit of removing NRTI toxicity in the CNS has not usually been taken into account.

There are two studies suggesting that HAART including drugs with good CNS penetration might be associated with worse neurocognitive function. Recently, the ACTG 5170 study⁴⁷ reported that neuropsychological tests improved for up to 96 weeks in a group of treated patients with preserved immune function after HAART interruption. These results raise the possibility that

all or some of the antiretroviral drugs may have a negative effect on neuropsychological function. Marra *et al.*²² performed a study in 101 patients to determine whether antiretroviral regimens with good CNS penetration give better control of HIV replication in CSF and improve cognition. Marra *et al.* reported that, as expected, regimens with a higher CPE score achieved better control of CSF HIV replication. Surprisingly, these regimens with good CNS penetration were associated with poorer neurocognitive performance. Although it is true that other studies^{9,19-21} have established a correlation between triple-drug therapy with high CPE scores and better neurocognitive function, the ACTG 5170 and Marra *et al.* studies cast some doubts about the general principle that better CNS penetration and higher CPE scores imply better neurocognitive functioning.

A number of NRTIs, such as stavudine or didanosine, might induce a negative effect on brain tissue by causing mitochondrial toxicity. In 18 HIV-infected patients who were analysed by magnetic resonance spectroscopy, stavudine and didanosine were associated with a reduction in NAA, which is a marker sensitive to alterations in mitochondrial integrity.⁵¹ Lower levels of NAA were also observed in patients receiving zidovudine plus lamivudine or in untreated patients compared with non-HIV subjects.

Neuronal toxicity has been tested *in vitro* for antiretroviral drugs.⁵² In one study of neuronal cultures, the addition of any of 15 antiretroviral drugs (NRTIs, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, PIs and maraviroc) was associated with neuronal lesion and destruction. Of note, doses of abacavir, didanosine, etravirine and nevirapine that are considered neurotoxic fell within the range of CSF concentrations seen in patients receiving antiretroviral therapy. It is possible that the penetration of some antiretroviral drugs into the brain at concentrations sufficient to suppress HIV replication would carry some risk of neuronal damage. If this risk is relevant, then the use of bPI monotherapy would probably reduce the neuronal toxicity associated with triple-drug antiretroviral therapy.

Conclusions

The current evidence is insufficient to conclude whether, compared with triple-drug HAART, bPI monotherapy entails a higher risk of discordant CSF HIV replication and worse neurocognitive performance.

The existence of HIV active replication in the CSF while HIV replication is suppressed in plasma (CSF viral escape) is not exclusive to bPI monotherapy. Discordant replication in the CSF in patients who are suppressed in the blood has been reported in patients receiving triple therapy (Table 1). At present, we lack comparative data to conclude if the risk of discordant CSF HIV replication is higher in patients treated with bPI monotherapy than in patients receiving triple-drug HAART.

Current evidence does not suggest that bPI monotherapy with lopinavir/ritonavir or darunavir/ritonavir is associated with worse neurocognitive outcomes than triple-drug HAART. However, it should be noted that this issue cannot be definitively solved until we have available results of detailed neuropsychological testing in clinical trials comparing bPI monotherapy and triple-drug HAART. An ongoing study, the PIVOT clinical trial,⁵³ will be the first study where neurocognitive performance will be compared between bPI monotherapy and triple-drug HAART

Review

as a secondary endpoint using more detailed neurocognitive testing. Other ongoing prospective studies are designed to compare neurocognitive performance between bPI monotherapy and triple-drug HAART. The results of these studies will be available in the following years.⁵⁴

Lopinavir/ritonavir and darunavir/ritonavir used as bPI monotherapy achieve concentrations in the CSF that are sufficient to suppress CSF HIV replication in adherent patients not harbouring PI-resistant isolates. The evidence that atazanavir/ritonavir as bPI monotherapy achieve sufficient concentrations in the CSF to ensure CSF HIV suppression appears more questionable. In patients fully suppressed in plasma, the risk of neuropsychiatric events assessed as adverse events in clinical trials with lopinavir/ritonavir or darunavir/ritonavir bPI monotherapy is low and similar to the risk of these adverse events observed with triple-drug HAART including lopinavir/ritonavir or darunavir/ritonavir.

We suggest that when detailed neurocognitive testing and virological suppression data obtained from patients treated with bPI monotherapy are available, these data would have to be taken into account for new revisions of the CPE score. In the future, the results of detailed neuropsychological testing, rates of suppression of HIV replication in the CSF and the possible neurotoxic effects of antiretrovirals would be important outcomes to capture in studies designed to compare triple-drug HAART, bPI monotherapy and other NRTI-sparing strategies. These data would be essential to establish if different therapeutic strategies are equally protective of the deleterious effects of HIV infection in the brain.

Funding

This work was supported by a 'Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS)' grant from the Spanish Ministry of Health, FIS PI10/00483. I. P.-V. is supported by a grant from the FIS Rio Hortega programme (CM09/00228) and J. R. A. is an investigator from the 'Programa de Intensificación de la Actividad Investigadora en el SNS' (I3SNS).

Transparency declarations

I. P.-V.—advisory fees and speaker fees from Janssen, Abbott, BMS, Gilead and MSD. C. B.—advisory fees and speaker fees from Abbott and Janssen. J. R. A.—advisory fees, speaker fees and grant support from Tibotec, Janssen, Abbott, BMS, Gilead, MSD and Viiv. I. C. and A. G.: none to declare.

References

- 1 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. www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf (23 March 2011, date last accessed).
- 2 Bierman WF, van Agtmael MA, Nijhuis M et al. HIV monotherapy with ritonavir-boosted protease inhibitors: a systematic review. *AIDS* 2009; **23**: 279–91.
- 3 Perez-Valero I, Arribas JR. Protease inhibitor monotherapy. *Curr Opin Infect Dis* 2011; **24**: 7–11.
- 4 Arribas JR, Delgado R, Arranz A et al. Lopinavir–ritonavir monotherapy versus lopinavir–ritonavir and 2 nucleosides for maintenance therapy of HIV: 96-week analysis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009; **51**: 147–52.

5 Arribas JR, Horban A, Gerstoft J et al. The MONET trial: darunavir/ritonavir with or without nucleoside analogues, for patients with HIV RNA below 50 copies/mL. *AIDS* 2010; **24**: 223–30.

6 Escobar Rodríguez I, Esteban Alba C. [Pharmacoeconomic aspects of lopinavir/ritonavir monotherapy]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008; **26** Suppl 16: 47–51.

7 Antinori A, Arendt G, Becker JT et al. Updated research nosology for HIV-associated neurocognitive disorders. *Neurology* 2007; **69**: 1789–99.

8 Heaton R, Franklin D, Ellis R et al. Increased prevalence of HIV neurocognitive impairment among non-AIDS cases in the post-CART versus pre-CART era. In: *Abstracts of the Eighteenth International AIDS Conference, Vienna, 2010*. Abstract THPDB106. http://www.aids2010.org/WebContent/File/AIDS2010_Abstracts_Vol_2_Thursday_22July_web.pdf (24 May 2011, date last accessed).

9 Letendre S, McClernon D, Ellis R et al. Persistent HIV in the central nervous system during treatment is associated with worse antiretroviral therapy penetration and cognitive impairment. In: *Abstracts of the Sixteenth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Montreal, 2009*. Abstract 484b. Foundation for Retrovirology and Human Health, Alexandria, VA, USA.

10 Kaul M, Garden GA, Lipton SA. Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature* 2001; **410**: 988–94.

11 Heaton RK, Clifford DB, Franklin DR Jr et al. HIV-associated neurocognitive disorders persist in the era of potent antiretroviral therapy: CHARTER Study. *Neurology* 2010; **75**: 2087–96.

12 Sacktor N. The epidemiology of human immunodeficiency virus-associated neurological disease in the era of highly active antiretroviral therapy. *J Neurovirol* 2002; **8** Suppl 2: 115–21.

13 Ellis R, Heaton R, Letendre S et al. Higher CD4 nadir is associated with reduced rates of HIV-associated neurocognitive disorders in the CHARTER study: potential implications for early treatment initiation. In: *Abstracts of the Seventeenth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, San Francisco, CA, 2010*. Abstract 429. Foundation for Retrovirology and Human Health, Alexandria, VA, USA.

14 Price RW. The two faces of HIV infection of cerebrospinal fluid. *Trends Microbiol* 2000; **8**: 387–90.

15 Schnell G, Joseph S, Spudich S et al. HIV-1 infection of the brain. In: *Abstracts of the Eighteenth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, MA, 2011*. Abstract 429. Foundation for Retrovirology and Human Health, Alexandria, VA, USA.

16 Varatharajan L, Thomas SA. The transport of anti-HIV drugs across blood–CNS interfaces: summary of current knowledge and recommendations for further research. *Antiviral Res* 2009; **82**: A99–109.

17 McArthur JC, McClernon DR, Cronin MF et al. Relationship between human immunodeficiency virus-associated dementia and viral load in cerebrospinal fluid and brain. *Ann Neurol* 1997; **42**: 689–98.

18 Letendre S, Marquie-Beck J, Capparelli E et al. Validation of the CNS penetration-effectiveness rank for quantifying antiretroviral penetration into the central nervous system. *Arch Neurol* 2008; **65**: 65–70.

19 Cysique LA, Vaida F, Letendre S et al. Dynamics of cognitive change in impaired HIV-positive patients initiating antiretroviral therapy. *Neurology* 2009; **73**: 342–8.

20 Tozzi V, Balestra P, Salvatori MF et al. Changes in cognition during antiretroviral therapy: comparison of 2 different ranking systems to measure antiretroviral drug efficacy on HIV-associated neurocognitive disorders. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009; **52**: 56–63.

21 Smurzynski M, Wu K, Letendre S et al. Effects of central nervous system antiretroviral penetration on cognitive functioning in the ALLRT cohort. *AIDS* 2011; **25**: 357–65.

- 22** Marra CM, Zhao Y, Clifford DB et al. Impact of combination antiretroviral therapy on cerebrospinal fluid HIV RNA and neurocognitive performance. *AIDS* 2009; **23**: 1359–66.
- 23** Letendre S, Ellis R, Deutsch R et al. Correlates of time-to-loss-of-viral-response in CSF and plasma in the CHARTER cohort. In: *Abstracts of the Seventeenth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, San Francisco, CA, 2010*. Abstract 430. Foundation for Retrovirology and Human Health, Alexandria, VA, USA.
- 24** Antinori A, Lorenzini P, Giancola ML et al. Antiretroviral CPE 2010 ranking predicts CSF viral suppression only in patients with undetectable HIV-1 RNA in plasma. In: *Abstracts of the Eighteenth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, MA, 2011*. Abstract 426. Foundation for Retrovirology and Human Health, Alexandria, VA, USA.
- 25** Canestri A, Lescuré FX, Jaureguiberry S et al. Discordance between cerebral spinal fluid and plasma HIV replication in patients with neurological symptoms who are receiving suppressive antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2010; **50**: 773–8.
- 26** Eden A, Fuchs D, Hagberg L et al. HIV-1 viral escape in cerebrospinal fluid of subjects on suppressive antiretroviral treatment. *J Infect Dis* 2010; **202**: 1819–25.
- 27** Harrington PR, Haas DW, Ritola K et al. Compartmentalized human immunodeficiency virus type 1 present in cerebrospinal fluid is produced by short-lived cells. *J Virol* 2005; **79**: 7959–66.
- 28** Strazielle N, Khuth ST, Ghersi-Egea JF. Detoxification systems, passive and specific transport for drugs at the blood–CSF barrier in normal and pathological situations. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; **56**: 1717–40.
- 29** Abbott Laboratories. *Kaletra SPC*. www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000368/WC500039043.pdf (4 April 2011, date last accessed).
- 30** Randall D, Agarwala S, Mummaneni V et al. Tissue compartment concentrations of atazanavir in cerebrospinal fluid, seminal fluid and plasma in HIV+ subjects. In: *Abstracts of the Forty-second Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Diego, CA, 2002*. Abstract H-1711. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.
- 31** Yilmaz A, Izadkhashti A, Price RW et al. Darunavir concentrations in cerebrospinal fluid and blood in HIV-1-infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009; **25**: 457–61.
- 32** Copporelli EV, Holland D, Okamoto C et al. Lopinavir concentrations in cerebrospinal fluid exceed the 50% inhibitory concentration for HIV. *AIDS* 2005; **19**: 949–52.
- 33** Vernazza P, Daneel S, Schiffer V et al. The role of compartment penetration in PI-monotherapy: the atazanavir–ritonavir monomaintenance (ATARITMO) trial. *AIDS* 2007; **21**: 1309–15.
- 34** Best BM, Letendre SL, Brigid E et al. Low atazanavir concentrations in cerebrospinal fluid. *AIDS* 2009; **23**: 83–7.
- 35** De Meyer S, Azijn H, Surleraux D et al. TMC114, a novel human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor active against protease inhibitor-resistant viruses, including a broad range of clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 2314–21.
- 36** Drusano GL, Bilello JA, Preston SL et al. Hollow-fiber unit evaluation of a new human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor, BMS-232632, for determination of the linked pharmacodynamic variable. *J Infect Dis* 2001; **183**: 1126–9.
- 37** Yilmaz A, Stähle L, Hagberg L et al. Cerebrospinal fluid and plasma HIV-1 RNA levels and lopinavir concentrations following lopinavir/ritonavir regimen. *Scand J Infect Dis* 2004; **36**: 823–8.
- 38** Letendre SL, van den Brande G, Hermes A et al. Lopinavir with ritonavir reduces the HIV RNA level in cerebrospinal fluid. *Clin Infect Dis* 2007; **45**: 1511–7.
- 39** Yeh RF, Letendre S, Novak IS et al. Single agent therapy with lopinavir/ritonavir controls HIV-1 replication in the central nervous system. In: *Abstracts of the Fourteenth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Los Angeles, CA, 2007*. Abstract 381. Foundation for Retrovirology and Human Health, Alexandria, VA, USA.
- 40** Gutmann C, Cusini A, Gunthard H et al. Randomized controlled study demonstrating failure of LPV/r monotherapy in HIV: the role of compartment and CD4–nadir. *AIDS* 2010; **24**: 2347–54.
- 41** Yilmaz A, Izadkhashti A, Price RW et al. Darunavir concentrations in cerebrospinal fluid and blood in HIV-1-infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009; **25**: 457–61.
- 42** Letendre S, Rossi S, Best B et al. Darunavir concentrations in CSF exceed the median inhibitory concentration. In: *Abstracts of the Forty-ninth Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, CA, 2009*. Abstract A1-1312. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.
- 43** Best B, Letendre S, Croteau D et al. Therapeutic DRV and ETR concentrations in cerebrospinal fluid. In: *Abstracts of the Eighteenth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, MA, 2011*. Abstract 643. Foundation for Retrovirology and Human Health, Alexandria, VA, USA.
- 44** Valantin MA, Duvivier C, Lambert S et al. Long-term efficacy of darunavir/ritonavir monotherapy in patients with HIV-1 viral suppression in the MONOI-ANRS 136 study: results at 96 weeks. In: *Abstracts of the Eighteenth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, MA, 2011*. Abstract 534. Foundation for Retrovirology and Human Health, Alexandria, VA, USA.
- 45** Saumoy M, Tiraboschi J, Gutierrez M et al. Viral response in plasma and reservoirs in stable patients receiving fosamprenavir/ritonavir monotherapy (the FONT Study). *HIV Med* 2011; in press.
- 46** Sprinz E, Bay MB, Lazzaretti RK et al. Lopinavir/ritonavir monotherapy as maintenance treatment in HIV-infected individuals with virological suppression: results from a pilot study in Brazil. *HIV Med* 2008; **9**: 270–6.
- 47** Robertson KR, Su Z, Margolis DM et al. Neurocognitive effects of treatment interruption in stable HIV-positive patients in an observational cohort. *Neurology* 2010; **74**: 1260–6.
- 48** Rieger A, Banhegyi D, Schmidt W et al. The MONET trial 96 week analysis: darunavir/ritonavir monotherapy versus DRV/r+2NRTIs, for patients with HIV RNA <50 copies/mL at baseline <50 copies/mL at baseline. In: *Abstracts of the Eighteenth International AIDS Conference, Vienna, 2010*. Abstract THLB209. http://www.aids2010.org/WebContent/File/AIDS2010_Abstracts_Vol_2_Thursday_22July_web.pdf (24 May 2011, date last accessed).
- 49** Winston A, Fätkenheuer G, Arribas J et al. Neuropsychiatric adverse events with ritonavir-boosted darunavir monotherapy in HIV-infected individuals: a randomised prospective study. *HIV Clin Trials* 2010; **11**: 163–9.
- 50** Garvey L, Higgs C, Mohammed P et al. Changes in cerebral function parameters in HIV type 1-infected subjects switching to darunavir/ritonavir either as monotherapy or with nucleoside analogues. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2011; doi:10.1089/aid.2010.0290.
- 51** Schweinsburg BC, Taylor MJ, Althauson OM et al. Brain mitochondrial injury in human immunodeficiency virus-seropositive (HIV+) individuals taking nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *J Neurovirol* 2005; **11**: 356–64.
- 52** Liner J, Meeker RB, Robertson K. CNS toxicity of antiretroviral drugs. In: *Abstracts of the Seventeenth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, San Francisco, CA, 2010*. Abstract 435. Foundation for Retrovirology and Human Health, Alexandria, VA, USA.

Review

- 53** Paton N *et al.* A randomized controlled trial of a strategy of switching to boosted protease inhibitor monotherapy versus continuing combination antiretroviral therapy for the long-term management of HIV-1 infected patients who have achieved sustained virological suppression on highly-active antiretroviral therapy. ISRCTN04857074. <http://controlled-trials.com/ISRCTN04857074/pivot> (5 April 2011, date last accessed).
- 54** Clotet B, Gomez JL. Clinical study to evaluate the efficacy and safety of lopinavir/ritonavir monotherapy versus darunavir/ritonavir monotherapies as simplification switching strategies of PI/NNRTI-triple therapy based-regimens. NCT00994344. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00994344?term=darunavir+monotherapy&rank=1> (5 April 2011, date last accessed).
- 55** Letendre S, FitzSimons C, Ellis R *et al.* Correlates of CSF viral loads in 1221 volunteers of the CHARTER cohort. In: *Abstracts of the Seventeenth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, San Francisco, CA, 2010*. Abstract 172. Foundation for Retrovirology and Human Health, Alexandria, VA, USA.
- 56** Yilmaz A, Price R, Spudich S *et al.* Persistent intrathecal immune activation in HIV-1-infected individuals on antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008; **47**: 168-73.
- 57** Pulido F, Serrano O, Rivero A *et al.* Atazanavir/ritonavir monotherapy for maintenance of virologic suppression: 48-week primary analysis of the 96-week multicentre, open-label, single-arm, pilot OREY study. In: *Abstracts of the Twelfth European AIDS Conference, Cologne, 2009*. Abstract PS4/6.

Neurocognitive Impairment in Patients Treated with Protease Inhibitor Monotherapy or Triple Drug Antiretroviral Therapy

Ignacio Pérez-Valero^{1*}, Alicia González-Baeza¹, Miriam Estébanez¹, María L. Montes-Ramírez¹, Carmen Bayón², Federico Pulido³, José I. Bernardino¹, Francisco X. Zamora¹, Susana Monge⁴, Francisco Gaya¹, María Lagarde³, Rafael Rubio³, Asunción Hernando⁵, Francisco Arnalich¹, José R. Arribas¹

1 HIV Unit-Internal Medicine Service, Hospital Universitario La Paz-IdiPAZ, Madrid, Madrid, Spain, **2** Psychiatry Service, Hospital Universitario La Paz-IdiPAZ, Madrid, Madrid, Spain, **3** HIV Unit-Internal Medicine Service, Hospital Universitario 12 de Octubre-Idi12, Madrid, Madrid, Spain, **4** Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Madrid, Spain, **5** Departamento de Especialidades Médicas, Universidad Europea de Madrid, Madrid, Madrid, Spain

Abstract

Background: In patients who remain virologically suppressed in plasma with triple-drug ART a switch to protease inhibitor monotherapy maintains high rates of suppression; however it is unknown if protease inhibitor monotherapy is associated to a higher rate of neurocognitive impairment.

Methods: In this observational, cross-sectional study we included patients with plasma virological suppression (≥ 1 year) without concomitant major neurocognitive confounders, currently receiving for ≥ 1 year boosted lopinavir or darunavir as monotherapy or as triple ART. Neurocognitive impairment was defined as per the 2007 consensus of the American Association of Neurology. The association between neurocognitive impairment and protease inhibitor monotherapy, adjusted by significant confounders, was analysed.

Results: Of the 191 included patients - triple therapy: 96, 1–2 years of monotherapy: 40 and > 2 years of monotherapy: 55 - proportions (95% CI) with neurocognitive impairment were: overall, 27.2% (20.9–33.6); triple therapy, 31.6% (22.1–41.0); short-term monotherapy, 25.0% (11.3–38.7); long-term monotherapy: 21.4% (10.5–32.3); $p=0.38$. In all groups, neurocognitive impairment was mildly symptomatic or asymptomatic by self-report. There were not significant differences in Global Deficit Score by group. In the regression model confounding variables for neurocognitive impairment were years on ART, ethnicity, years of education, transmission category and the HOMA index. Adjusted by these variables the Odds Ratio (95% CI) for neurocognitive impairment of patients receiving short-term monotherapy was 0.85 (0.29–2.50) and for long-term monotherapy 0.40 (0.14–1.15).

Conclusions: Compared to triple drug antiretroviral therapy, monotherapy with lopinavir/ritonavir or darunavir/ritonavir in patients with adequate plasma suppression was not associated with a higher rate of asymptomatic neurocognitive impairment than triple drug ART.

Citation: Pérez-Valero I, González-Baeza A, Estébanez M, Montes-Ramírez ML, Bayón C, et al. (2013) Neurocognitive Impairment in Patients Treated with Protease Inhibitor Monotherapy or Triple Drug Antiretroviral Therapy. PLoS ONE 8(7): e69493. doi:10.1371/journal.pone.0069493

Editor: Nicolas Sluis-Cremer, University of Pittsburgh, United States of America

Received: March 26, 2013; **Accepted:** June 10, 2013; **Published:** July 25, 2013

Copyright: © 2013 Pérez-Valero et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grant PI10/00483, Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III. Dr I. Pérez-Valero, Dr. M. Estébanez, Dr. F.X. Zamora and S. Monge are supported by Río Hortega fellowships financed by Fondo de Investigaciones Sanitarias. Dr. M. Lagarde is supported by a fellowship financed by Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (i+12). Dr. J.R. Arribas is an investigator from the Programa de Intensificación de la Actividad Investigadora en el SNS (I3SNS). IdiPAZ AIDS and infectious diseases investigator group is partially supported by "Red de Investigación en SIDA" (AIDS Research Network) (RIS) RD07/0006/2007. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: Dr. I Pérez-Valero: advisory fees, speaker fees Viiv, Janssen, BMS, Gilead, MSD; Dr. M Estébanez: advisory fees, speaker fees Viiv, Janssen, BMS, Gilead, MSD; Dr. ML Montes-Ramírez: advisory fees, speaker fees Viiv, Janssen, BMS, Gilead; Dr. F Pulido: advisory fees, speaker fees Viiv, Tibotec, Janssen, Abbott, BMS, Gilead, MSD; Dr. JI Bernardino: advisory fees, speaker fees Viiv, Janssen, Abbott, BMS, Gilead, MSD; Dr. FX Zamora: advisory fees, speaker fees Viiv, Janssen, BMS, Gilead; Dr. R Rubio: advisory fees, speaker fees Viiv, Tibotec, Janssen, Abbott, BMS, Gilead, MSD; Dr. JR Arribas: advisory fees, speaker fees and grant support: Viiv, Tibotec, Janssen, Abbott, BMS, Gilead, MSD. The rest of authors: no conflict of interest. These conflicts do not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: iperez.hulp@salud.madrid.org

Introduction

Antiretroviral therapy (ART) prevents severe HIV-associated neurocognitive disorders (HAND). However milder forms of HAND are still prevalent despite widespread use of ART [1].

Suboptimal ART penetration into the central nervous system could theoretically be the cause of the remaining high prevalence of milder forms of HAND.

In patients with tolerability issues, who remain virologically suppressed with triple-drug ART for at least six months, a switch

to protease inhibitor monotherapy with lopinavir or darunavir is an effective alternative in the majority of patients [2,3,4,5]. Despite these results, protease inhibitor monotherapy is a controversial strategy [6] not recommended by all expert guidelines. The 2012 recommendations of the International Antiviral Society–USA panel mention concern about poor central nervous system penetration as one of the reasons for not recommending protease inhibitor monotherapy [7].

Concerns about higher risk of neurocognitive impairment in patients receiving protease inhibitor monotherapy are based on its perceived low CNS penetration and effectiveness (CPE) score [8], not in the results of clinical trials or cohort studies. It should be noted that the CPE score has not been validated for protease inhibitor monotherapy. The largest clinical trials of protease inhibitor monotherapy have not included detailed neurocognitive testing [9]. Small studies including neurocognitive assessment have not found an association between protease inhibitor monotherapy and higher rates of neurocognitive impairment [10,11]. Indirect data of neurological damage such as higher levels of biomarkers in patients on monotherapy have been reported [12].

There is clearly a need for more empirical data about the risk of neurocognitive impairment in patients receiving protease inhibitor monotherapy. To investigate if protease inhibitor monotherapy is associated with higher rates of neurocognitive impairment we have evaluated neurocognitive function in 191 virologically suppressed patients receiving protease inhibitors as monotherapy or as triple-drug ART.

Patients and Methods

Study design and setting

This cross-sectional study compared the prevalence of neurocognitive impairment in virologically suppressed patients on triple-drug ART (two nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitor plus a protease inhibitor) versus protease inhibitor monotherapy. The study was conducted from April 2011 to June 2012 at the HIV Units of La Paz and the Doce de Octubre Hospitals in Madrid, Spain. All participants completed a comprehensive neurocognitive test battery, medical assessment and phlebotomy at the same visit.

Patients

All HIV-1 infected patients aged 18 years or over with at least one year of virological suppression while receiving lopinavir/ritonavir or darunavir/ritonavir as monotherapy or with two nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitor (triple therapy) were selected as study candidates. Virologic suppression was defined as two measurements of plasma HIV-1 RNA below 50 copies/mL separated by at least one year. A single virologic rebound of 50–500 HIV-RNA copies/ml (single blip) was allowed in the year prior to the inclusion.

Exclusion criteria were: presence of active central nervous system opportunistic disease, neuromuscular disease which could limit the performance of neurocognitive testing, use of psychiatric medications that may interfere with results of the neurocognitive evaluation, substance abuse during the previous three months, alcohol abuse during the six previous months and diagnosis of psychotic disorders according to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Health Disorders (DSM-IV-TR).

Patients who were receiving triple therapy at inclusion, but had previously received protease inhibitor monotherapy for at least one year were also excluded. Reasons for stopping monotherapy in these patients are reported in table S1.

The study was systematically offered to all patients who fulfilled all the inclusion and none of the exclusion criteria. Criteria used for recruiting were identical for patients receiving monotherapy or triple therapy. Recruitment flow-chart is reported as figure S1.

Ethics Statement

This study and its procedures were conducted according with the principles expressed in the Declaration of Helsinki. The local Ethics Committees for Clinical Research of each participant hospital - “Comite Etico de Investigación Clínica del Hospital Universitario La Paz de Madrid & Comite Etico de Investigación Clínica del Hospital Universitario Doce de Octubre de Madrid - and the Institutional review boards of both hospitals - Comision de Investigacion del Hospital Universitario La Paz de Madrid & Comision de Investigacion del Hospital Universitario Doce de Octubre de Madrid - approved the protocol and all the above procedures. All participants provided written informed consent.

Neurobehavioral and Psychiatric examination

All participants completed the HADS-D (Hospital Anxiety and Depression Scale) [13] questionnaire during the screening visit. Patients who scored ≥ 8 in the depression subscale (HADS-D) were interviewed by one psychologist with experience in conducting structured interviews to generate a DSM-IV-TR diagnosis of major depression. Subjects with current major depression were excluded but could be subsequently enrolled if they achieved clinical remission after six months of antidepressive treatment.

A psychologist blinded to treatment group evaluated all participants. Following the American Association of Neurology consensus [14] neurocognitive testing included a battery of 14 tests, covering 7 cognitive domains (Table S2). To estimate the premorbid neurocognitive performance participants completed the Wechsler Adult Intelligence Scale (WAIS-III) Vocabulary test. The best available normative standards for the Spanish population were used, which correct for effects of age, gender, and education.

Raw tests scores were converted to demographically corrected standard scores (z scores), by a computerized application. The Z scores for each of the neurocognitive domains assessed were calculated as the mean of the two tests used to evaluate each domain. Neurocognitive impairment was defined as “acquired impairment in cognitive functioning, involving at least two ability domains, documented by performance of at least 1 SD below the mean for age-education-appropriate norms on standardized neuropsychological tests” [14]. Daily functional performance was assessed by self-report questions related to cognitive abilities and general functioning. Neurocognitive performance was quantified using the Global Deficit Score (GDS) [15].

Data collection

Socio-demographical data including educational level and use of alcohol/illicit drugs, medical history (general and HIV infection), adherence determined by self-reported missed doses in the last 30 days, use of ART and other prescribed medications were obtained by self-report questionnaires and from clinical and laboratory records.

Fasting blood plasma samples were collected and levels of glucose, cholesterol (total, low-, and high-density lipoprotein), triglycerides, and insulin were measured using standard methods in the sites’ certified clinical laboratories. Insulin resistance was calculated using the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) formula: (insulin in $\mu\text{U/ml}$ \times glucose in mmol/L)/22.5. Current CD4 cell count and HIV-1 viral load were determined, respectively, using flow cytometry and automated RNA extraction in an AmpliPrep instrument (Roche

Diagnostics, Mannheim, Germany) followed by quantification using the COBAS AMPLICOR MONITOR HIV-1 test version 1.5 (Roche Diagnostic Systems, Branchburg, NJ).

Comorbidities previously associated with neurocognitive impairment were classified in three categories: medical comorbidities (hypertension, dyslipidaemia, diabetes mellitus, ischemic heart disease, heart failure, chronic renal failure, thyroid disorders and peripheral arterial disease); neurological comorbidities (history of central nervous system infection, stroke, cerebral trauma and epilepsy) and psychiatric comorbidities (history of past mood disorders and current or past anxiety disorders). We categorized hepatitis C infection as no infection, past infection (spontaneous viral clearance or successfully treated) and active infection (detectable HCV plasma viremia).

We categorized monotherapy as short-term (S-MT) -less than two years- and long-term (L-MT)-more than two years- and calculated the CPE for each ART regimens according to the 2010 version [16].

Statistical Methods

Sample characteristics were described using absolute and relative frequencies for categorical variables and means \pm SD or median (IQR) for continuous variables. Chi-square test and Student's t or the nonparametric Mann-Whitney U-test was used to compare baseline characteristics. Association between neurocognitive impairment and type of ART (S-MT and L-MT monotherapy or triple therapy) was analysed. A multivariate logistic regression with an estimative approach was fitted with presence versus absence of neurocognitive impairment as the dependent variable. Reference category for type of ART was triple therapy and odds ratios (ORs) for presence of neurocognitive impairment in patients receiving monotherapy were obtained. We evaluated as potential confounders: age, sex, ethnicity, risk group for HIV transmission, years on ART, years with suppressed HIV viremia, prior single blip, CD4 count (current and nadir), years of

education, use of non-prescribed drugs, presence of medical, neurological or psychiatric comorbidities, co-infection with hepatitis C, use of statin, triglycerides, total cholesterol/HDL ratio and HOMA-IR. Variables producing a change greater than 15% in the OR of interest were retained in the model. All analyses were performed using the STATA statistical package (V.11.1, Stata Corporation, College Station, Texas, USA). All tests were 2-sided, p values <0.05 were considered significant.

Results

Study Population

We identified 417 potential study candidates (Figure S1). We finally recruited 196 subjects. Two patients on monotherapy and three on triple therapy were excluded due to HIV-1 RNA above 50 copies/ml at the initial study visit. Finally we included 191 patients 95 (48%) in the triple therapy group, 40 (20.2%) in the S-MT group and 56 (28.3%) in the L-MT group (Tables 1 and 2).

Patients in the monotherapy groups were slightly older ($p = 0.04$ for S-MT and $p < 0.01$ for L-MT) and more frequently Caucasians ($p < 0.01$ for S-MT). They were infected earlier ($p < 0.01$ for S-MT), had higher current ($p < 0.05$ for S-MT) and CD4 nadirs ($p < 0.05$ for S-MT), were suppressed for a longer time ($p < 0.01$ for L-MT), were less likely to present blips ($p < 0.01$ for S-MT) and received ART for a longer time ($p < 0.01$ for S-MT and $p < 0.05$ for L-MT). Patients receiving monotherapy had a worse metabolic profile: triglycerides ($p < 0.05$ for L-MT), cholesterol/HDL ratio and the HOMA index ($p < 0.05$ for L-MT) were higher.

We also found the following differences between monotherapy groups: Patients on the S-MT group had a longer duration of the HIV infection ($p < 0.01$), were previously treated with triple therapy longer ($p < 0.01$), were receiving more frequently darunavir/ritonavir ($p < 0.05$) and had higher rates of active HCV coinfection ($p < 0.05$).

Table 1. Demographics infection risk, education and HIV disease status.

	TT N = 95	S-MT (1-2 years) N = 40	L-MT (>2 years) N = 56	p < 0.05
Male. N (%)	70 (73.7)	29 (72.5)	41 (73.2)	
Age. Median (IQR)	44.7 (40.6–48.4)	47.3 (44.8–49.1)	47.7 (44.9–52.7)	S-MT, L-MT vs. TT
Ethnicity. N (%)				
Caucasian	79 (83.2)	40 (100.0)	52 (92.9)	S-MT vs. TT
Other	16 (16.8)	0 (0.0)	4 (7.1)	
Way of transmission. N (%)				
Men who have sex with men	29 (30.5)	9 (22.5)	21 (37.5)	
Men who have sex with women	30 (31.6)	9 (22.5)	16 (28.6)	
Intravenous drug user	30 (31.6)	17 (42.5)	17 (30.4)	
Other	6 (6.3)	5 (12.5)	2 (3.6)	
Years of education. Mean (SD)	11.3 (4.1)	10.4 (4.4)	10.3 (4.5)	
AIDS. N (%)	60 (63.2)	23 (59.0)	36 (64.3)	
Years infected with HIV. Median (IQR)	15.1 (7.2–19.9)	20.2 (14.8–23.4)	15.7 (12.0–19.3)	S-MT vs. TT, L-MT
CD4 nadir (c/mm3). Median (IQR)	153 (49–255)	188 (96–350)	180.5 (57–238)	S-MT vs. TT
Current CD4 (cells/mm3). Median (IQR)	560 (440–754)	669.5 (499.5–962)	617.5 (463.5–815)	S-MT vs. TT
Years virologically suppressed. Median (IQR)	4.8 (2.9–8.9)	7.2 (3.3–9.2)	7.8 (5.4–10.7)	L-MT vs. TT
Prior blip. N (%)	20 (21.1)	5 (12.5)	9 (16.1)	S-MT vs. TT

TT = Triple therapy. S-MT = Short-term Monotherapy. L-MT = Long-term Monotherapy. NA = not applicable.
doi:10.1371/journal.pone.0069493.t001

Table 2. Treatment characteristics and comorbid conditions.

	TT N=95	S-MT (1-2 years) N=40	L-MT (>2 years) N=56	p<0.05
Years of antiretroviral therapy. Median (IQR)				
Total	10.7 (4.8–15.7)	14.9 (11.0–16.6)	13.4 (10.0–15.0)	S-MT, L-MT vs. TT
Triple Therapy	10.7 (4.8–15.7)	13.2 (9.5–15.4)	9.9 (5.2–11.7)	S-MT vs. L-MT
Monotherapy	NA	1.5 (1.2–1.8)	3.0 (2.6–4.9)	S-MT vs. L-MT
Current protease inhibitor. N (%)				
Darunavir/ritonavir	25 (26.3)	24 (60.0)	19 (33.9)	S-MT vs. TT, L-MT
Lopinavir/ritonavir	70 (73.7)	16 (40.0)	37 (66.1)	
Adherence level <100%. N (%)				
	25 (27.8)	7 (18.0)	11 (19.6)	
CPE score. Median (IQR)				
	7 (7–7)	3 (3–3)	3 (3–3)	NA
Use of non-prescribed drugs. N (%)				
Never	43 (46.7)	19 (47.5)	31 (55.4)	
Past	25 (27.2)	12 (30.0)	14 (25.0)	
Active	24 (26.1)	9 (22.5)	11 (19.6)	
Prior neurological disease. N (%)				
	12 (12.6)	4 (10.0)	6 (10.7)	
Prior psychiatric disease. N (%)				
	19 (20.0)	9 (22.5)	15 (26.8)	
HADS-D score. Median (IQR)				
	2 (0–5)	2 (0.5–3.5)	2.5 (1–5)	
Prior medical disease*. N (%)				
	35 (36.8)	22 (55.0)	27 (48.2)	
Hepatitis C. N (%)				
No	48 (52.8)	17 (42.5)	35 (63.6)	
Past	19 (20.9)	10 (25.0)	14 (25.5)	
Active	24 (26.4)	13 (32.5)	4 (10.9)	S-MT vs. L-MT
Triglycerides (mg/dL). Median (IQR)				
	136.5 (108–197)	176.5 (138–209.5)	189 (124–272)	L-MT vs. TT
Total Cholesterol/HDL ratio. Median (IQR)				
	3.9 (3.3–4.7)	4.6 (3.6–5.6)	4.3 (3.3–5.9)	S-MT vs. TT
Receiving statins. N (%)				
	14 (15.9)	9 (22.5)	17 (32.1)	L-MT vs. TT
HOMA index. Median (IQR)				
	1.7 (1.1–2.7)	2.1 (1.3–4.0)	2.2 (1.4–3.4)	L-MT vs. TT

TT=Triple therapy. S-MT=Short-term Monotherapy. L-MT=Long-term Monotherapy. Medical disease: hypertension, dyslipidemia, diabetes mellitus, ischemic heart disease, heart insufficiency, chronic renal failure, thyroid disorders and peripheral arterial disease*.
doi:10.1371/journal.pone.0069493.t002

Neurocognitive performance

We found no differences in neurocognitive performance measured by GDS among triple-drug therapy (median GDS: 0.31, IQR: 0.08–0.54), S-MT (0.27, IQR: 0–0.62) and L-MT groups (0.24, IQR: 0.08–0.54, Figure 1). Rates of impairment in each of the neurocognitive domains assessed were also similar across the three groups.

We identified 52 patients (27.2%, 95% CI: 20.9–33.6) with neurocognitive impairment. All were mild symptomatic (14–26.9%) or asymptomatic (38–73.1%) by self-report. We did not observe differences in the prevalence of neurocognitive impairment among triple-drug therapy (31.6%, 95% CI: 22.1–41.0), S-MT (25.0%, 11.3–38.7) and L-MT (21.4%, 10.5–32.3) groups (Figure 2).

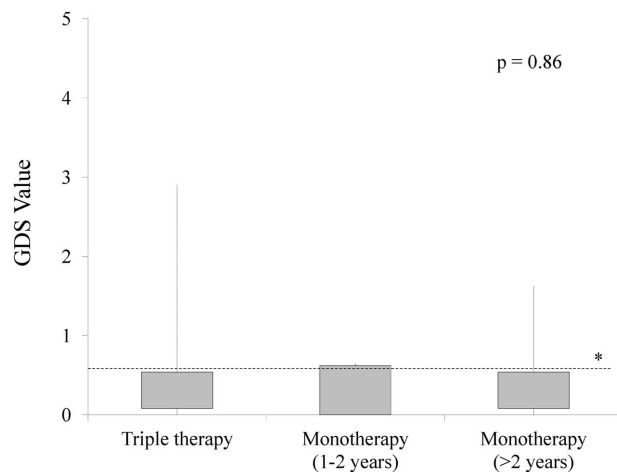
We also determined the prevalence of neurocognitive impairment based on the presence or absence of medical, psychiatric or neurologic comorbidities. In the L-MT group the prevalence of neurocognitive impairment did not change significantly depending on the presence of comorbidities; in the other two groups, patients with neurologic comorbidities showed a higher frequency of neurocognitive impairment (58.3% for the triple therapy group and 50% for the S-MT - Figure 2).

Logistic regression results

In the univariate analysis, monotherapy (either short-term or long-term duration) did not show any association to neurocognitive impairment when compared to triple therapy. Total duration of ART, years of education, ethnicity, transmission route and the HOMA index modified the association of monotherapy and neurocognitive impairment more than 15%. After adjusting for all these variables in a multivariate analysis (table 3), no effect on neurocognitive impairment of S-MT was found (OR 0.85; 95% CI 0.29–2.50; $p = 0.76$), while L-MT tended to be inversely associated with the presence of neurocognitive impairment (OR 0.40; IC 95% 0.14–1.15, $p = 0.09$).

Discussion

We have not found an association between protease inhibitor monotherapy with darunavir or lopinavir and higher rates of neurocognitive impairment. Patients maintaining plasma virologic suppression with protease inhibitor monotherapy did not show an increased presence of neurocognitive impairment compared to patients receiving suppressive triple therapy. Moreover, adjusted odds ratios did not show a trend towards a higher probability of neurocognitive impairment in patients receiving protease inhibitor monotherapy for more than two years. The use of established criteria [14] for diagnosis of neurocognitive impairment including



* Cut off value for normality (GDS = 0.5)

Figure 1. Distribution of neurocognitive performance by global deficit score (GDS).
doi:10.1371/journal.pone.0069493.g001

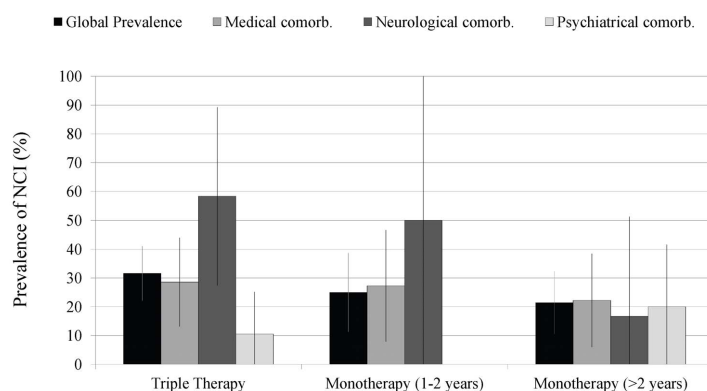


Figure 2. Global prevalence of neurocognitive impairment in each treatment group and by presence of comorbidities.
doi:10.1371/journal.pone.0069493.g002

demographically corrected norms and the blinding of the psychologist administering the neuropsychological tests strengthen our findings.

Despite a potential weakness to suppress HIV replication in the CNS, due to a low CPE score [8,16], patients on protease inhibitor monotherapy maintaining plasma virologic suppression did not show increased rates of neurocognitive impairment. Studies that have evaluated neurocognitive impairment rates according to CPE score only in suppressed patients have uniformly found no statistically significant benefit of a higher CPE score in patients receiving triple-drug ART [17,18,19]. Compared to these studies, ours had the advantage of comparing patients with a large difference -4 points- in CPE score. Results of two smaller studies

in which protease inhibitor monotherapy with lopinavir/ritonavir was not associated with greater rates of neurocognitive impairment [10,11] also supports our findings.

Our results suggest that protease inhibitor monotherapy with lopinavir or darunavir in patients with adequate plasma suppression may be enough to prevent HAND. Protease inhibitor monotherapy is an option only for patients with long-term plasma virological suppression and high CD4 cell counts, which is a low risk scenario for HAND. Virological suppression in plasma decreases HIV trafficking towards the central nervous system and a high CD4 cell count decreases the risk of independent HIV replication in the brain parenchyma [20]. In the event of residual local brain HIV replication, lopinavir and darunavir achieve levels

Table 3. Multivariate logistic regression step-wise model: odds ratios for neurocognitive impairment in monotherapy groups compared to triple therapy.

Model	Confounders included	S-MT (1–2 years)	L-MT (>2 years)
Crude		0.72 (0.31–1.67)	0.59 (0.27–1.28)
Step 1	Total duration of ART	0.94 (0.39–2.31)	0.60 (0.26–1.39)
Step 2	Years of education	0.77 (0.29–1.99)	0.43 (0.17–1.07)
Step 3	Ethnicity	0.99 (0.37–2.65)	0.51 (0.20–1.33)
Step 4	Transmission route	1.07 (0.39–2.94)	0.41 (0.15–1.13)
Step 5	HOMA index	0.85 (0.29–2.50)	0.40 (0.14–1.15)
FINAL MODEL		0.85 (0.29–2.50)	0.40 (0.14–1.15)

S-MT = Short-term Monotherapy. L-MT = Long-term Monotherapy.
doi:10.1371/journal.pone.0069493.t003

in the cerebrospinal fluid that exceed several times the IC50 of the virus [21,22].

The other hypothesis that could explain our results is a similar net balance between neuro-protection and neurotoxicity in patients treated with triple therapy or protease inhibitor monotherapy [23]. In vitro experiments have shown that antiretroviral drugs at concentrations achieved in the cerebrospinal fluid can produce neural damage [24]. Two clinical studies have also suggested a possible neurotoxic effect of ART. In ACTG 5170 [25] neuropsychological scores improved after ART interruption. In ACTG 736 [26] ART regimens with higher CPE score were associated with poorer neurocognitive performance. It is possible that in patients receiving protease inhibitor monotherapy a possible lower neuro-penetrance could be compensated with lower neurotoxicity.

Our results do not contradict prior reports of other types of neurological diseases in patients receiving protease inhibitor monotherapy [11,27]. While our study is focused on neurocognitive impairment, these reports described patients with neurological symptoms such as meningitis associated to cerebrospinal fluid viral escape. Reports are heterogeneous because they have included patients with and without adequate plasma virological suppression [28]. Neurological disease and cerebrospinal fluid viral escape has also been communicated in patients receiving triple drug ART [29,30]. At present it is unclear if patients exposed to protease inhibitor monotherapy have a higher risk of cerebrospinal fluid virological escape and neurological disease. In the MONET clinical trial after three years of follow-up drug-related neuropsychiatric adverse events were infrequent for darunavir/ritonavir, either used as monotherapy or triple therapy [31].

Our study has significant limitations. We cannot rule out the possibility of a beta error since we had only a 38% power to detect differences in prevalence of neurocognitive impairment similar to the ones found between triple therapy and L-MT. However, in light our results, it is highly unlikely that the undetected effect favours the group on triple therapy. Besides, the upper limit of the 95% CI for the prevalence of neurocognitive impairment for patients who received protease inhibitor monotherapy for more than two years –32.3%– is consistent with the prevalence of neurocognitive impairment in suppressed patients receiving triple therapy [1].

Another limitation of a cross-sectional study like ours is prescription bias. Protease inhibitor monotherapy is an option only for patients who have maintained HIV suppression for at least 6 months, without previous virological failure while on a protease inhibitor based regimen and preferably without low CD4 nadirs [32]. It is logical that due to these restrictions patients receiving protease inhibitor monotherapy had slightly different characteristics than patients receiving triple therapy.

We believe a systematic bias in favour of using monotherapy in patients with a lower risk of neurocognitive impairment, is unlikely. Differences between monotherapy and triple therapy groups had limited clinical relevance. We recruited predominantly highly adherent, middle age, Caucasian males who acquired HIV sexually 15 to 20 years ago, started ART with a CD4 nadir within 150 to 200 cells/mL, who were virologically suppressed for 5 to 8 years and had similar education and past history of medical, neurological and psychiatric disease.

Finally, since our analysis is cross-sectional, survivor bias might have confounded results. It is possible that patients who developed neurocognitive impairment while on protease inhibitor monotherapy changed ART before entering the present study. Patients enrolled in our cohorts that switched protease inhibitor monotherapy to other regimens prior to the initiation of the study, changed ART mainly due persistent low-level viremia in plasma and we did not identify a single case of switching due to neurocognitive complains. However, we cannot exclude that the detection of plasma low-level viremia in those patients could be associated with a reduction in the rates of adherence due to asymptomatic neurocognitive impairment.

In summary, our study does not confirm an association between protease inhibitor monotherapy and neurocognitive impairment, even in patients receiving monotherapy for a prolonged period of time. These results question the importance of using multiple drugs with potential activity in the CNS to prevent neurocognitive impairment.

Supporting Information

Figure S1 Study Process Flow Chart.
(DOCX)

Table S1 Patients followed in our cohorts on LPV or DRV monotherapy, re-intensified to double or triple therapy prior the study recruitment phase.
(DOCX)

Table S2 Tests used in the Neurocognitive Assessment.
(DOC)

Acknowledgments

We thank all the patients who volunteered to participate in the study and to the study nurses Blanca Arribas and Marta Galvez.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: IPV AGB ME MMR CB FP JIB FXZ SM FG ML RR AH FA JRA. Performed the experiments: IPV AGB ME MMR CB FP JIB FXZ SM FG ML RR JRA. Analyzed the data: SM FG IPV ME. Contributed reagents/materials/analysis tools: IPV AGB ME. Wrote the paper: IPV AGB ME MMR CB FP JIB FXZ SM FG ML RR AH FA JRA.

References

1. Heaton RK, Clifford DB, Franklin DR, Woods SP, Ake C, et al (2010) HIV-associated neurocognitive disorders persist in the era of potent antiretroviral therapy: CHARTER Study. *Neurology* 75: 2087–2096.
2. Arribas JR, Delgado R, Arranz A, Muñoz R, Porilla J, et al (2009) Lopinavir-ritonavir monotherapy versus lopinavir-ritonavir and 2 nucleosides for maintenance therapy of HIV: 96-week analysis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 51: 147–152.
3. Arribas JR, Horban A, Gerstoft J, Finkenheuer G, Nelson M, et al (2010) The MONET trial: darunavir/ritonavir with or without nucleoside analogues, for patients with HIV RNA below 50 copies/ml. *AIDS* 24: 223–230.
4. Katlama C, Valantin MA, Algarte-Genin M, Duvivier C, Lambert-Niclot S, et al (2010) Efficacy of darunavir/ritonavir maintenance monotherapy in patients with HIV-1 viral suppression: a randomized open-label, noninferiority trial, MONOI-ANRS 136. *AIDS* 24: 2365–2374.
5. Santos JR, Molló J, Llibre JM, Negro E, Bravo I, et al (2012) Antiretroviral simplification with darunavir/ritonavir monotherapy in routine clinical practice: safety, effectiveness, and impact on lipid profile. *PLoS One* 7:e37442.
6. Estébanez M, Arribas JR. Protease Inhibitor Monotherapy: What Is Its Role? (2012) *Curr HIV/AIDS Rep* 9: 179–185.
7. Thompson MA, Aberg JA, Hoy JF, Teletni A, Benson C, et al (2012) Antiretroviral Treatment of Adult HIV Infection: 2012 Recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. *JAMA* 308: 397–402.
8. Letendre S, Marquie-Beck J, Capparelli E, Best B, Clifford D, et al (2009) Validation of the CNS Penetration-Effectiveness Rank for Quantifying Antiretroviral Penetration Into the Central Nervous System. *Arch Neurol* 65: 65–70.
9. Perez-Valero I, Bayon C, Cambron I, Gonzalez A, Arribas JR. Protease inhibitor monotherapy and the CNS: peace of mind? (2011) *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66: 1954–1962.
10. Santos J, Muñoz-Moreno J, Molto J, Bravo I, Prats A, et al (2012) Long-term Monotherapy with Lopinavir/ritonavir (>2 Years) Is Not Associated with Greater HIV-associated Neurocognitive Impairment. 19th Conference of Retroviruses and Opportunistic Infections, Seattle, US. Abstract 483.
11. Gummann C, Cusini A, Günthard HF, Fux C, Hirschel B, et al (2010) Randomized controlled study demonstrating failure of LPV/r monotherapy in HIV: the role of compartment and CD4-nadir. *AIDS* 24: 2347–2354.
12. Du Pasquier RA, Jilek S, Kalubi M, Yerly S, Fux CA, et al (2013) Marked increase of the astrocytic marker S100B in the cerebrospinal fluid of HIV-infected patients on LPV/r-monotherapy. *AIDS* 27: 203–210.
13. Zigmond AS, Snaith RP (1983) The hospital anxiety and depression scale. *Acta Psychiatr Scand* 67: 361–370.
14. Antinori A, Arendt G, Becker JT, Brew BJ, Byrd DA, et al (2007) Updated research nosology for HIV-associated neurocognitive disorders. *Neurology* 69: 1789–1799.
15. Carey CL, Woods SP, Gonzalez R, Conover E, Marcotte TD, et al (2004) Predictive validity of global deficit scores in detecting neuropsychological impairment in HIV infection. *J Clin Exp Neuropsychol* 26: 307–319.
16. Letendre SL, FitzSimons C, Ellis RJ, Clifford D, Collier AC, et al (2010) Correlates of CSF Viral Loads in 1221 Volunteers of the CHARTER Cohort. 17th Conference of Retroviruses and Opportunistic Infections, San Francisco, US. Abstract 172.
17. Simioni S, Cavassini M, Annoni J-M, Rimbault Abraham A, Bourquin I, et al (2010) Cognitive dysfunction in HIV patients despite long-standing suppression of viremia. *AIDS* 24: 1243–1250.
18. Smurzynski M, Wu K, Letendre S, Robertson K, Bosch RJ, et al (2011) Effects of central nervous system antiretroviral penetration on cognitive functioning in the ALLRT cohort. *AIDS* 25: 357–365.
19. Winston A, Arenas-Pinto A, Stöhr W, Fisher M, Orkin c, et al (2011) Factors influencing neurocognitive function in a large cohort of HIV infected patients on effective antiretroviral therapy. Thirteenth European AIDS Conference, Belgrade, Serbia. Abstract PS2/4.
20. Ellis RJ, Gamst AC, Capparelli E, Spector SA, Hsia K, et al (2000) Cerebrospinal fluid HIV RNA originates from both local CNS and systemic sources. *Neurology* 54: 927–936.
21. Capparelli EV, Holland D, Okamoto C, Gragg B, Durelle J, et al (2005) Lopinavir concentrations in cerebrospinal fluid exceed the 50% inhibitory concentration for HIV. *AIDS* 19: 949–952.
22. Yilmaz A, Izadkhashti A, Price RW, Mallon PW, De Meulder M, et al (2009) Darunavir concentrations in cerebrospinal fluid and blood in HIV-1-infected individuals. *AIDS Research and Human Retroviruses* 25: 457–461.
23. Clifford DB (2010) Therapeutic conundrum: AIDS therapies may be double-edged swords. *Neurology* 74: 1248–1249.
24. Robertson K, Limer J, Meeker RB (2012) Antiretroviral neurotoxicity. *J Neurovirol* doi:10.1007/s13365-012-0120-3.
25. Robertson KR, Su Z, Margolis DM, Krambrink A, Havlir DV, et al (2010) Neurocognitive effects of treatment interruption in stable HIV-positive patients in an observational cohort. *Neurology* 74: 1260–1266.
26. Marra CM, Zhao Y, Clifford DB, Letendre S, Evans S, et al (2009) Impact of combination antiretroviral therapy on cerebrospinal fluid HIV RNA and neurocognitive performance. *AIDS* 23: 1359–1366.
27. Gisslen M, Fuchs D, Hagberg L, Svennerholm B, Zetterberg H (2012) Cerebrospinal fluid viral breakthrough in two HIV-infected subjects on darunavir/ritonavir monotherapy. *Scand J Infect Dis* 44: 997–1000.
28. Paton NI, Meynard JL, Pulido F, Arenas-Pinto A, Girard PM, Arribas JR (2011) Inappropriate claim of “failure of ritonavir-boosted lopinavir monotherapy in HIV in the Monotherapy Switzerland/Thailand (MOST) trial”. *AIDS* 25: 393–394.
29. Canestri A, Lescure FX, Jaureguiberry S, Moulignier A, Amiel C, et al (2010) Discordance Between Cerebral Spinal Fluid and Plasma HIV Replication in Patients with Neurological Symptoms Who Are Receiving Suppressive Antiretroviral Therapy. *Clinical Infectious Diseases* 50: 773–778.
30. Peluso MJ, Ferretti F, Peterson J, Lee E, Fuchs D, et al (2012) Cerebrospinal Fluid HIV Escape Associated with Progressive Neurologic Dysfunction in Patients on Antiretroviral Therapy with Well-Controlled Plasma Viral Load. *AIDS* 26: 1765–1774.
31. Winston A, Moecklinghoff C, Hill A (2012) Three-year evaluation of neuropsychiatric adverse events in the MONET trial of darunavir/ritonavir, with or without nucleoside analogues. *Int J STD AIDS* 23: 225–226.
32. Panel members of the European AIDS Clinical Society (2012) European AIDS Clinical Society guidelines 2012. Version 6.1 Available: www.europeanaidsclinicalociety.org. Accessed: 14 April 2013.

Author's personal copy

J. Neurovirol.
DOI 10.1007/s13365-014-0251-9

Pattern of neurocognitive function in patients receiving boosted protease inhibitor monotherapy: a detailed neuropsychological study

Alicia González-Baeza · Fernando Carvajal · Carmen Bayón · Ignacio Pérez-Valero · Miriam Estébanez · Jose I. Bernardino · Susana Monge · María Lagarde · Asunción Hernando · Francisco Arnalich · José R. Arribas

Received: 19 November 2013 / Revised: 22 March 2014 / Accepted: 26 March 2014
© Journal of NeuroVirology, Inc. 2014

Abstract It is unknown if, compared to a triple drug antiretroviral therapy, boosted protease inhibitor monotherapy leads to worse results in specific neuropsychological processes. In our study, we included patients virologically suppressed (≥ 1 year), on antiretroviral therapy, without concomitant major neurocognitive confounders, receiving boosted lopinavir or darunavir as monotherapy ($n=96$) or as triple therapy with two nucleoside reverse transcriptase inhibitors ($n=95$). All

patients underwent a comprehensive neuropsychological test battery (14 neuropsychological measures, covering seven domains). Both groups were compared in average score distributions and rates of neuropsychological deficits. Similar comparisons were conducted only for patients with neurocognitive impairment. In the adjusted analysis, we found only small differences between groups in the entire sample: better verbal learning ($p=0.02$; $d=0.28$) and verbal recall scores ($p<0.01$; $d=0.25$) in patients on boosted protease inhibitor monotherapy and slightly better motor skills with dominant hand ($p=0.02$; $d=0.23$) scores in patients on triple therapy. No greater proportion of deficits in the protease inhibitor monotherapy group was found in any neuropsychological measure. In neurocognitively impaired patients, we found similar outcomes in verbal learning, verbal recall, and motor skills with dominant hand but with larger effect sizes. Close similarities in the neurocognitive pattern between groups question the clinical relevance of the number of neuroactive drugs included in the regimen. These results also suggest that peripheral viral load control may be a good indicator of brain protection.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s13365-014-0251-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. González-Baeza (✉) · I. Pérez-Valero · M. Estébanez · J. I. Bernardino · F. Arnalich · J. R. Arribas
HIV Unit, Internal Medicine Service, Hospital Universitario La Paz, IdiPAZ, Paseo de la Castellana 261, 28046 Madrid, Spain
e-mail: alicia.gonzalez@idipaz.es

F. Carvajal
Biological and Health Psychology Department, Universidad Autónoma de Madrid, Campus de Cantoblanco, C/Iván Paulov 6, 28049 Madrid, Spain

C. Bayón
Psychiatry Service, Hospital Universitario La Paz, IdiPAZ, Paseo de la Castellana 261, 28046 Madrid, Spain

M. Lagarde
HIV Unit, Internal Medicine Service, Hospital Universitario 12 de Octubre, i+12, Avda de Córdoba s/n, 28041 Madrid, Spain

S. Monge
Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III, Campus de Chamartín, Av. Monforte de Lemos 5, 28029 Madrid, Spain

A. Hernando
Departamento de Especialidades Médicas Aplicadas, Universidad Europea, C/Tajo s/n, 28670 Villaviciosa de Odón, Madrid, Spain

Keywords HIV · Boosted protease inhibitor monotherapy · Neurocognitive impairment · HAND

Introduction

The importance of the number of neuroactive drugs in an antiretroviral (ART) regimen to prevent HIV-associated neurocognitive impairment is a matter of debate. Several studies have suggested that a higher number of neuroactive drugs might benefit neurocognitive functioning (Chang et al. 2003; Cysique et al. 2004, 2006, 2009; Tozzi et al. 2009;

Published online: 24 April 2014

 Springer

Author's personal copy

J. Neurovirol.

Smurzynski et al. 2011; Ciccarelli et al. 2013). However, this finding has not been confirmed in other studies, including a recent small clinical trial (Sacktor et al. 2001; Sacktor et al. 2003; Heaton et al. 2010; Simioni et al. 2010; Ciccarelli et al. 2011; Garvey et al. 2011; Bunupuradah et al. 2012; Crum-Cianflone et al. 2013; Kahouadji et al. 2013; Winston et al. 2013). A potential explanation for these contradictory results is that studies have included patients with and without HIV suppression in plasma.

In patients with particular clinical features, protease inhibitor monotherapy is able to maintain virological suppression in plasma (Pulido et al. 2008; Arribas et al. 2010; Katlama et al. 2010). Because protease inhibitor monotherapy entails the use of a single neuroactive drug, there is concern that the use of this strategy would increase the risk of neurocognitive impairment (Thompson et al. 2012; Pérez-Valero et al. 2011). Two recent studies have reported that patients receiving protease inhibitor monotherapy with prolonged suppression of plasma viral load do not appear to have higher rates of neurocognitive impairment (Pérez-Valero et al. 2013; Santos et al. 2013). While neurocognitive impairment provides information regarding the overall cognitive function, the analysis of particular ability areas enable identification of neuropsychological (NP) patterns indicative of specific brain damage (Harvey 2012; Seidman 1998). Therefore, neuropsychological testing analyses could reveal different patterns of neurocognitive functioning depending on the number of neuroactive drugs used, despite similar rates of neurocognitive impairment. To the best of our knowledge, there are no prior studies looking at detailed neurocognitive testing in patients exposed to protease inhibitor monotherapy.

We conducted a detailed analysis of neuropsychological measures in virologically suppressed, HIV-infected patients exposed to boosted lopinavir or darunavir as monotherapy or as triple antiretroviral therapy. We previously found low and similar rates of neurocognitive impairment in patients on monotherapy (22.9 %) and triple therapy (31.6 %) in this cohort (Pérez-Valero et al. 2013). Our main objective was to compare the pattern of neurocognitive functioning in patients exposed to one versus three neuroactive drugs and to continue testing the safety of protease inhibitor monotherapy. Since this is the first study of this kind, no a priori hypotheses regarding possible pattern differences were possible.

Methods

The present study is a subanalysis of a parent study comparing neurocognitive impairment in patients treated with protease inhibitor monotherapy or triple drug antiretroviral therapy. Details of this cohort have been previously published (Pérez-Valero et al. 2013). Briefly, we recruited patients who received protease inhibitors either as monotherapy ($n=96$) or with two

nucleoside reverse transcriptase inhibitors ($n=95$) for at least 1 year and had good plasma virological control. A neuropsychologist blinded to treatment group conducted a comprehensive neuropsychological battery selected from the 2007 Frascati consensus (Antinori et al. 2007). Apart from the neuropsychological evaluation, all participants completed medical and laboratory assessments (Pérez-Valero et al. 2013). We excluded patients suffering from neurological and severe psychiatric disorders, receiving medications that could interfere with neuropsychological evaluation or who met criteria for abuse of alcohol or illicit drugs.

Neuropsychological assessment

Our neuropsychological (NP) battery included 14 NP measures that tested seven domains: attention span/working memory, mental flexibility, verbal fluency, processing of information speed, learning, delayed recall, and fine motor processes (list of tests and normative data studies available in Table 4 of supplementary material). To estimate and control for premorbid cognitive functioning, the Wechsler Adult Intelligence Scale (WAIS-III) Vocabulary subtest was applied. The best available normative data for our sample were used to convert 14 raw test scores to 14 normalized Z-scores, which were further converted into left-truncated T-scores ranging from 0 to 100. T-scores are normally distributed and have a mean of 50 and SD of 10 in normal people. Normative data were extracted from different normative studies for individual tests. Due to the larger sample sizes in the moment of the test correction, we applied normative data extracted from US population in most of the NP measures. We only had suitable normative data from Spanish population for the Trail Making Test forms A and B and Verbal learning and recall measures. Verbal memory measures were age–education–sex corrected, Trail Making Test measures age–education corrected and the remaining NP measures age corrected following the normative studies. For each NP measure, we categorized deficits as mild, if the normalized Z-score was equal or below one standard deviation (SD) and above 2 SD below the mean from the reference population, or moderate if equal or below 2 SD.

Current use of tobacco, cannabis, cocaine, heroin, methadone, and designer drugs was explored by interview. Sociodemographical data, antiretroviral adherence level, and psychiatric comorbidities (history of past mood disorders and current or past anxiety disorders) were also recorded.

Statistical methods

Sample characteristics were described using absolute and relative frequencies for categorical variables and means (SD) or medians (IQR) for continuous variables. Chi-squared test and Student's *t* or the non-parametric Mann–Whitney *U* test were used, respectively, to compare baseline characteristics.

Author's personal copy

J. Neurovirol.

Smurzynski et al. 2011; Ciccarelli et al. 2013). However, this finding has not been confirmed in other studies, including a recent small clinical trial (Sacktor et al. 2001; Sacktor et al. 2003; Heaton et al. 2010; Simioni et al. 2010; Ciccarelli et al. 2011; Garvey et al. 2011; Bunupuradah et al. 2012; Crum-Cianflone et al. 2013; Kahouadji et al. 2013; Winston et al. 2013). A potential explanation for these contradictory results is that studies have included patients with and without HIV suppression in plasma.

In patients with particular clinical features, protease inhibitor monotherapy is able to maintain virological suppression in plasma (Pulido et al. 2008; Arribas et al. 2010; Katlama et al. 2010). Because protease inhibitor monotherapy entails the use of a single neuroactive drug, there is concern that the use of this strategy would increase the risk of neurocognitive impairment (Thompson et al. 2012; Pérez-Valero et al. 2011). Two recent studies have reported that patients receiving protease inhibitor monotherapy with prolonged suppression of plasma viral load do not appear to have higher rates of neurocognitive impairment (Pérez-Valero et al. 2013; Santos et al. 2013). While neurocognitive impairment provides information regarding the overall cognitive function, the analysis of particular ability areas enable identification of neuropsychological (NP) patterns indicative of specific brain damage (Harvey 2012; Seidman 1998). Therefore, neuropsychological testing analyses could reveal different patterns of neurocognitive functioning depending on the number of neuroactive drugs used, despite similar rates of neurocognitive impairment. To the best of our knowledge, there are no prior studies looking at detailed neurocognitive testing in patients exposed to protease inhibitor monotherapy.

We conducted a detailed analysis of neuropsychological measures in virologically suppressed, HIV-infected patients exposed to boosted lopinavir or darunavir as monotherapy or as triple antiretroviral therapy. We previously found low and similar rates of neurocognitive impairment in patients on monotherapy (22.9 %) and triple therapy (31.6 %) in this cohort (Pérez-Valero et al. 2013). Our main objective was to compare the pattern of neurocognitive functioning in patients exposed to one versus three neuroactive drugs and to continue testing the safety of protease inhibitor monotherapy. Since this is the first study of this kind, no a priori hypotheses regarding possible pattern differences were possible.

Methods

The present study is a subanalysis of a parent study comparing neurocognitive impairment in patients treated with protease inhibitor monotherapy or triple drug antiretroviral therapy. Details of this cohort have been previously published (Pérez-Valero et al. 2013). Briefly, we recruited patients who received protease inhibitors either as monotherapy ($n=96$) or with two

nucleoside reverse transcriptase inhibitors ($n=95$) for at least 1 year and had good plasma virological control. A neuropsychologist blinded to treatment group conducted a comprehensive neuropsychological battery selected from the 2007 Frascati consensus (Antinori et al. 2007). Apart from the neuropsychological evaluation, all participants completed medical and laboratory assessments (Pérez-Valero et al. 2013). We excluded patients suffering from neurological and severe psychiatric disorders, receiving medications that could interfere with neuropsychological evaluation or who met criteria for abuse of alcohol or illicit drugs.

Neuropsychological assessment

Our neuropsychological (NP) battery included 14 NP measures that tested seven domains: attention span/working memory, mental flexibility, verbal fluency, processing of information speed, learning, delayed recall, and fine motor processes (list of tests and normative data studies available in Table 4 of supplementary material). To estimate and control for premorbid cognitive functioning, the Wechsler Adult Intelligence Scale (WAIS-III) Vocabulary subtest was applied. The best available normative data for our sample were used to convert 14 raw test scores to 14 normalized Z-scores, which were further converted into left-truncated T-scores ranging from 0 to 100. T-scores are normally distributed and have a mean of 50 and SD of 10 in normal people. Normative data were extracted from different normative studies for individual tests. Due to the larger sample sizes in the moment of the test correction, we applied normative data extracted from US population in most of the NP measures. We only had suitable normative data from Spanish population for the Trail Making Test forms A and B and Verbal learning and recall measures. Verbal memory measures were age–education–sex corrected, Trail Making Test measures age–education corrected and the remaining NP measures age corrected following the normative studies. For each NP measure, we categorized deficits as mild, if the normalized Z-score was equal or below one standard deviation (SD) and above 2 SD below the mean from the reference population, or moderate if equal or below 2 SD.

Current use of tobacco, cannabis, cocaine, heroin, methadone, and designer drugs was explored by interview. Sociodemographical data, antiretroviral adherence level, and psychiatric comorbidities (history of past mood disorders and current or past anxiety disorders) were also recorded.

Statistical methods

Sample characteristics were described using absolute and relative frequencies for categorical variables and means (SD) or medians (IQR) for continuous variables. Chi-squared test and Student's *t* or the non-parametric Mann–Whitney *U* test were used, respectively, to compare baseline characteristics.

Author's personal copy

J. Neurovirol.

Table 1 Patients' characteristics

	TT		MT		Total		p value
	N=95		N=96		N=191		
Current protease inhibitor, N (%)							
Darunavir/ritonavir	25	(26.3)	43	(44.8)	68	(35.6)	<0.01
Lopinavir/ritonavir	70	(73.7)	53	(55.2)	123	(64.4)	
Adherence level <100 %, N (%)	25	(26.3)	18	(18.8)	43	(22.5)	0.23
Male, N (%)	70	(73.7)	70	(72.9)	140	(73.3)	0.91
Mode of HIV transmission, N (%)							
Men who have sex with men	29	(30.5)	30	(31.3)	59	(30.9)	0.85
Heterosexual	30	(31.6)	25	(26.0)	55	(28.8)	
Intravenous drug use	30	(31.6)	34	(35.4)	64	(33.5)	
Other	6	(6.3)	7	(7.3)	13	(6.8)	
Ethnicity, N (%)							
Caucasian	79	(83.2)	92	(95.8)	171	(89.5)	<0.01
Other	16	(16.8)	4	(4.2)	20	(10.5)	
Age, median (IQR)	44.7 (40.6–48.4)		47.4 (44.8–51.4)		46.4 (42.3–49.6)		<0.01
Years of education, mean (SD)	11.3 (4.1)		10.4 (4.4)		10.8 (4.3)		0.13
Use of non-prescribed drugs, N (%)							
Never	43	(46.7)	50	(52.1)	93	(49.5)	0.66
Past	25	(27.2)	26	(27.1)	51	(27.1)	
Active	24	(26.1)	20	(20.8)	44	(23.4)	
AIDS, N (%)	60	(63.2)	59	(62.1)	119	(62.6)	0.88
Years with HIV, median (IQR)	15.1 (7.2–19.9)		17.2 (12.7–21.5)		15.8 (11.0–20.7)		<0.01
Years on antiretroviral therapy, median (IQR)							
Total	10.7 (4.8–15.7)		14.1 (10.7–15.9)		12.8 (7.1–15.8)		<0.01
TT	10.7 (4.815.7)		10.7 (7.0–13.7)		10.7 (5.7–14.5)		0.80
MT	–		2.3 (1.7–3.2)		–		–
Years virologically suppressed, median (IQR)	4.8 (2.9–8.9)		7.5 (4.5–10.0)		6.6 (3.7–9.2)		<0.01
Prior blip, N (%)	20	(21.1)	14	(14.6)	34	(17.8)	0.17
CD4 nadir (cells/mm ³), median (IQR)	153 (49–255)		182 (76–288)		177 (54–270)		0.11
Current CD4 (cells/mm ³), median (IQR)	560 (440–754)		629.5 (476–845.5)		597 (450–818)		<0.05
Neurological disease history, N (%)	12	(12.6)	10	(10.4)	22	(11.5)	0.63
Psychiatric disease history, N (%)	19	(20.0)	24	(25.0)	43	(22.5)	0.44
Medical disease history ^a , N (%)	35	(36.8)	49	(51.0)	84	(44.0)	0.05
Statin treatment, N (%)	14	(15.9)	26	(28.0)	40	(22.1)	0.05
HADS–D, median (IQR)	2 (0–5)		2 (1–4)		2 (1–4)		0.73
WAIS-III Vocabulary subtest, mean (SD)	0.3 (0–1)		0.7 (0–1)		0.3 (0–1)		0.64
Triglycerides (mg/dl), median (IQR)	136.5 (108–197)		183 (128–233)		164 (115–225)		<0.01
Total cholesterol to HDL ratio, median (IQR)	3.9 (3.3–4.7)		4.5 (3.6–5.6)		4.2 (3.4–5.3)		0.02
HOMA index, median (IQR)	1.8 (1.1–2.7)		2.2 (1.4–3.6)		2.0 (1.3–3.3)		0.06
Hepatitis C infection, N (%)							
No	48	(52.8)	52	(54.7)	100	(53.8)	0.54
Past	19	(20.9)	24	(25.3)	43	(23.1)	
Active	24	(26.4)	19	(20.0)	43	(23.1)	

TT triple therapy, MT monotherapy, HADS–D Hospital Anxiety and Depression Scale–Depression subscale, HDL high-density lipoproteins, HOMA Homeostasis Model Assessment

^a Medical disease: hypertension, dyslipidemia, diabetes mellitus, ischemic heart disease, heart insufficiency, chronic renal failure, thyroid disorders, and peripheral arterial disease

Author's personal copy

J. Neurovirol.

Table 2 Comparison of test results for patients on Monotherapy vs. Triple therapy

Neuropsychological measures	T-score, mean (SD)		Effect size (Cohen's <i>d</i>)	<i>p</i> value (crude)	regression Coefficient	<i>p</i> value (adjusted)
	TT	MT				
Digit span	50.0 (9.5)	52.4 (8.6)	0.26	0.08	1.75	0.10
Stroop test	53.5 (7.0)	53.8 (7.5)	0.04	0.78	-0.10	0.94
Trail Making Test form B	48.8 (10.6)	48.7 (8.0)	0.00	0.98	-1.16	0.44
Trail Making Test form A	53.0 (11.9)	53.8 (10.0)	0.07	0.64	-1.32	0.46
Digit symbol	42.3 (7.6)	43.9 (6.8)	0.21	0.14	-0.81	0.37
Symbol search	50.0 (8.8)	51.5 (8.3)	0.18	0.22	-1.19	0.29
Verbal learning	54.3 (8.7)	56.9 (10.5)	0.28	0.06	3.51	0.02
Visual learning	42.4 (13.5)	44.9 (12.5)	0.19	0.18	2.33	0.24
Verbal delayed recall	43.3 (10.6)	46.2 (11.9)	0.25	0.08	4.91	<0.01
Visual delayed recall	47.0 (14.1)	48.5 (12.9)	0.12	0.42	0.50	0.81
Phonologic verbal fluency	51.4 (10.7)	54.0 (11.7)	0.24	0.10	2.13	0.21
Semantic verbal fluency	52.3 (12.5)	52.5 (12.6)	0.01	0.92	-0.76	0.70
Motor skills dominant hand	47.2 (13.7)	44.1 (14.0)	0.23	0.12	-4.68	0.02
Motor skills non-dominant hand	43.8 (11.4)	43.2 (13.3)	0.10	0.52	-0.53	0.80

T-score for each NP measure is the standardization from raw scores. Standardized T-scores have a normal distribution with a mean of 50 and a standard deviation of 10. Verbal learning adjusted by years on antiretroviral therapy and triglycerides; verbal delayed recall by years on antiretroviral treatment, marihuana use, triglycerides, type of protease inhibitor prescribed, and vocabulary subtest; and motor skill with dominant hand by vocabulary subtest, nadir CD4 count, and HOMA index

TT triple therapy, MT monotherapy, SD standard deviation

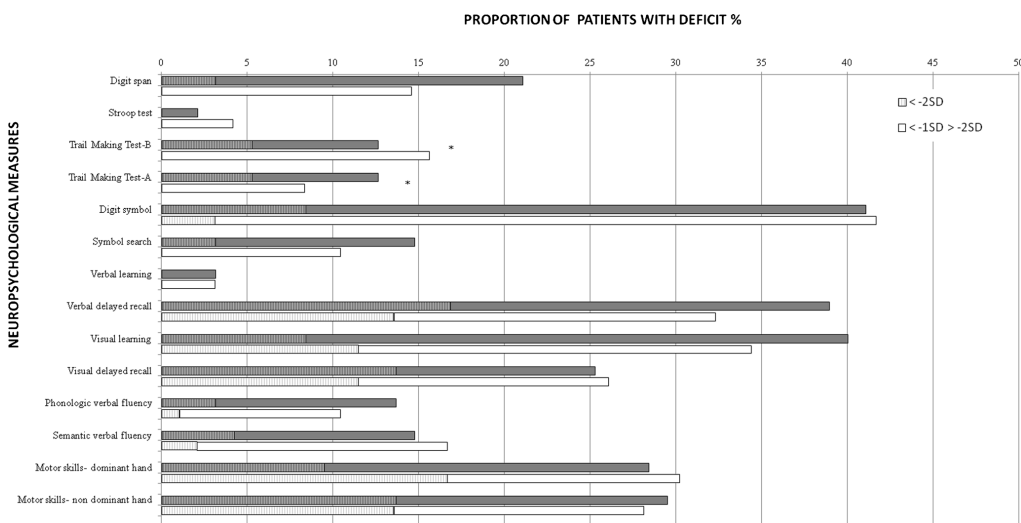


Fig. 1 Proportion of patients with mild and moderate deficits in the neuropsychological tests by treatment regimen. Gray and white bars indicate patients receiving triple therapy or monotherapy, respectively. Striped sections of the bars indicate proportions of patients with moderate deficits: result equal or lower than 2 standard deviations below mean performance of the reference population. Non-striped sections of the bars indicate proportion of patients with mild deficit: a result between 1 and 2

standard deviation below mean performance of the reference population. Asterisk indicates statistically significant values (chi-squared or Fisher's exact test comparison of proportions of patients with deficits between both treatment regimens). Significant differences found only in the proportion of patients with moderate deficits in Trail Making Test forms A and B

Author's personal copy

J. Neurovirol.

Neuropsychological test results in neurocognitively impaired patients receiving protease inhibitor monotherapy versus triple therapy

Prevalence of neurocognitive impairment was 31.6 % ($n=30$) in patients receiving triple therapy and 22.9 % ($n=22$) in patient on protease inhibitor monotherapy.

Unadjusted analysis revealed significant worse average performance in verbal delayed recall among patients in triple therapy but worse outcomes in motor skills with dominant hand among patients receiving protease inhibitor monotherapy (Table 3). Verbal delayed recall ($d=0.63$) and motor skills with dominant hand ($d=0.54$) had medium effect size in magnitude of differences while all the remaining NP measures had small effect size ($d<0.5$). Adjusted analysis confirmed the significant differences by treatment group in both NP measures and revealed a trend toward significant values in verbal learning ($p=0.06$) with poorer performance in patients receiving triple therapy (Table 3).

We also found a higher proportion of mild deficit in the Trail Making Test form A in the triple therapy group compared to protease inhibitor monotherapy (36.7 vs. 13.6 %; $p=0.03$). However, patients receiving protease inhibitor monotherapy had higher proportion of mild deficits in the motor skills with dominant hand measure (73.7 vs. 43.3 %; $p=0.03$). Regarding moderate deficits, we did not find a higher proportion of deficits in any of the NP measures in the protease inhibitor monotherapy group compared to triple therapy group. Trail Making Test forms A and B showed a trend towards a higher proportion of moderate deficits in patients receiving triple therapy (16.7 vs. 0.0 %; $p=0.06$).

Discussion

In our comprehensive neuropsychological evaluation, we have not found large differences between the groups of patients treated with boosted protease inhibitor as monotherapy or together with two nucleosides. Besides, in our entire

population of well-controlled HIV infected patients with good immunologic status, average T-scores results for each individual test showed no substantial deviations from the expected neuropsychological values in the normative data. Taken together, these results support the notion that HIV-infected patients with prolonged control of plasma viral replication have low rates of neurocognitive impairment regardless of the number of neuroactive drugs used to control HIV replication.

In our entire sample, we found few statistically significant differences in test results between therapy groups in the adjusted analysis. Verbal learning and verbal delayed recall score were worse in the triple therapy group while scores in fine motor skills with dominant hand were worse in the protease inhibitor monotherapy group. Of note, effect sizes were small, possibly indicating low clinical relevance. Moderate deficits were significantly more frequent in patients on triple therapy for the Trail Making Test form A and form B. Differences in the entire sample appear to be driven by outcomes in the subgroup of patients who were neurocognitively impaired. In this subgroup, we found differences in average score distribution by treatment group similar to the entire sample but with larger effect sizes. Differences in motor skills with the dominant hand in the entire group seem to be driven by the higher proportion of mild deficits in neurocognitively impaired patients receiving protease inhibitor monotherapy. Patients receiving triple therapy had a higher proportion of mild deficits for Trail Making Test form A. Given the small differences found in the entire sample, it is difficult to speculate that patients receiving protease inhibitor monotherapy might have a different pattern of neuropsychological deficits than patients receiving triple therapy. However, we cannot rule out that larger differences in neurocognitively impaired patients could be related to specific characteristics—such as neuropenetrance or neurotoxicity—of different antiretroviral regimens.

We previously reported that compared to triple drug antiretroviral therapy, monotherapy with lopinavir/ritonavir or darunavir/ritonavir in patients with adequate plasma

Table 3 Comparison of test results for patients on Monotherapy vs. Triple therapy in patients with neurocognitive impairment

Neuropsychological measures	T-score, mean (SD)		Effect size (Cohen's d)	p value (crude)	Regression coefficient	p value (adjusted)
	TT	MT				
Verbal learning	49.7(7.9)	53.5(8.5)	0.47	0.10	5.09	0.06
Verbal delayed recall	37.9(8.6)	44.3(12.0)	0.63	0.03	6.11	0.05
Motor skills dominant hand	41.1(14.4)	33.7(12.5)	0.54	0.06	-7.58	0.05

Standardized T-scores have a normal distribution with a mean of 50 and a standard deviation of 10. Table includes the NP measures that revealed differences by treatment group after adjustment. Selected confounders for adjustments were as follows: age, ethnicity, years of education, vocabulary subtest, and coinfection with hepatitis C virus

TT triple therapy, MT monotherapy, SD standard deviation

Author's personal copy

J. Neurovirol.

suppression was not associated with a higher rate of neurocognitive impairment using the Frascati criteria (Pérez-Valero et al. 2013). Now, we show for the first time that the pattern of deficits in 14 neuropsychological measures involved in one motor and six cognitive domains is very similar in patients receiving protease inhibitor monotherapy and triple-drug antiretroviral therapy. In patients with neurocognitive impairment, we were able to find specific NP test alterations by treatment group but no differences in the overall performance in any of seven domains.

Both treatment groups tended to underperform in the same NP measures: symbol digit, visual learning, visual delayed recall, verbal delayed recall, and motor skills. Our results are in agreement with two prior studies performed with patients on stable ART that reported worse performance in verbal delayed recall, symbol digit, motor skills (Cysique et al. 2004), verbal learning, and spatial span (Ciccarelli et al. 2013). Besides, impairment of learning tasks including visual learning measurement has been described in patients during the antiretroviral era (Heaton et al. 2011).

Our outcomes might reflect the persistence of particular NP deficits despite plasma viral suppression and regardless the number of antiretroviral drug used. Similar NP deficits among HIV-infected patients receiving different types of ART could be consistent with the hypothesis that ART only partially reverses the brain injury acquired during advanced immunosuppression (Heaton et al. 2010). We found poorer performance in verbal memory and Trail Making Test measures in the triple therapy group while patients on protease inhibitor monotherapy had poorer functioning in fine motor skills. Of note, differences were mainly restricted to neurocognitively impaired patients. Taken together, in our opinion, these results question the clinical relevance of the number of neuroactive drugs used and suggest that peripheral viral load control may be a good indicator of current brain protection. However, our findings do not completely rule out that in patients with neurocognitive impairment, the two antiretroviral strategies can have differential brain effects despite plasma virological control.

There are few studies reporting individual NP test results according to the number of neuroactive drugs or Central Nervous System Penetration-Effectiveness (CPE) score. Our results are in agreement with those of Cysique et al. (2004) who did not find significant differences in 13 neuropsychological measures when comparing patients treated with at least three neuroactive drugs and patients treated with less than three neuroactive drugs. Also in neurocognitively impaired patients, they found differences in verbal memory measures by treatment group but better performances was described in the group receiving more neuroactive drugs. Comparison with our results is difficult because only 55 % of Cysique et al. (2004) patients had undetectable plasma viral load. Besides, antiretroviral regimens and criteria to determine

neurocognitive impairment were different. However, both studies suggest that memory areas of the brain might be sensitive to differential antiretroviral drug effects in patients with neurocognitive impairment.

Ciccarelli et al. (2013) found a lower proportion of pathological results in patients treated with three-drug regimens with a CPE score ≥ 6 only in two out of 17 tests used: delayed recall of Rey's figure and the double barrage test that involves attentional abilities. Although we have not used the same tests, we have not found a higher proportion of deficits in visual delayed recall and one attentional task in patients on protease inhibitor monotherapy with a CPE score of 3. Comparisons between studies are also difficult because Ciccarelli et al. did not test patients on protease inhibitor monotherapy, did not report duration of virological suppression, and had patients with worse adherence than in our study.

Our results are strengthened by applying the formal NP assessment following expert recommendation to detect HIV-associated neurocognitive disorders, the baseline similarity of the groups of therapy and the exclusion of patients with major confounding disorders. In our study, all patients were virologically suppressed in blood and had maintained the same ART regimen for at least 1 year. In addition, we used the best available normative data for our sample and adjusted test results by sociodemographical and clinical relevant variables.

Our study has the limitations inherent to cross-sectional analysis, especially prescription and survival bias. Protease inhibitor monotherapy is only indicated in adherent patients with suppressed viral load. Therefore by definition, treatment with protease inhibitor monotherapy selects for a particular type of patient with low risk of neurocognitive impairment. Neuropsychological assessment also has important limitations. Though we used demographically corrected norms and statistical adjustment to control confounder variables, a representative control group of HIV-seronegative participants or the availability of extensive normative studies in Spanish population in all NP measures would improve the quality of our conclusions regarding deficit prevalence and impairment pattern. Besides, more comprehensive test batteries exploring additional neurocognitive domains would be needed to completely support the hypotheses of similar pattern of neuropsychological functioning regardless of the number of neuroactive drugs.

In summary, our study results do not support large differences in the pattern of neurocognitive functioning in virologically suppressed HIV-infected patients due to the use of a single neuroactive drug. Differences by treatment group were driven by outcomes in neurocognitively impaired patients, suggesting specific brain effects of different antiretroviral regimens. However, since our study is cross-sectional, further prospective studies are needed to fully understand the importance of the number and type of neuroactive drugs to prevent HIV-associated neurocognitive impairment.

Author's personal copy

J. Neurovirol.

- Acknowledgments** This work was supported by grant PI10/00483, Fondo de Investigaciones Sanitarias, Insituto de Salud Carlos III. Alicia González-Baeza is supported by a predoctoral fellowship from Insituto de Salud Carlos III. Dr I. Pérez-Valero, Dr. M. Estébanez and S. Monge are supported by Río Hortega fellowships financed by Fondo de Investigaciones Sanitarias. Dr. M. Lagarde is supported by a fellowship financed by Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre. IdiPAZ AIDS and infectious diseases investigator group is partially supported by "Red de Investigación en SIDA" (AIDS Research Network) (RIS) RD07/0006/2007.
- Conflict of interest** Authors have the following competing interests: Alicia González-Baeza, Fernando Carvajal, Carmen Bayón, Ignacio Pérez-Valero, Miriam Estébanez, Jose I Bernardino, Susana Monge, María Lagarde, Asunción Hernando, Francisco Arnalich, and José R Arribas have no financial relationship with the organization that sponsored the research.
- References**
- Antinori A, Arendt G, Becker JT, Brew BJ, Byrd DA, Cherner M, Clifford DB, Cinque P, Epstein LG, Goodkin K, Gisslen M, Grant I, Heaton RK, Joseph J, Marder K, Marra CM, McArthur JC, Nunn M, Price RW, Pulliam L, Robertson KR, Sacktor N, Valcour V, Wojna VE (2007) Updated research nosology for HIV-associated neurocognitive disorders. *Neurology* 69:1789–1799
- Arribas JR, Horban A, Gerstoft J, Fätkenheuer G, Nelson M, Clumeck N, Pulido F, Hill A, van Delft Y, Stark T, Moecklinghoff C (2010) The MONET trial: darunavir/ritonavir with or without nucleoside analogues, for patients with HIV RNA below 50 copies/ml. *AIDS* 24: 223–230. doi:10.1097/QAD.0b013e3283348944
- Bunupuradah T, Chetchotisakd P, Jirajariyavej S, Valcour V, Bowonwattanuwong C, Munsakul W, Klinbuayacem V, Prasithsirikul W, Sophonphan J, Mahanontharit A, Hirschel B, Bhakkecheep S, Ruxrungtham K, Ananworanich J (2012) Neurocognitive impairment in patients randomized to second-line lopinavir/ritonavir-based antiretroviral therapy vs. lopinavir/ritonavir monotherapy. *J Neurovirol* 18(6):479–487. doi:10.1007/s13365-012-0127-9
- Chang L, Ernst T, Witt MD, Ames N, Walot I, Jovicich J, DeSilva M, Trivedi N, Speck O, Miller EN (2003) Persistent brain abnormalities in antiretroviral-naïve HIV patients 3 months after HAART. *Antivir Ther* 8:17–26
- Ciccarelli N, Fabbiani M, Di Giambenedetto S, Fanti I, Baldonero E, Bracciale L, Tamburrini E, Cauda R, De Luca A, Silveri MC (2011) Efavirenz associated with neurocognitive impairment in otherwise asymptomatic HIV-infected patients. *Neurology* 76:1403–1409. doi:10.1212/WNL.0b013e32821670fb
- Ciccarelli N, Fabbiani M, Colafigli M, Treccarichi EM, Silveri MC, Cauda R, Murri R, De Luca A, Di Giambenedetto S (2013) Revised central nervous system neuropenetration-effectiveness score is associated with cognitive disorders in HIV-infected patients with controlled plasma viraemia. *Antivir Ther* 18:153–160. doi:10.3851/IMP2560
- Cohen J (1988) *Statistical power analysis for the behavioral sciences*, 2nd edn. Hillsdale, New Jersey
- Crum-Cianflone NF, Moore DJ, Letendre S, PoehlmanRoediger M, Eberly L, Weintrob A, Ganesan A, Johnson E, Del Rosario R, Agan BK, Hale BR (2013) Low prevalence of neurocognitive impairment in early diagnosed and managed HIV-infected persons. *Neurology* 80:371–379. doi:10.1212/WNL.0b013e32827f0776
- Cysique LAJ, Maruff P, Brew BJ (2004) Antiretroviral therapy in HIV infection: are neurologically active drugs important? *Arch Neurol* 61:1699–1704
- Cysique LA, Maruff P, Brew BJ (2006) Variable benefit in neuropsychological function in HIV-infected HAART-treated patients. *Neurology* 66:1447–1450
- Cysique LA, Vaida F, Letendre S, Gibson S, Cherner M, Woods SP, McCutchan JA, Heaton RK, Ellis RJ (2009) Dynamics of cognitive change in impaired HIV-positive patients initiating antiretroviral therapy. *Neurology* 73:342–348. doi:10.1212/WNL.0b013e3281ab2b3b
- Garvey L, Surendrakumar V, Winston A (2011) Low rates of neurocognitive impairment are observed in neuro-asymptomatic HIV-infected subjects on effective antiretroviral therapy. *HIV ClinTrialsHIVClin Trials* 12(6):333–338. doi:10.1310/hct1206-333
- Harvey PD (2012) Clinical applications of neuropsychological assessment. *Dialogues Clin Neurosci* 14(1):91–99
- Heaton RK, Clifford DB, Franklin DR Jr, Woods SP, Ake C, Vaida F, Ellis RJ, Letendre SL, Marcotte TD, Atkinson JH, Rivera-Mindt M, Vigil OR, Taylor MJ, Collier AC, Marra CM, Gelman BB, McArthur JC, Morgello S, Simpson DM, McCutchan JA, Abramson I, Gamst A, Fennema-Notestine C, Jernigan TL, Wong J, Grant I (2010) HIV-associated neurocognitive disorders persist in the era of potent antiretroviral therapy: CHARTER Study. *Neurology* 75:2087–2096. doi:10.1212/WNL.0b013e328200d727
- Heaton RK, Franklin DR, Ellis RJ, McCutchan JA, Letendre SL, LeBlanc S, Corkran SH, Duarte NA, Clifford DB, Woods SP, Collier AC, Marra CM, Morgello S, Mindt MR, Taylor MJ, Marcotte TD, Atkinson JH, Wolfson T, Gelman BB, McArthur JC, Simpson DM, Abramson I, Gamst A, Fennema-Notestine C, Jernigan TL, Wong J, Igor Grant I, CHARTER Group, HNERC Group (2011) HIV-associated neurocognitive disorders before and during the era of combination antiretroviral therapy: differences in rates, nature, and predictors. *J Neurovirol* 17(1):3–16. doi:10.1007/s13365-010-0006-1
- Howell D (2002). *Statistical methods for psychology*, 5th ed.
- Kahouadji Y, Dumurgier J, Sellier P, Lapalus P, Delcey V, Bergmann J, Hugon J, Paquet C (2013) Cognitive function after several years of antiretroviral therapy with stable central nervous system penetration score. *HIV Med* 14:311–315
- Katlama C, Valantin MA, Algarte-Genin M, Duvivier C, Lambert-Niclot S, Girard PM, Molina JM, Hoen B, Pakianather S, Peytavin G, Marcelin AG, Flandre P (2010) Efficacy of darunavir/ritonavir maintenance monotherapy in patients with HIV-1 viral suppression: a randomized open-label, noninferiority trial. *MONO-ANRS 136. AIDS* 24:2365. doi:10.1097/QAD.0b013e3283348944
- Pérez-Valero I, Bayon C, Cambron I, González A, Arribas JR (2011) Protease inhibitor monotherapy and the CNS: peace of mind? *J Antimicrob Chemother* 66:1954–1962. doi:10.1093/jac/dkr229
- Pérez-Valero I, González-Baeza A, Estébanez M, Montes-Ramírez ML, Bayón C, Pulido F, Bernardino JI, Zamora FX, Monge S, Gaya F, Lagarde M, Rubio R, Hernando A, Arnalich F, Arribas JR (2013) Neurocognitive impairment in patients treated with protease inhibitor monotherapy or triple drug antiretroviral therapy. *PLoS One* 8: e69493. doi:10.1371/journal.pone.0069493
- Pulido F, Arribas JR, Delgado R, Cabrero E, González-García J, Pérez-Elias MJ, Arranz A, Portilla J, Pasquau J, Iribarren JA, Rubio R, Norton M (2008) Lopinavir-ritonavir monotherapy versus lopinavir-ritonavir and two nucleosides for maintenance therapy of HIV. *AIDS* 22:F1–F9
- Sacktor N, Tarwater PM, Skolasky RL, McArthur JC, Selnes OA, Becker J, Cohen B, Miller EN (2001) CSF antiretroviral drug penetration and the treatment of HIV-associated psychomotor slowing. *Neurology* 57:542–544
- Sacktor N, Skolasky RL, Tarwater PM, McArthur JC, Selnes OA, Becker J, Cohen B, Visscher B, Miller EN (2003) Response to systemic HIV viral load suppression correlates with psychomotor speed performance. *Neurology* 61:567–569
- Santos JR, Muñoz-Moreno JA, Moltó J, Prats A, Curran A, Domingo P, Libre JM, McClemon DR, Bravo I, Canet J, Watson V, Back D,

Author's personal copy

J. Neurovirol.

- Clotet B (2013) Virological efficacy in cerebrospinal fluid and neurocognitive status in patients with long-term monotherapy based on lopinavir/ritonavir: an exploratory study. *PLoS One* 8:e70201
- Seidman LJ (1998) Neuropsychological testing. *Harv Ment Health Lett* 14(11):4–6
- Simioni S, Cavassini M, Annoni JM, Rimbault Abraham A, Bourquin I, Schiffer V, Calmy A, Chave JP, Giacobini E, Hirschel B, Du Pasquier RA (2010) Cognitive dysfunction in HIV patients despite long-standing suppression of viremia. *AIDS* 24:1243–1250
- Smurzynski M, Wu K, Letendre S, Robertson K, Bosch RJ, Clifford DB, Evans S, Collier AC, Taylor M, Ellis R (2011) Effects of central nervous system antiretroviral penetration on cognitive functioning in the ALLRT cohort. *AIDS* 25:357–365. doi:10.1097/QAD.0b013e32834171f8
- Thompson MA, Aberg JA, Hoy JF, Telenti A, Benson C, Cahn P, Eron JJ, Günthard HF, Hammer SM, Reiss P, Richman DD, Rizzardini G, Thomas DL, Jacobsen DM, Volberding PA (2012) Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2012 recommendations of the International Antiviral Society-USA panel. *JAMA* 308:387–402. doi:10.1001/jama.2012.7961
- Tozzi V, Balestra P, Salvatori MF, Vlassi C, Liuzzi G, Giancola ML, Giulianelli M, Narciso P, Antinori A (2009) Changes in cognition during antiretroviral therapy: comparison of 2 different ranking systems to measure antiretroviral drug efficacy on HIV-associated neurocognitive disorders. *J Acquir Immune Defic Syndr* 52(1):56–63
- Winston A, Arenas-Pinto A, Stöhr W, Fisher M, Orkin CM, Aderogba K et al (2013) Neurocognitive function in HIV infected patients on antiretroviral therapy. *PLoS ONE* 8:e61949. doi:10.1371/journal.pone.0061949

BRIEF REPORT: CLINICAL SCIENCE

A Comparative Study of Neurocognitively Impaired Patients Receiving Protease Inhibitor Monotherapy or Triple-Drug Antiretroviral Therapy

Miriam Estébanez, MD,* Natalia Stella-Ascariz, BS,† Jesús Mingorance, PhD,‡
Ignacio Pérez-Valero, MD,* Alicia González-Baeza, BS,* Carmen Bayón, MD,‡ Botond Lakatos, MD,*
Alberto Borobia, MD,§ Francisco Arnalich, MD, PhD,* and José R. Arribas, MD*

Abstract: In a cross-sectional study of aviremic neurocognitively impaired patients receiving protease inhibitors as triple-drug therapy (n = 30) or as monotherapy (n = 22), we found no statistically significant differences in the types of cognitive domains involved or severity of cognitive deficit. Cerebrospinal fluid concentrations of total proteins, total tau, myelin basic protein, neuron-specific enolase, $\beta 2$ microglobulin, S100B protein, or prevalence of cerebrospinal fluid HIV-RNA detection by standard (6.3% vs 7.1% $P = 1$) or ultrasensitive assays (50% vs 71.4%, $P = 0.28$) were similar in both groups. These results do not suggest important differences in the pattern of neurocognitive impairment between groups receiving very different antiretroviral strategies.

Key Words: HIV, neurocognitive impairment, darunavir, lopinavir, monotherapy, cerebrospinal fluid, viral escape

(*J Acquir Immune Defic Syndr* 2014;67:419–423)

Received for publication February 19, 2014; accepted August 15, 2014.

From the *HIV Unit, Internal Medicine Service, Hospital Universitario La Paz, IdiPAZ, Madrid, Spain; †Microbiology Service, Hospital Universitario La Paz, IdiPAZ, Madrid, Spain; ‡Psychiatry Service, Hospital Universitario La Paz, IdiPAZ, Madrid, Spain; and §Clinical Pharmacology Service, Hospital Universitario La Paz, IdiPAZ, Madrid, Spain (Dr Lakatos is now with Department of Infectious Diseases, Saint Laszlo Teaching Hospital of Semmelweis University, Budapest, Hungary).

Supported by grant PI10/00483, Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III.

M.E. is supported by Río Hortega fellowships financed by Fondo de Investigaciones Sanitarias. B.L. is supported by European AIDS Clinical Society Medical Exchange Programme 2012. IdiPAZ AIDS and infectious diseases investigator group is partially supported by "Red de Investigación en SIDA" (AIDS Research Network) (RIS) RD07/0006/2007. M.E. received advisory fees and speaker fees from Viiv, Janssen, BMS, and Gilead. I.P. received advisory fees and speaker fees from Viiv, Janssen, BMS, Gilead, and MSD. J.R.A. received advisory fees and speaker fees and grant support from Viiv, Tibotec, Janssen, Abbott, BMS, Gilead, and MSD. The remaining authors have no conflicts of interest to disclose.

Presented in part at the 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, March 3–6, 2013, Atlanta, GA. Abstract #F-128.

Correspondence to: José R. Arribas, MD, Unidad VIH, Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario La Paz, IdiPAZ, Paseo de la Castellana 261, Madrid 28046, Spain (e-mail: joser.arribas@salud.madrid.org).

Copyright © 2014 by Lippincott Williams & Wilkins

INTRODUCTION

There is controversy about the importance of the number of drugs included in an antiretroviral regimen to prevent HIV-associated neurocognitive impairment. Protease inhibitor monotherapy might increase the risk of cerebrospinal fluid (CSF) viral escape.¹ In contrast, triple-drug antiretroviral therapy might increase the risk of central nervous system toxicity caused by nucleos(t)ides.^{2,3} Given the possible different pathogenic mechanisms, the pattern of neurocognitive impairment would possibly differ in patients receiving protease inhibitor monotherapy compared with patients receiving triple-drug antiretroviral therapy.

Several studies^{4–6} have compared rates of CSF viral escape and CSF concentrations of biomarkers possibly associated with HIV-related brain disease in patients receiving protease inhibitor monotherapy or triple-drug therapy. In the MOST clinical trial, monotherapy with lopinavir/ritonavir, even in aviremic subjects, was associated with raised CSF levels of S100B, suggesting early astrocytic damage.⁶ Importantly, these studies have included patients with and without neurocognitive impairment, a limitation that diminishes their ability to find differences between groups of patients.

To test the hypothesis of a different pattern of neurocognitive impairment in patients receiving protease inhibitor monotherapy, we have compared neurocognitive tests, CSF HIV detection, and concentrations of CSF biomarkers in 52 patients who were neurocognitively impaired and were receiving protease inhibitor monotherapy or triple-drug antiretroviral therapy.

PATIENTS AND METHODS

Study Design and Patients

This cross-sectional analysis was nested in a parent study comparing the prevalence of neurocognitive impairment in virologically suppressed patients receiving 2 nucleos(t)ide reverse transcriptase inhibitor plus boosted darunavir or lopinavir versus boosted darunavir or lopinavir monotherapy. Details of this study have been previously published.⁷

The study was conducted from April 2011 to June 2012. All patients who met criteria for neurocognitive impairment were offered to participate in the present study. CSF examination and plasma samples were obtained

from patients who accepted enrollment in the substudy and had signed informed consent. The local ethics committees approved the protocol.

Laboratory Methods

Plasma and CSF HIV viral loads were determined using Biomérieux NucliSens HIV-1 EasyQ v1.2 (Biomérieux, Madrid, Spain) or Roche Cobas AmpliPrep-Cobas TaqMan HIV-1, version 2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The detection limits of the assays are 25 and 20 HIV-RNA copies per milliliter, respectively.

Detection of HIV-RNA in CSF was also evaluated by an ultrasensitive-nested polymerase chain reaction (PCR). Viral RNA was extracted from 1000 μ L of CSF using an automated extraction system (easyMAG; BioMérieux) and eluted in 25 μ L. Synthesis of complementary DNA was performed using random hexamers and SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA). A fragment of the HIV pol gene, containing the reverse transcriptase and protease coding sequences, was amplified by a nested PCR approach. The first PCR reaction was performed using 20 μ L of complementary DNA in 50 μ L volume with the oligonucleotides EXT103F (5'-TAAATGGAGAAAATTAGTAGA-3') and EXT103R (5'-TTCTAAGTCAGATCCTACATA-3') (240 nM). The reaction was performed with 2.5 U of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen) and consisted of an initial denaturation step of 5 minutes at 95°C, followed by 45 cycles of 95°C for 30 seconds, 50°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds. The second PCR reaction was performed using 2 μ L of the first PCR product. The reaction was performed with 2 U of Biotools DNA polymerase (5 U/ μ L) (Biotools, Madrid, Spain), the oligonucleotide K103F (5'-GGAATACCA-CATCCYGCAGG-3'), and oligonucleotide K103R (5'-AATATTGCTGGTGATCCTTCC-3') (800 nM). Negative controls for the 2 PCR reactions were always included in parallel.

We measured CSF concentrations of adenosine deaminase, β 2 microglobulin, neuron-specific enolase, total tau protein, myelin basic protein, S100B protein, and IgG index or Tibbling IgG.

For human total tau protein, we used an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) microplate assay (Innotest; Innogenetics, Ghent, Belgium). Neuron-specific enolase levels were measured on the Modular Analytics E170 analyzer (ElecSys module) (Roche Diagnostics) using the electrochemiluminescence immunoassays technique. S100B levels were analyzed using an ELISA kit (Abnova), Neihu District, Taipei City, Taiwan. Adenosine deaminase activity was measured by an enzymatic assay on the Analyzer A25 (Biosystems, Barcelona, Spain). Myelin basic protein concentrations were quantified using a commercially available ELISA (Beckman Coulter, Brea, CA). β 2 microglobulin, IgG, and albumin concentrations were measured by nephelometry (Izasa SA, Barcelona, Spain). IgG index was calculated according to Tibbling formula [(CSF/serum IgG ratio)/(CSF/serum albumin ratio)].

Normal reference values were <320 mg/L for total proteins, <270 pg/mL for protein tau, <8.5 ng/mL for neuron-specific enolase, <3.0 U/L for adenosine deaminase,

<1.5 ng/mL for myelin basic protein, <1 mg/L for β 2 microglobulin, and <0.7 for IgG index.

Neurocognitive Assessment

All participants underwent a comprehensive neuropsychological assessment conducted by a psychologist blinded to treatment group. Full neurocognitive assessment included 14 tests, covering 7 cognitive domains: attention/working memory, executive functions, verbal fluency, speed of information processing, learning, memory, and motor skills. Best available normative data were used to calculate the Z score per participant per test. Two tests were applied to estimate the performance in each domain. Z score average of 2 tests was used as score of each domain. Neurocognitive impairment was defined following the American Association of Neurology 2007 criteria.⁸ To estimate the severity of impairment, we calculated global deficit score (GDS).⁹

Statistical Analysis

Descriptive data were presented as percentages or medians with interquartile ranges for continuous variables. The nonparametric Mann-Whitney *U* test and Kruskal-Wallis test were used to compare the qualitative and quantitative variables between triple therapy and monotherapy groups. A *P* value lower than 0.05 was considered significant. The analysis was performed using SSPS PC version 15.0 (SPSS, Chicago, IL).

RESULTS

Subject Characteristics

We included 52 neurocognitively impaired patients (Table 1). Compared with patients receiving triple-drug therapy, patients receiving protease inhibitor monotherapy were older, had fewer years of education, had a longer time since HIV diagnosis, had been longer on ART, and had a longer period of HIV viral load suppression. The prevalence of impaired cognitive domains and severity of global impairment by GDS were not statistically different between groups (Table 1). There was a trend (*P* = 0.06) toward more impairment in the motor skills domain in patients receiving monotherapy.

Biomarkers Concentrations and HIV Detection in CSF

Of the 52 patients with neurocognitive impairment, 30 consented to have a CSF examination (Table 2). A CSF viral load above 20 copies per milliliter was detected in 1 patient per group. In 1 patient receiving lopinavir/ritonavir monotherapy, the CSF HIV-RNA was 620 copies per milliliter and a minor resistance mutation (A71T) was detected by genotyping. Treatment was changed to abacavir/lamivudine plus lopinavir/ritonavir. Eight months later, CSF HIV viral load was undetectable. One patient in the triple therapy group was receiving tenofovir/emtricitabine plus darunavir/ritonavir, and the CSF HIV-RNA was 310 copies per milliliter. The patient has continued with the same antiretroviral treatment.

TABLE 1. Demographics, HIV Disease Status, Comorbidities, GDS, and Involvement of Cognitive Domains in Neurocognitively Impaired Patients Receiving Triple-Drug Therapy or Protease Inhibitor Monotherapy

	Triple Therapy (n = 30)	Monotherapy (n = 22)	P
Male, N (%)	24 (80)	14 (63.6)	0.22
Age, median (IQR)	43.2 (33.5–49.3)	48.9 (44.8–53.0)	0.01
Caucasian, N (%)	21 (70.0)	20 (90.9)	0.09
Way of transmission, N (%)			
Men who have sex with men	12 (40.0)	7 (31.8)	0.38
Men who have sex with women	10 (33.3)	8 (36.4)	
Intravenous drug user	8 (26.7)	5 (22.7)	
Other	0	2 (3.8)	
Years of education, median (IQR)	9.0 (7.0–12.2)	8.0 (5.0–9.25)	0.03
Prior AIDS diagnosis, N (%)	19 (63.3)	11 (50.0)	0.40
Years infected with HIV, median (IQR)	10.9 (6.1–15.6)	15.6 (11.9–18.0)	0.01
CD4 nadir (cells/mm ³), median (IQR)	95 (43–249)	204 (52–348)	0.18
Current CD4 (cells/mm ³), median (IQR)	546 (445–756)	754 (463–1091)	0.07
Years virologically suppressed, median (IQR)	4.3 (2.2–7.2)	7.6 (4.7–9.8)	0.02
Years of antiretroviral therapy, median (IQR)	9.9 (3.5–13.4)	12.6 (9.2–14.6)	0.04
Years of monotherapy, median (IQR)	NA	2.5 (1.5–3.0)	
Use of illicit drugs, N (%)			
Past	8 (27.6)	6 (27.3)	0.83
Current	10 (34.5)	6 (27.3)	
Prior neurological disease, N (%)	7 (23.3)	3 (13.6)	0.49
Prior psychiatric disease, N (%)	2 (6.7)	3 (13.6)	0.64
Prior medical disease,* N (%)	10 (33.3)	12 (54.5)	0.16
Hepatitis C, N (%)			
Past	4 (14.3)	5 (22.7)	0.64
Active	6 (21.4)	3 (13.6)	
Smoking, N (%)			
Past	6 (20)	5 (22.7)	0.97
Current	17 (56.7)	12 (54.5)	
GDS, median (IQR)	0.7 (0.5–1.2)	0.8 (0.6–1.2)	0.71
Patients with impairment† in domain, N (%)			
Motor skills	12 (40.0)	15 (68.2)	0.06
Verbal fluency	9 (30)	4 (18.2)	0.51
Learning	15 (50.0)	7 (31.8)	0.26
Memory	20 (66.7)	11 (50.0)	0.26
Speed of information processing	14 (46.7)	12 (54.5)	0.78
Executive function	6 (20.0)	3 (13.6)	0.71
Attention/working memory	18 (60.0)	11 (50.0)	0.58

*Medical disease: hypertension, dyslipaemia, diabetes mellitus, ischemic heart disease, heart insufficiency, chronic renal failure, thyroid disorders, and peripheral arterial disease.

†Defined as performance of at least 1 SD below the mean for age–education appropriate norms on the average score of 2 standardized neuropsychological tests. IQR, interquartile range.

TABLE 2. HIV-RNA Detection and Concentration of Biomarkers in the CSF of Neurocognitively Impaired Patients Receiving Triple-Drug Therapy or Protease Inhibitor Monotherapy

	Triple Therapy (n = 16)	Monotherapy (n = 14)	P
Detectable HIV-RNA			
Standard assay, N (%)	1 (6.3)	1 (7.1)	1.0
Ultrasensitive assay, N (%)	8 (50.0)	10 (71.4)	0.28
WBC <5 cells/μL, N (%)	16 (100)	14 (100)	0.85
Total protein, median (IQR), mg/L	350 (262–524)	353 (265–374)	0.47
Total tau, median (IQR), pg/mL	185 (105–257)	177 (103–311)	0.83
MBP, median (IQR), ng/mL	0.7 (0.4–0.9)	0.9 (0.4–1.6)	0.68
NSE, median (IQR), ng/mL	26.9 (15.0–32.8)	26 (23.6–32.3)	0.65
Tibbling IgG, median (IQR)	0.7 (0.5–1.3)	0.6 (0.5–0.7)	0.32
β2 microglobulin, median (IQR), mg/L	2 (1–2)	1 (1–2)	0.58
S100B* protein (IQR), pg/mL	246.8 (171–287.3)	252.4 (199.7–280.2)	0.79
ADA, median (IQR), U/L	4.7 (3.7–5.1)	4.8 (3.5–6.1)	0.91

*S100B determined in 6 patients receiving triple therapy and 13 receiving monotherapy because of not enough remaining samples available.

ADA, adenosine deaminase; IQR, interquartile range; MBP, myelin basic protein; NSE, neuron-specific enolase; WBC, white blood cells.

HIV detection in CSF by nested PCR was high in both groups (50% in patients receiving triple therapy and 71.4% in patients receiving monotherapy). There were no statistical significant differences between groups in HIV-RNA detection rates ($P = 0.28$).

All patients had a CSF leukocyte count of less than 5 cells per microliter, including the 2 patients with CSF viral escape by routine testing. The median levels of total proteins and adenosine deaminase were slightly higher than upper limit of normal range in both groups. The median level of neuron-specific enolase was 3 times greater than the upper limit of normal range in both groups. The tau and myelin basic protein concentrations and IgG Tibbling were within the laboratory's normal range in both groups. We found no statistically significant differences in levels of CSF biomarkers, including S100B protein, between the 2 groups of treatment (Table 2).

Finally, we determined whether the patients with detectable HIV-RNA in CSF by nested PCR showed higher levels of biomarkers and greater severity of global impairment by GDS than patients without detectable HIV-RNA. In patients on protease inhibitor monotherapy, we found no differences in adenosine deaminase, β2 microglobulin, neuron-specific enolase, total tau protein, myelin basic protein, S100B protein, and IgG index in relation to the HIV-RNA detection in CSF. In patients on triple therapy, we observed a higher level of β2 microglobulin in patients without detectable HIV-RNA ($P = 0.070$). There were no

differences in the severity of global impairment by GDS based on the HIV-RNA detection in CSF in all samples ($P = 0.839$) and by the group of treatment ($P = 0.839$ for monotherapy group and $P = 0.721$ for triple therapy group).

DISCUSSION

We have found a similar pattern of neurocognitive impairment in HIV-infected patients receiving prolonged treatment with protease inhibitors as monotherapy or as part of a triple-drug regimen. Involvement of different cognitive domains, severity of neurocognitive impairment, CSF viral escape, and CSF concentrations of biomarkers were similar in both groups of therapy. There were no significant differences between treatment groups in GDS or impaired cognitive domains. Our detailed evaluation does not suggest a differential expression of neurocognitive impairment in patients receiving protease inhibitor monotherapy.

Using standard assays, we did not find a higher rate of CSF viral escape in neurocognitively impaired patients receiving protease inhibitor monotherapy. This result together with a prior study⁵ does not support that CSF viral escape, defined by standard HIV detection assays, is the predominant mechanism of neurocognitive impairment in patients receiving protease inhibitor monotherapy.

We detected residual HIV-1 RNA in the CSF of half of the patients receiving triple therapy and 70% of patients receiving monotherapy. In recent studies,^{5,10-12} the proportion of patients with residual HIV detection in CSF has varied widely from 6% to 40%, although the studies used different methods. The nested PCR method used in this study was developed for single genome sequencing¹² and readily detects 1 copy per reaction, which in our setup would mean a lower limit in the range of 1 copy per milliliter. In contrast with this study, none of the prior studies has evaluated only patients with neurocognitive impairment. It is tempting to speculate that the higher frequency of residual HIV-RNA detection in our series could be related to the fact that all of our patients were neurocognitively impaired and that residual HIV detection in CSF might be associated to neurocognitive impairment. However, in the absence of a control group without neurocognitive impairment, this hypothesis should be taken with caution. Of note, in our series, detectable HIV-RNA in CSF was not associated with worse GDS results, in contrast with the results presented by Letendre et al.¹³ It is also possible that technical differences in ultrasensitive methods might explain the different reported prevalences of residual HIV-CSF replication.

There were no differences between groups in the CSF concentrations of biomarkers associated with immunoreactivation (ADA and $\beta 2$ microglobulin), neuronal damage (neuron-specific enolase and total tau), or demyelination (myelin basic protein). In the MOST study, increased CSF concentrations of the astrocytic marker S100B⁶ were found in patients receiving protease inhibitor monotherapy who did not have neurocognitive impairment. Our study results do not support MOST investigators' hypothesis that S100B could be an early marker of HIV-related damage to the brain, particularly in patients receiving monotherapy. Although all of our patients had neurocognitive impairment, levels of S100B were not ele-

vated regardless of the antiretroviral therapy received. Interestingly, only neuron-specific enolase had a CSF concentration consistently elevated in both groups. Neuron-specific enolase has not been studied in HIV-associated neurocognitive impairment.¹⁴

To the best of our knowledge, this is the largest comparative study of neurocognitively impaired patients receiving 1 versus 3 antiretrovirals. However, patients receiving monotherapy were younger, had higher nadir and latest CD4 counts, and were virologically suppressed in plasma for a longer period. It is possible that these imbalances had an impact in CSF viral escape and GDS scores. Besides, the analysis is limited because of its small sample size, which limits our power to find differences. Our panel of brain damage biomarkers might not be sensitive enough to detect more subtle differences between groups. Finally, the lack of a control group without HIV infection, or with HIV infection but without neurocognitive impairment, complicates the interpretation of our findings. Even with these limitations, we believe that this study helps rule out a large difference in the pattern of neurocognitive impairment between groups receiving very different antiretroviral strategies.

In summary, we have shown that if a patient develops neurocognitive impairment in the setting of adequate HIV suppression in plasma, the pattern/severity of neurocognitive impairment, the concentration of biomarkers in CSF, and the rates of HIV-RNA detection in CSF do not seem to be related to the number of antiretrovirals that the patient is receiving. Our results need to be confirmed in studies with larger sample size and prospective design.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr Dolores Montero for assistance with plasma HIV-RNA determinations. The authors also thank all the patients who volunteered to participate in the study and to the study nurses Blanca Arribas and Marta Galvez.

REFERENCES

- Perez-Valero I, Bayon C, Cambron I, et al. Protease inhibitor monotherapy and the CNS: peace of mind? *J Antimicrob Chemother.* 2011;66:1954-1962.
- Clifford DB. Therapeutic conundrum: AIDS therapies may be double-edged swords. *Neurology.* 2010;74:1248-1249.
- Robertson K, Liner J, Meeker RB. Antiretroviral neurotoxicity. *J Neurovirol.* 2012;18:388-399.
- Bunupuradah T, Chetchotisakd P, Jirajariyavej S, et al. Neurocognitive impairment in patients randomized to second-line lopinavir/ritonavir-based antiretroviral therapy vs. lopinavir/ritonavir monotherapy. *J Neurovirol.* 2012;18:479-487.
- Santos JR, Muñoz-Moreno JA, Moltó J, et al. Virological efficacy in cerebrospinal fluid and neurocognitive status in patients with long-term monotherapy based on lopinavir/ritonavir: an exploratory study. *PLoS One.* 2013;8:e70201.
- Pasquier Du RA, Jilek S, Kalubi M, et al. Marked increase of the astrocytic marker S100B in the cerebrospinal fluid of HIV-infected patients on LPV/r-monotherapy. *AIDS.* 2013;27:203-210.
- Pérez-Valero I, Gonzalez-Baeza A, Estébanez M, et al. Neurocognitive impairment in patients treated with protease inhibitor monotherapy or triple drug antiretroviral therapy. *PLoS One.* 2013;8:e69493.
- Antinori A, Arendt G, Becker JT, et al. Updated research nosology for HIV-associated neurocognitive disorders. *Neurology.* 2007;69:1789-1799.

J Acquir Immune Defic Syndr • Volume 67, Number 4, December 1, 2014 *PI Monotherapy and Neurocognitive Impairment*

9. Carey CL, Woods SP, Gonzalez R, et al. Predictive validity of global deficit scores in detecting neuropsychological impairment in HIV infection. *J Clin Exp Neuropsychol*. 2004;26:307–319.
10. Yilmaz A, Verhofstede C, D'Avolio A, et al. Treatment intensification has no effect on the HIV-1 central nervous system infection in patients on suppressive antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010; 55:590–596.
11. Dahl V, Lee E, Peterson J, et al. Raltegravir treatment intensification does not alter cerebrospinal fluid HIV-1 infection or immunoreactivation in subjects on suppressive therapy. *J Infect Dis*. 2011;204: 1936–1945.
12. Palmer S, Kearney M, Maldarelli F, et al. Multiple, linked human immunodeficiency virus type 1 drug resistance mutations in treatment-experienced patients are missed by standard genotype analysis. *J Clin Microbiol*. 2005;43:406–413.
13. Letendre S, McClellan D, Ellis R, et al. Persistent HIV in the central nervous system during treatment is associated with worse ART penetration and cognitive impairment. Paper presented at: 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; February 8–11, 2009; Montreal, Canada. Abstract 484b.
14. Brew BJ, Letendre SL. Biomarkers of HIV related central nervous system disease. *Int Rev Psychiatry*. 2008;20:73–88.

A Prospective Cohort Study of Neurocognitive Function in Aviremic HIV-Infected Patients Treated With 1 or 3 Antiretrovirals

Ignacio Pérez-Valero,¹ Alicia González-Baeza,¹ Miriam Estébanez,¹ Susana Monge,³ María L. Montes-Ramírez,¹ Carmen Bayón,² Federico Pulido,⁴ José I. Bernardino,¹ Francisco X. Zamora,¹ Juan J. González-García,¹ María Lagarde,⁴ Asunción Hernando,⁵ Francisco Amalich,¹ and José R. Arribas¹

¹HIV Unit–Internal Medicine Service, and ²Psychiatry Service, Hospital Universitario La Paz–IdiPAZ, ³Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III, and ⁴HIV Unit–Internal Medicine Service, Hospital Universitario 12 de Octubre, i+12, Madrid, and ⁵Departamento de Especialidades Médicas, Universidad Europea de Madrid, Villaviciosa de Odón, Spain

(See the Editorial Commentary by Letendre on pages 1635–7.)

Background. The evolution of neurocognitive performance in aviremic human immunodeficiency virus (HIV)-positive patients treated with <3 antiretrovirals is unknown.

Methods. We prospectively included aviremic (≥ 1 year) HIV-positive patients, without concomitant major neurocognitive confounders, currently receiving boosted lopinavir or darunavir as monotherapy ($n = 67$) or triple antiretroviral therapy (ART) ($n = 67$) for ≥ 1 year. We evaluated neurocognitive function (7 domains) at baseline and after 1 year. We performed analysis of covariance to evaluate if 1 additional year of exposure to monotherapy compared with triple ART had an effect on Global Deficit Score (GDS) changes after adjustment for potential confounders. We also compared the evolution of neurocognitive performance and impairment rates.

Results. Intention-to-treat analysis showed that monotherapy did not influence 1-year GDS change after adjustment for significant confounders (age, ethnicity, duration of therapy, hepatitis C virus status, and HOMA-IR index); the adjusted effect was -0.04 (95% confidence interval, -0.14 to $.05$; $P = .38$). Neurocognitive stability was observed with monotherapy and triple therapy (GDS crude mean change, -0.09 [95% confidence interval, -0.16 to -0.01] vs -0.08 [-0.14 to -0.02]), after 1 year of follow-up, similar proportions of patients changed neurocognitive status from impaired to unimpaired (monotherapy, 4 of 18 [22.2%]; triple therapy, 4 of 19 [21.1%]; $P = .91$) and vice versa (monotherapy, 5 of 44 [10.2%] and triple therapy, 3 of 45 [6.3%]; $P = .48$). Similar results were observed in an on-treatment analysis and with use of clinical ratings instead of GDS changes.

Conclusions. The number of antiretrovirals included in the ART regimen does not seem to influence the evolution of neurocognitive function in HIV-infected patients with suppressed plasma viremia.

Keywords. HIV-1; protease inhibitor monotherapy; neurocognitive evolution; lopinavir; darunavir.

Antiretroviral therapy (ART) is able to protect against severe cases of HIV-associated neurocognitive disorders (HAND)—such as HIV dementia [1]—but apparently

cannot completely protect against the milder forms of HAND [2]. Indeed, a number of studies have demonstrated a high prevalence of milder forms of HAND in patients receiving effective ART [3, 4]. It is unknown why ART may be ineffective protection against mild forms of HAND. Several studies have found higher rates of HAND in patients treated with ART regimens characterized by poor central nervous system penetration effectiveness (CPE) ranks [5, 6]. Based on these findings, it has been postulated that patients receiving ART regimens with poor CPE might have a higher risk of HAND [7–9].

Received 14 April 2014; accepted 25 June 2014; electronically published 11 August 2014.

Correspondence: Ignacio Pérez-Valero, MD, Unidad VIH–Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario La Paz–IdiPAZ, Paseo de la Castellana 261, 28046 Madrid, Spain (ignacio.perez@salud.madrid.org).

Clinical Infectious Diseases® 2014;59(11):1627–34

© The Author 2014. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.
DOI: 10.1093/cid/ciu640

The lack of knowledge about the importance of low CPE ranks in patients receiving nucleoside-sparing regimens is worrisome because an increasing number of patients are being exposed to these ART combinations. Clinical trials are evaluating dual combinations of a boosted protease inhibitor and a second drug (an integrase inhibitor [10–12] or lamivudine [13]), monotherapy with a boosted protease inhibitor [14], or a dual combination of an integrase inhibitor and rilpivirine [15]. It is not known whether these unconventional ART regimens can provide enough protection against HAND.

Three published studies—2 cross-sectional observations and 1 small clinical trial—have compared the neurocognitive function of patients receiving monotherapy or triple therapy for maintenance of viral suppression [16–18]. The results of the 2 cross-sectional studies were inconclusive because of the limitations inherent to their design [16, 17]. The clinical trial had to be stopped prematurely owing to a high rate of virological failure in patients randomized to receive monotherapy [18]. For these reasons, the question about the importance of the number of antiretroviral drugs for the prevention of HAND remains unanswered.

To elucidate whether prolonged exposure to protease inhibitor monotherapy may increase the risk of HAND, we performed what is to our knowledge the first prospective cohort study to compare the neurocognitive evolution between aviremic HIV-infected patients treated with boosted protease inhibitor monotherapy and those receiving triple-drug ART.

PATIENTS AND METHODS

Study Design

We designed a 1-year longitudinal study to compare change in neurocognitive function of HIV-positive aviremic patients (HIV RNA, <50 copies/mL for ≥ 1 year) treated with darunavir-ritonavir or lopinavir-ritonavir as monotherapy or as triple therapy with tenofovir-emtricitabine or abacavir-lamivudine. We enrolled native Spanish-speaking patients from a parent cross-sectional study focused on the prevalence of neurocognitive impairment in patients receiving triple therapy or monotherapy. Details of this study have been published elsewhere [16]. We offered the longitudinal follow-up study to all the patients included in the cross-sectional study. Patients enrolled in the longitudinal study were managed according to routine clinical practice.

This longitudinal study included 1 visit after 1 year of follow-up. At the follow-up visit patients underwent a second comprehensive neurocognitive evaluation, performed by a psychologist blinded to the ART regimen and using the same methods as in the parent study [16]. Briefly, we followed the 2007 consensus established by the American Association of Neurology for the diagnosis of HAND (Supplementary Table 1) [19]. In the absence of normative standards specific for the HIV-infected population in Madrid or norms for change over time for

Spanish populations, test results were assessed with the best normative standards available for the general Spanish population. Follow-up neurocognitive test results were not adjusted by the learning effect.

To estimate overall neurocognitive performance we used 2 methods that are highly concordant, the Global Deficit Score (GDS) [20] and clinical ratings (CRs) [21]. Although the GDS is more specific for detecting variations of neurocognitive performance in patients presenting neurocognitive deficits, CRs are more sensitive in detecting subtle variations in neurocognitive performance in patients with normal performance [21]. In the absence of standardized methods for a Spanish population, we defined neurocognitive decline as a GDS change (follow-up minus baseline result) of >0.5 and a CR change of >1 (to increase detection in patients with normal neurocognitive performance).

At the follow-up visit, we reevaluated adherence to treatment, use of illicit drugs, and presence of comorbid conditions. We also obtained a fasting blood plasma sample, which was processed using standard methods in the sites' certified clinical laboratories. Levels of glucose, insulin, and lipid fractions were measured to calculate the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) ($\text{insulin [mU/mL]} \times \text{glucose [mmol/L]} / 22.5$) and the total cholesterol/high-density lipoprotein ratio. Current CD4 cell count and HIV-1 viral load were determined using flow cytometry and automatized RNA extraction with an AmpliPrep instrument (Roche Diagnostics), respectively, followed by quantification with the COBAS Amplicor Monitor HIV-1 test version. Viral load was categorized as not detected, <50 copies/mL, or >50 copies/mL.

All study procedures were conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. The local ethics committees for clinical research and the institutional review board of each participant hospital approved the protocol and all the above-described procedures. All participants provided written informed consent before study inclusion.

Statistical Analysis

Our primary objective was to evaluate the effect of protease inhibitor monotherapy compared with triple therapy on the evolution of neurocognitive performance. Our secondary objectives were to compare patients receiving monotherapy or triple therapy with regard to neurocognitive performance, overall and by ability domains, neurocognitive decline, and the proportion who changed from neurocognitively impaired to unimpaired and vice versa. These objectives were primary analyzed using an "intention-to-treat" approach that included all patients. However, because ART switches were allowed during follow-up, we performed an "on-treatment" analysis, excluding ART switches and virological failures.

To evaluate our primary objective, we used 2 methods. First, we used analysis of covariance to estimate the effect—fitted by linear

regression—of receiving monotherapy on GDS at follow-up, adjusted by baseline GDS, using the triple therapy group as reference. This result was then adjusted by the neurocognitive cofounders (Supplementary Table 2) that changed the relation between monotherapy and follow-up GDS by $\geq 15\%$. Second, as a sensitivity analysis, we fitted a linear regression directly over the values of GDS change (GDS at follow-up minus baseline GDS). The first method has the advantage of providing more accurate measurements, avoiding the bias known as *regression to the mean*. We also repeated all the analyses using CRs instead of GDSs, searching for a more subtle effect of monotherapy in the subgroup of patients with normal neurocognitive performance. All analyses were performed using Stata statistical package software (version 11.1; Stata Corp). All tests were 2 sided, and differences were considered significant at $P < .05$.

RESULTS

Baseline Characteristics

Of the 191 patients included in the parent cross-sectional study, 57 refused to participate in the prospective study because lack of interest or time. Therefore, we included 134 patients in this prospective study, half of them receiving monotherapy and the other half triple therapy. We compared the baseline characteristics of those patients who accepted to participate with those who declined to participate and found no statistically significant differences between groups (Supplementary Table 3).

After 1 year, there were no losses to follow-up, and 129 patients (96.3%) remained aviremic. During follow-up, 1 patient receiving triple therapy experienced transient loss of virological suppression, and another ended the study with a detectable viral load. None of them developed genotypic resistance mutations. Three patients receiving monotherapy lost HIV suppression without developing genotypic resistance mutations and were successfully reintensified with 2 nucleosides.

In 17 patients receiving triple therapy at baseline, a clinical decision was made to switch the ART regimen owing to adverse events associated with the current regimen; 9 patients were switched to a protease inhibitor plus lamivudine, 3 to darunavir-ritonavir monotherapy, 2 to atazanavir-ritonavir, 2 to nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitors, and 1 to elvitegravir-cobicistat. No switches in ART regimen were due to neurocognitive impairment.

The 22 patients (16.4%) in whom the ART regimen was switched or who became viremic during follow-up were included in the intention-to-treat analyses and excluded from the on-treatment sensitivity analyses. Compared with the 112 patients included in the on-treatment analyses, patients who changed ART regimens or lost HIV suppression after baseline were more frequently receiving triple therapy (86.4% vs 42.9%; $P < .01$), had received ART for a longer time (mean, 12.4 ± 5.4

Table 1. Baseline Characteristics by Treatment Group

Characteristic	Triple Therapy (n = 67)	Monotherapy (n = 67)	P Value
Male sex, No. (%)	47 (70.2)	49 (73.1)	.70
Age, mean (SD)	44.6 (8.6)	48.2 (8.4)	.02
Geographic origin, No. (%)			
Spain	51 (76.1)	64 (95.5)	<.01
Other countries	16 (23.9)	3 (4.5)	
Means of HIV transmission, No. (%)			
Sexual	40 (59.7)	41 (61.2)	.88
Intravenous	22 (32.8)	21 (31.3)	
Other	5 (7.5)	5 (7.5)	
Educational level, mean (SD), y	11.0 (4.1)	10.5 (4.9)	.51
AIDS diagnosis, No. (%)	44 (65.7)	43 (64.2)	.86
Duration of HIV infection, mean (SD), y	14.5 (6.9)	16.8 (5.8)	.07
Duration of virological suppression, mean (SD), y	5.7 (3.7)	7.6 (3.4)	<.01
HIV RNA not detected, No. (%)	48 (70.8)	39 (56.2)	.09
CD4 cell count, mean (SD), cells/mm ³			
Nadir	157.8 (115.2)	191.2 (139.5)	.13
Current	619.2 (277.6)	629.0 (254.5)	.84
Duration of ART, mean (SD), y			
Total	10.6 (5.9)	13.2 (4.8)	.01
Triple therapy	10.6 (5.9)	10.1 (5.4)	.48
Monotherapy	. . . (. . .)	3.1 (2.0)	. . .
Adherence level <100%, No. (%)	18 (28.1)	15 (22.4)	.45
Hepatitis C, No. (%)			
Never	34 (50.8)	38 (56.7)	.35
Cured	14 (20.9)	17 (25.4)	
Active	19 (28.4)	12 (17.9)	
Ever received interferon, No. (%)	9 (13.4)	16 (23.9)	.12
Prior comorbid conditions, No. (%)			
Neurological	7 (10.5)	7 (10.5)	>.99
Psychiatric	17 (25.4)	18 (26.9)	.84
Medical	28 (41.8)	38 (56.7)	.08
Use of nonprescribed drugs ever, No. (%)	33 (49.3)	31 (46.3)	.73
Framingham risk score >20%, No. (%)	1 (1.5)	3 (4.5)	.26
HOMA-IR index, median (IQR)	1.8 (1.0–3.1)	2.1 (1.4–3.5)	.24
Cholesterol (total/HDL ratio), median (IQR)	3.9 (3.3–4.7)	4.3 (3.6–5.6)	.03

Abbreviations: ART, antiretroviral therapy; HDL, high-density lipoprotein; HIV, human immunodeficiency virus; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; IQR, interquartile range; SD, standard deviation.

vs 9.3 ± 5.4 years; $P = .01$), and had a higher rate of neurological comorbid conditions (22.7% vs 8%; $P = .04$).

Table 1 shows baseline characteristics of the 134 patients included in the study divided by treatment groups. We found the following significant differences between groups: patients who received monotherapy were older, more frequently Spanish, had a longer exposure to ART and a longer time of HIV suppression and had a higher total cholesterol/high-density lipoprotein levels.

Effect of Monotherapy on Neurocognitive Evolution

Table 2 shows the crude and adjusted effects of monotherapy on follow-up GDS (adjusted by baseline GDS) and on GDS change (sensitivity analysis). We found that exposure to 1 additional year of monotherapy did not have a significant effect on GDS at follow-up, adjusted by baseline GDS, nor on change in GDS. This lack of effect for monotherapy was also observed after adjustment for significant cofounders (age, total duration of ART, geographic origin, hepatitis C coinfection, and the HOMA index). Results were similar for intention-to-treat analysis (effect, -0.04 ; 95% confidence interval, -0.14 to $.05$) and on-treatment analysis (0.02 ; -0.12 to $.09$). Results were similar when CRs were used instead of GDSs (Table 2).

Change in Neurocognitive Performance

Estimates of global neurocognitive performance are provided in Table 2. We did not find differences in 1-year changes in GDS or CRs between monotherapy and triple therapy patient groups. Results were also similar for intention-to-treat and on-

treatment analyses. Neurocognitive stability was observed for all levels of neurocognitive performance with both ART strategies (Figure 1). Neurocognitive performance by individual ability domains at baseline and at follow-up (Figure 2) showed similar results for monotherapy and triple therapy groups (all $P > .05$).

Neurocognitive Decline

Rates of neurocognitive decline were similar in monotherapy and triple therapy patient groups. Neurocognitive decline by GDS was observed in 1 patient (1.5%) receiving triple therapy and 2 (3%) receiving monotherapy ($P = .56$). Of these 3 patients with neurocognitive decline by GDS, none had switched ART regimens or lost virological suppression during follow-up.

With CRs used as the measure, 16 patients (23.9%) receiving triple therapy and 12 (18.18%) receiving monotherapy were classified as having neurocognitive decline ($P = .42$). Of these 28 patients, 7 had switched ART regimens or lost viral suppression during follow-up.

Neurocognitive Impairment Evolution

Table 3 shows the proportion of patients classified as neurocognitively impaired or unimpaired at baseline and at follow-up by therapy groups. After 1 year, 3 patients in the triple therapy and 5 in the monotherapy group had changed from unimpaired to impaired ($P = .48$). Four patients each in the triple therapy and monotherapy groups had changed from neurocognitively impaired to unimpaired ($P = .91$).

Table 2. Crude and Adjusted Effect of Monotherapy on 1-Year Neurocognitive Changes by Different Estimates

Measure of Neurocognitive Change	Intention-to-Treat Analysis			On-Treatment Analysis		
	Triple Therapy (n = 67; 50.0%)	Monotherapy (n = 67; 50.0%)	P Value	Triple Therapy (n = 48; 42.8%)	Monotherapy (n = 64; 57.2%)	P Value
GDS						
Baseline, mean (SD)	0.44 (0.57)	0.37 (0.39)	.38	0.51 (0.65)	0.37 (0.39)	.16
Follow-up mean (SD)	0.37 (0.51)	0.28 (0.45)	.31	0.40 (0.57)	0.29 (0.46)	.25
Crude change, mean (95% CI)	$-0.08 (-0.14 \text{ to } -.02)$	$-0.09 (-0.16 \text{ to } -.01)$.82	$-0.11 (-0.18 \text{ to } -.03)$	$-0.08 (-0.15 \text{ to } -.01)$.61
Effect of monotherapy on change, mean (95% CI)						
Crude	1	$-0.02 (-0.11 \text{ to } .07)$.60	1	$-0.01 (-0.10 \text{ to } .11)$.92
Adjusted	1	$-0.04 (-0.14 \text{ to } .05)$.38	1	$-0.02 (-0.12 \text{ to } .09)$.78
CRs						
Baseline, mean (SD)	4.22 (1.92)	3.76 (2.08)	.40	4.29 (2.05)	3.86 (1.93)	.34
Follow-up, mean (SD)	3.88 (1.99)	3.21 (1.99)	.12	3.85 (2.13)	3.22 (2)	.11
Crude change, mean (95% CI)	$-0.46 (-0.83 \text{ to } -.1)$	$-0.7 (-1.13 \text{ to } -.27)$.32	$-0.67 (-1.1 \text{ to } -.24)$	$-0.44 (-0.86 \text{ to } -.01)$.31
Effect of monotherapy on change, mean (95% CI)						
Crude	1	$-0.33 (-0.85 \text{ to } .19)$.22	1	$-0.35 (-0.92 \text{ to } .23)$.24
Adjusted	1	$-0.26 (-0.84 \text{ to } .31)$.36	1	$-0.25 (-0.87 \text{ to } .37)$.43

Abbreviations: CI, confidence interval; CRs, clinical ratings; GDS, Global Deficit Score; SD, standard deviation.

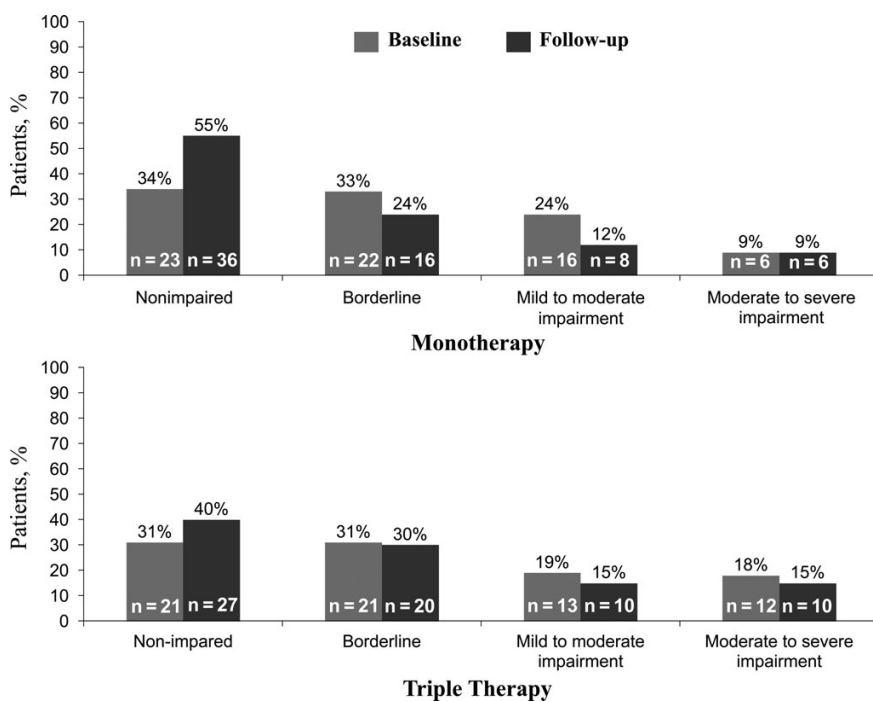


Figure 1. Global neurocognitive performance according to treatment group, as measured by clinical ratings at baseline and at 1-year follow-up.

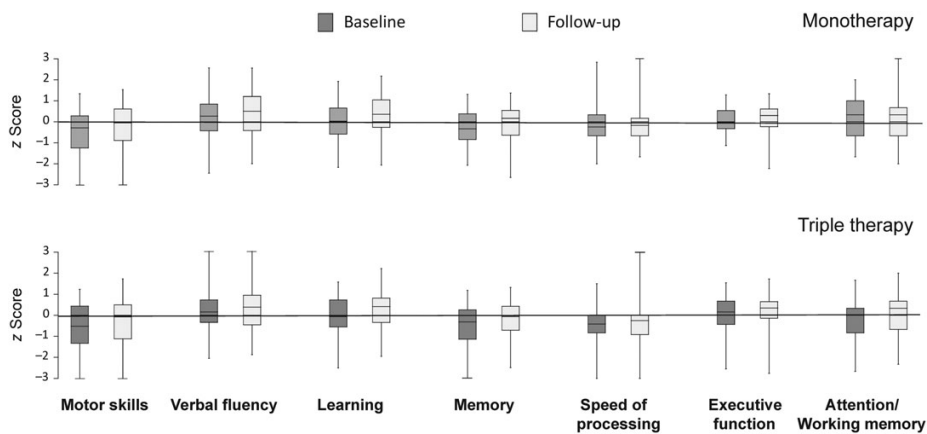


Figure 2. Neurocognitive performance distributed by ability domains in patients receiving monotherapy or triple therapy, at baseline and at 1-year follow-up.

Table 3. Prevalence of Neurocognitive Impairment by Treatment Group at Baseline and After 1 Year of Follow-up^a

Impairment Category	Patients, No. (%)			
	Monotherapy (n = 67)		Triple Therapy (n = 67)	
	Baseline	Follow-up	Baseline	Follow-up
Nonimpaired	49 (73.1)	48 (71.6)	48 (71.6)	49 (73.1)
Impaired	18 (26.9)	19 (28.4)	19 (28.4)	18 (26.9)
Change from impaired to unimpaired	...	4 (22.2)	...	4 (21.1)
Change from unimpaired to impaired	...	5 (10.2)	...	3 (6.3)

^a Neurocognitive impairment as defined by the American Association of Neurology in 2007 [19].

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first prospective study to perform a detailed comparison of the neurocognitive evolution in HIV-positive patients treated with 1 or 3 antiretrovirals. In our cohort of aviremic patients with good immunological status, we found that protease inhibitor monotherapy did not have a negative effect on the evolution of neurocognitive performance after 1 year of follow-up.

In our multivariate analysis, the adjusted effect of monotherapy on 1-year change in GDS was very small and not significant in either the intention-to-treat or the on-treatment analysis. The results did not change when we performed the analysis using CRs instead of GDSs. We also found consistent results between therapy groups when we compared the proportions of patients who changed from neurocognitively impaired to unimpaired or vice versa. These events occurred with similar frequencies in patients receiving both types of ART. Finally, longitudinal changes in individual ability domain test scores were also similar in both groups.

Our results are supported by previous cross-sectional studies finding no difference in the prevalence of neurocognitive impairment between aviremic patients receiving monotherapy or triple therapy [16, 17]. Furthermore, 2 prospective studies have evaluated neurocognitive changes in patients receiving protease inhibitor monotherapy. In the setting of virological failure, the STAR clinical trial showed similar rates of neurocognitive impairment after 1 year of follow-up in Thai patients in whom nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitor-based regimens failed, before and after switching to lopinavir-ritonavir monotherapy or lopinavir-ritonavir and tenofovir-lamivudine [22]. Recently, the PIVOT clinical trial has shown similar neurocognitive evolution in aviremic patients receiving monotherapy or triple therapy after a

median of 44 months of follow-up [23]. In contrast with our comprehensive evaluation, neurocognitive function was evaluated with a more limited battery of neuropsychological tests in the STAR and PIVOT trials.

Few studies have longitudinally followed neurocognitive function in aviremic patients receiving triple ART, as we did. The RASTA clinical trial found cognitive stability, with improvement in some ability domains, after 48 weeks in aviremic patients switched from different ART regimens to raltegravir plus abacavir-lamivudine or tenofovir-emtricitabine [24]. In the ASSURE clinical trial, neurocognitive function measured by CogState remained stable in aviremic patients randomized to continue on tenofovir, emtricitabine, and atazanavir-ritonavir or switch to abacavir-lamivudine and unboosted atazanavir after 24 weeks of follow-up [25].

Antiretroviral therapy regimens with poor CPE ranks have been associated with cerebrospinal fluid viral escape [5, 6] and worse neurocognitive functioning [7–9]. These observations have been used to question the ability of protease inhibitor monotherapy to protect neurocognitive functioning. In our longitudinal study, the risk of neurocognitive decline was similarly low in both therapy groups. This finding strengthens previous cross-sectional observations of similar prevalences of HAND in patients receiving monotherapy or triple therapy [16, 17]. These data also suggest that CPE rank is not applicable to patients receiving monotherapy.

Vassallo and colleagues [26] have reported that lower CPE ranks predicted neurocognitive worsening in a prospective cohort of 96 HIV-infected patients followed up for up to 2 years [26]. In sharp contrast with our study, only 58% of the patients in their study were aviremic at baseline. We believe this is a critical distinction. Indeed, Letendre et al [6] have reported that plasma HIV RNA suppression is a more important predictor of cerebrospinal fluid HIV RNA suppression than CPE rank. We believe that the neuroprotective effect of maintaining plasma HIV suppression—a requirement to continue protease inhibitor monotherapy—prevails over the number of drugs needed to maintain plasma suppression.

Alternative hypotheses may explain the lack of a negative effect of monotherapy on cognitive evolution. A recent meta-analysis of 23 studies found that the beneficial effects of ART on neurocognition seem to result from the capacity of ART to recover immune function [27]. If this hypothesis is true, ART type might have little influence on cognition in our patients with good immunological status. Reduced neurotoxicity is another hypothesis that can explain the favorable neurocognitive profile of monotherapy. Protease inhibitors have reduced Microtubule-associated protein 2 (MAP-2) neurotoxicity [28], and use as monotherapy avoids the possible neurotoxic side effects associated with some nucleoside reverse-transcriptase inhibitors [29–32]. Finally, in the CHARTER cohort [4],

neurocognitive decline was associated with ART failure, ART discontinuation, low current CD4 cell count, or presence of severe comorbid conditions. Patients in our study had high CD4 cell counts, seldom experienced virological failure, and did not have severe comorbid conditions. These factors might explain the low rate of neurocognitive events observed in our patients regardless of the number of antiretrovirals received.

Our study had a number of limitations. First, it was not randomized, and we therefore cannot rule out the possibility that a selection bias producing baseline differences between the monotherapy and triple therapy groups influenced our results. We tried to minimize this bias by selecting patients receiving triple therapy who were also potential candidates to receive monotherapy and by adjusting our analysis by known neurocognitive confounders. Second, sample sizes were relatively small, and type II error is a possibility. However, we believe that our results rule out a large difference in the risk of neurocognitive impairment between groups of therapy. Third, we assumed that the effect of monotherapy on neurocognitive performance was constant over time, when it is possible that the effect might be episodic.

Fourth, it is possible that longer follow-up is necessary to find differences in neurocognitive performance evolution. We consider this possibility unlikely, however, because other studies with similar follow-up have already found significant changes in neurocognitive functioning [8, 24, 33]. Furthermore, in our prior cross-sectional study, we did not find a higher prevalence of neurocognitive impairment in patients with prolonged exposure to monotherapy. On the contrary, rates of neurocognitive impairment seemed inversely associated with duration of monotherapy [16]. Fifth, results were not corrected by the learning effect, and the thresholds used to define neurocognitive decline in our study lack definitive validation. These factors might lead to an underestimation of the incidence of neurocognitive impairment or decline, but it is unlikely that they would affect the comparison of GDS change between therapy groups. Sixth, the triple therapy group had more foreigners, but all were native Spanish speakers, and we do not believe that this factor significantly influenced our results after adjustment. Finally, our results apply only to patients without major neurocognitive confounders who were adherent to therapy and good immunological status and a long history of plasma virological suppression.

Our results are important because they indicate that the risk of neurocognitive impairment in patients with prolonged viral suppression, treated with unconventional regimens, do not seem to be substantially increased. Although protease inhibitor monotherapy is not recommended in all guidelines, it is possible that other nuc-sparing combinations, such as a boosted protease inhibitor and lamivudine or raltegravir, will be more frequently used given their good results in antiretroviral-naïve or antiretroviral-experienced patients [11–13].

In conclusion, protease inhibitor monotherapy for maintenance of plasma HIV suppression does not seem to be associated with worse neurocognitive evolution or a higher incidence of neurocognitive impairment than triple-drug ART therapy after 1 year of prospective follow-up. Our findings suggest that in patients with durable virological plasma suppression and good immunological status, the number of antiretrovirals included in the regimen does not influence the evolution of neurocognitive function.

Supplementary Data

Supplementary materials are available at *Clinical Infectious Diseases* online (<http://cid.oxfordjournals.org>). Supplementary materials consist of data provided by the author that are published to benefit the reader. The posted materials are not copyedited. The contents of all supplementary data are the sole responsibility of the authors. Questions or messages regarding errors should be addressed to the author.

Notes

Acknowledgments. We thank all the patients who volunteered to participate in the study and the study nurses Juan Miguel Castro, Mario Mayoral, Blanca Arribas, Raquel Martín Jara, and Marta Galvez.

Financial support. This work was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III (grant PI10/00483); grant from the Juan Rodes Program to I. P. V.; the Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (i+12) (fellowship to M. L.); and Red de Investigación en SIDA (AIDS Research Network) (grant RD07/0006/2007 to the IdiPAZ AIDS and Infectious Diseases investigator group).

Potential conflicts of interest. I. P.-V. is a member of the Gilead Speaker Bureau and has received honoraria from Merck Sharp & Dohme (MSD), Gilead Sciences, Janssen-Cilag, ViiV Healthcare, and Bristol-Myers Squibb (BMS) for lectures. M. L. M.-R. has received consulting fees from Abbott Pharmaceuticals, Boehringer Ingelheim, Janssen-Cilag, Gilead Sciences, and ViiV Healthcare and payment for lectures from Abbott Pharmaceuticals, BMS, and Roche. F. P. has received consultancy and lecture fees from AbbVie, BMS, Janssen-Cilag, Gilead Sciences, MSD, and ViiV Healthcare. J. I. B. has received research funding, consultancy fees, or lecture sponsorships from Abbott Pharmaceuticals, Gilead Sciences, BMS, ViiV Healthcare, Janssen-Cilag, and Boehringer Ingelheim. J. J. G.-G. has received advisory and speaker fees from AbbVie, BMS, Gilead, Janssen-Cilag, MSD, Roche, and ViiV Healthcare. M. L. has received lecture sponsorships from AbbVie, BMS, and Janssen-Cilag. F. A. has received research funding from BMS and Sanofi-Aventis. J. R. A. has received advisory fees, speaker fees, and grant support from ViiV Healthcare, Tibotec, Janssen-Cilag, AbbVie, BMS, Gilead Sciences, MSD, and Tobira. All other authors report no potential conflicts.

All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

1. Dille JW, Schwarcz S, Loeb L, Hsu L, Nelson K, Scheer S. The decline of incident cases of HIV-associated neurological disorders in San Francisco, 1991–2003. *AIDS* 2005; 19:634–5.
2. Robertson KR, Smurzynski M, Parsons TD, et al. The prevalence and incidence of neurocognitive impairment in the HAART era. *AIDS* 2007; 21:1915–21.
3. Heaton RK, Franklin DR, Ellis RJ, et al. HIV-associated neurocognitive disorders before and during the era of combination antiretroviral therapy: differences in rates, nature, and predictors. *J Neurovirol* 2011; 17:3–16.

4. Heaton RK, Clifford DB, Franklin DR Jr, et al. HIV-associated neurocognitive disorders persist in the era of potent antiretroviral therapy: CHARTER Study. *Neurology* **2010**; 75:2087–96.
5. Letendre S, McCutchan J, Childers M, et al. Enhancing antiretroviral therapy for human immunodeficiency virus cognitive disorders. *Ann Neurol* **2004**; 56:416–23.
6. Letendre S, Marquie-Beck J, Capparelli E, et al. Validation of the CNS penetration-effectiveness rank for quantifying antiretroviral penetration into the central nervous system. *Arch Neurol* **2008**; 65:65–70.
7. Cysique LA, Maruff P, Brew BJ. Variable benefit in neuropsychological function in HIV-infected HAART-treated patients. *Neurology* **2006**; 66:1447–50.
8. Tozzi V, Balestra P, Salvatori MF, et al. Changes in cognition during antiretroviral therapy: comparison of 2 different ranking systems to measure antiretroviral drug efficacy on HIV-associated neurocognitive disorders. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2009**; 52:56–63.
9. Smurzynski M, Wu K, Letendre S, et al. Effects of central nervous system antiretroviral penetration on cognitive functioning in the ALLRT cohort. *AIDS* **2011**; 25:357–65.
10. Raffi F, Babiker AG, Richert L, et al. Ritonavir-boosted darunavir combined with raltegravir or tenofovir-emtricitabine in antiretroviral-naïve adults infected with HIV-1: 96 week results from the NEAT001/ANRS143 randomised non-inferiority trial. *Lancet* **2014**; S0140-6736:61170–3.
11. Paton NI, Kityo C, Hoppe A, et al. Assessment of second-line antiretroviral regimens for HIV therapy in Africa. *N Engl J Med* **2014**; 371:234–47.
12. SECOND-LINE Study Group, Boyd MA, Kumarasamy N, et al. Ritonavir-boosted lopinavir plus nucleoside or nucleotide reverse transcriptase inhibitors versus ritonavir-boosted lopinavir plus raltegravir for treatment of HIV-1 infection in adults with virological failure of a standard first-line ART regimen (SECOND-LINE): a randomised, open-label, non-inferiority study. *Lancet* **2013**; 381:2091–9.
13. Cahn P, Andrade-Villanueva J, Arribas JR, et al. Dual therapy with lopinavir and ritonavir plus lamivudine versus triple therapy with lopinavir and ritonavir plus two nucleoside reverse transcriptase inhibitors in antiretroviral-therapy-naïve adults with HIV-1 infection: 48 week results of the randomised, open label, non-inferiority GARDEL trial. *Lancet Infect Dis* **2014**; 14:572–80.
14. Janssen-Cilag International NV, sponsor. A clinical trial comparing efficacy of darunavir/ritonavir monotherapy versus a triple combination therapy containing the darunavir/ritonavir and 2 nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors in patients with undetectable plasma HIV-1 RNA on current treatment. Bethesda, MD: National Library of Medicine (US), **2000**. Available at: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01448707?term=PROTEA&rank=1>. Accessed 23 March 2014.
15. Margolis D, Brinson C, Eron J, et al. 744 and rilpivirine as two-drug oral maintenance therapy: LAI116482 (LATTE) week 48 results [abstract 91LB]. In: Program and abstracts of the 21st Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (Boston). San Francisco, CA: International Antiviral (formerly AIDS) Society-USA (IAS-USA), **2014**:134.
16. Pérez-Valero I, González-Baeza A, Estébanez M, et al. Neurocognitive impairment in patients treated with protease inhibitor monotherapy or triple drug antiretroviral therapy. *PLoS One* **2013**; 8:e69493.
17. Santos JR, Muñoz-Moreno JA, Moltó J, et al. Virological efficacy in cerebrospinal fluid and neurocognitive status in patients with long-term monotherapy based on lopinavir/ritonavir: an exploratory study. *PLoS One* **2013**; 8:e70201.
18. Gutmann C, Cusini A, Günthard HF, et al. Randomized controlled study demonstrating failure of LPV/r monotherapy in HIV: the role of compartment and CD4-nadir. *AIDS* **2010**; 24:2347–54.
19. Antinori A, Arendt G, Becker JT, et al. Updated research nosology for HIV-associated neurocognitive disorders. *Neurology* **2007**; 69:1789–99.
20. Carey CL, Woods SP, Gonzalez R, et al. Predictive validity of global deficit scores in detecting neuropsychological impairment in HIV infection. *J Clin Exp Neuropsychol* **2004**; 26:307–19.
21. Blackstone K, Moore DJ, Franklin DR, et al. Defining neurocognitive impairment in HIV: deficit scores versus clinical ratings. *Clin Neuropsychol* **2012**; 26:894–908.
22. Bunupuradah T, Chetochitsakd P, Jirajariyavej S, et al. Neurocognitive impairment in patients randomized to second-line lopinavir/ritonavir-based antiretroviral therapy vs. lopinavir/ritonavir monotherapy. *J Neurovirol* **2012**; 18:479–87.
23. Paton N, Stöhr W, Arenas-Pinto A, et al. Randomised controlled trial of a PI monotherapy switch strategy for long-term HIV management (the PIVOT trial) [abstract 550]. In: Program and abstracts of the 21st Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (Boston). San Francisco, CA: International Antiviral (formerly AIDS) Society-USA (IAS-USA) **2014**:364.
24. Fabbiani M, Mondì A, Colafigli M, et al. Safety and efficacy of treatment switch to raltegravir plus tenofovir/emtricitabine or abacavir/lamivudine in patients with optimal virological control: 48-week results from a randomized pilot study (Raltegravir Switch for Toxicity or Adverse Events, RASTA Study). *Scand J Infect Dis* **2014**; 46:34–45.
25. Robertson K, Maruff P, Wohl D, et al. Similar cognition outcomes after 24 weeks for tenofovir/FTC + atazanavir/r (ATV/r)-experienced HIV+ subjects or those simplifying to abacavir/3TC + ATV [abstract 410]. In: Program and abstracts of the 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (Atlanta). Alexandria, VA: Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), **2013**:233.
26. Vassallo M, Duranta J, Biscaya V, et al. Can high central nervous system penetrating antiretroviral regimens protect against the onset of HIV-associated neurocognitive disorders? *AIDS* **2014**; 28:493–501.
27. Al-Khindi T, Zakzakis KK, van Gorp WG. Does antiretroviral therapy improve HIV-associated cognitive impairment? a quantitative review of the literature. *J Int Neuropsychol Soc* **2011**; 17:956–69.
28. Robertson K, Liner J, Meeker RB. Antiretroviral neurotoxicity. *J Neurovirol* **2012**; 18:388–99.
29. Carr A. Toxicity of antiretroviral therapy and implications for drug development. *Nat Rev Drug Discov* **2003**; 2:624–34.
30. Akay C, Cooper M, Odeleye A, et al. Antiretroviral drugs induce oxidative stress and neuronal damage in the central nervous system. *J Neurovirol* **2014**; 20:39–53.
31. Nolan D, Mallal S. Complications associated with NRTI therapy: update on clinical features and possible pathogenic mechanisms. *Antivir Ther* **2004**; 9:849–63.
32. Zhang Y, Song F, Gao Z, et al. Long-term exposure of mice to nucleoside analogues disrupts mitochondrial DNA maintenance in cortical neurons. *PLoS One* **2014**; 9:e85637.
33. Robertson KR, Su Z, Margolis DM, et al. Neurocognitive effects of treatment interruption in stable HIV-positive patients in an observational cohort. *Neurology* **2010**; 74:1260–6.

D. RESUMEN

1. OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

El objetivo general de la presente tesis doctoral fue evaluar la seguridad neurocognitiva del tratamiento antirretroviral con inhibidores de proteasa potenciados con ritonavir en monoterapia. Para ello se seleccionó una muestra de pacientes infectados por VIH con al menos 1 año de supresión viral en plasma y sin comorbilidades neurocognitivas confusoras que recibían tratamiento antirretroviral con lopinavir o darunavir potenciado con ritonavir en monoterapia o acompañado por dos análogos de nucleós(t)idos (terapia triple).

Para evaluar la seguridad neurocognitiva de los pacientes tratados con inhibidores de proteasa en monoterapia se establecieron 7 objetivos específicos, que son el objeto de la presente tesis doctoral:

- 1) Comparar la prevalencia de deterioro neurocognitivo entre los pacientes que recibían tratamiento con monoterapia vs. terapia triple.
- 2) Determinar si existe asociación, cruda o ajustada por cofactores neurocognitivos, entre la presencia de deterioro neurocognitivo y el uso de monoterapia, utilizando como referencia la terapia triple.
- 3) Evaluar diferencias en el perfil de funcionamiento neurocognitivo de pacientes que recibían tratamiento con monoterapia vs. terapia triple.
- 4) Comparar los porcentajes de escape viral y los niveles de inflamación en el LCR en el subgrupo de pacientes diagnosticados de deterioro neurocognitivo basalmente que recibían tratamiento con monoterapia vs. terapia triple.

- 5) Evaluar diferencias en la evolución neurocognitiva global y por dominios cognitivos de los pacientes que iniciaron tratamiento con monoterapia o con terapia triple tras un año de seguimiento.
- 6) Comparar las incidencias de deterioro neurocognitivo, de resolución del deterioro neurocognitivo y de declinar neurocognitivo entre los pacientes que iniciaron el tratamiento recibiendo monoterapia vs. terapia triple.
- 7) Evaluar si la monoterapia favorece un cambio de la función neurocognitiva más desfavorable que el observado tras un año de seguimiento en pacientes tratados con terapia triple, de forma cruda y tras ajustar por otras comorbilidades.

2. APORTACIONES DEL DOCTORANDO

Las contribuciones realizadas por el doctorando para evaluar la seguridad neurocognitiva del tratamiento con lopinavir o darunavir potenciados con ritonavir en monoterapia en pacientes infectados por el VIH con control virológico estable, han sido las siguientes:

- a) Selección de las pruebas neurocognitivas que iban a componer la evaluación neurocognitiva del estudio.
- b) Redacción del protocolo del estudio, del cuaderno de recogida de datos, del consentimiento informado a pacientes y de la base de datos del estudio.
- c) Presentación del estudio a las agencias reguladoras (AEMPS y CEIC) para su aprobación.
- d) Selección e inclusión de pacientes en el estudio.

- e) Corrección y evaluación de los resultados de la batería neurocognitiva aplicada a los pacientes del estudio por las psicólogas del mismo. Categorización del grado de deterioro neurocognitivo de cada paciente. Información al paciente de los resultados obtenidos.
- f) Despistaje de comorbilidades neurocognitivas en los pacientes diagnosticados de deterioro neurocognitivo consistente en la realización de una anamnesis dirigida, una exploración neurológica completa y una punción lumbar. Evaluación de los resultados obtenidos y categorización del tipo de deterioro del paciente en incidental, contribuyente o confusor.
- g) Introducción de datos en el cuaderno de recogida de datos del estudio y control de calidad de los datos introducidos.
- h) Diseño del plan estadístico y análisis de datos en colaboración con el metodólogo del estudio.
- i) Elaboración de los artículos en los que aparezco como primer firmante y supervisión, junto con el Dr. Arribas de la redacción del resto de artículos generados a raíz del presente proyecto de tesis doctoral.

Además de estas contribuciones, el doctorando ha servido de nexo entre los diferentes equipos implicados en este trabajo altamente multidisciplinar. Las tareas de coordinación realizadas por el doctorando han sido las siguientes: Coordinación con los clínicos de la consulta de VIH del Hospital Doce de Octubre para la inclusión de pacientes en dicho centro. Coordinación del procesamiento de los biomarcadores en LCR realizado por el grupo de Respuesta Inmune Innata de IDIPAZ (grupo 20). Coordinación del procesamiento de las muestras microbiológicas del estudio y más concretamente de la realización de las cargas virales ultrasensibles por miembros del grupo de Microbiología Molecular de IDIPAZ (grupo 18). Coordinación de los psicólogos implicados en el proyecto en los centros participantes.

Fruto del estudio de las diferentes temáticas implicadas y de su contacto directo con los grupos que las desarrollan, el doctorando ha aportado una perspectiva interdisciplinar entre las diferentes áreas y una comprensión de conceptos en los tres grupos, permitiendo el diseño óptimo y el seguimiento de los experimentos; la interpretación y discusión de los resultados y la posterior publicación de los mismos.

3. METODOLOGIA

3.1. Sujetos

Para la realización de la presente tesis doctoral se seleccionaron pacientes en seguimiento en las consultas de VIH del Hospital Universitario La Paz y del Hospital Universitario Doce de Octubre que cumplieran los siguientes criterios de selección (tabla 5) y que accedieron mediante consentimiento informado por escrito a participar en el mismo.

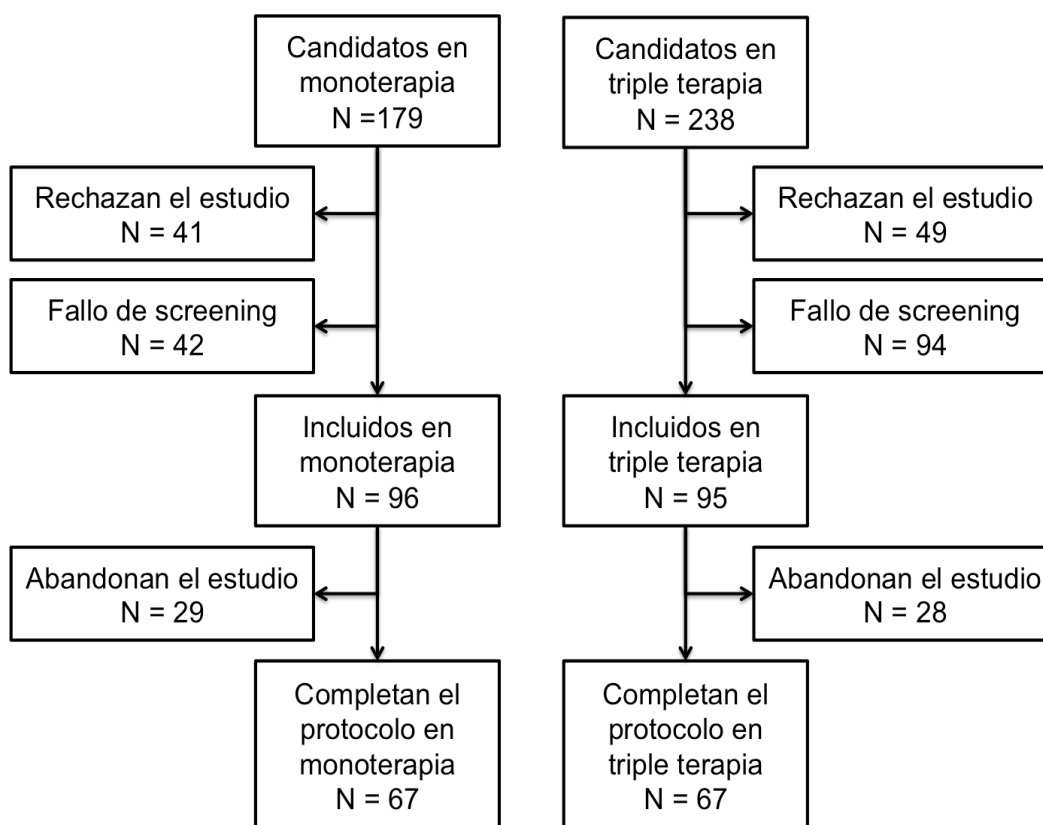
El flujo de pacientes que fueron pre-seleccionados, incluidos en el estudio y que completaron todos los procedimientos del mismo se presentan en la figura 6:

Tabla 5. Criterios de selección del estudio PICASSO

Criterios de inclusión
Paciente en tratamiento con LPV/r o DRV/r asociado a 2 análogos de nucleós(t)idos o en monoterapia.
Paciente con CV indetectable durante el último año (se admite 1 blip aislado durante el periodo).

Criterios de exclusión
Presencia de alteraciones motoras que puedan alterar el resultado del estudio neurocognitivo.
Diagnóstico de retraso mental o de demencia de cualquier etiología.
Diagnóstico de enfermedad psiquiátrica grave (excluyendo depresión mayor resuelta hace >3 meses).
Enfermedad activa que afecte al SNC (encefalopatías, tumores, infecciones, ACVA).
Consumo activo de drogas con un claro impacto en las actividades diarias o síndrome de abstinencia.
Enfermedad definitiva de SIDA activa.
Cirrosis descompensada, VHC en tratamiento activo o presencia de una enfermedad sistémica activa.

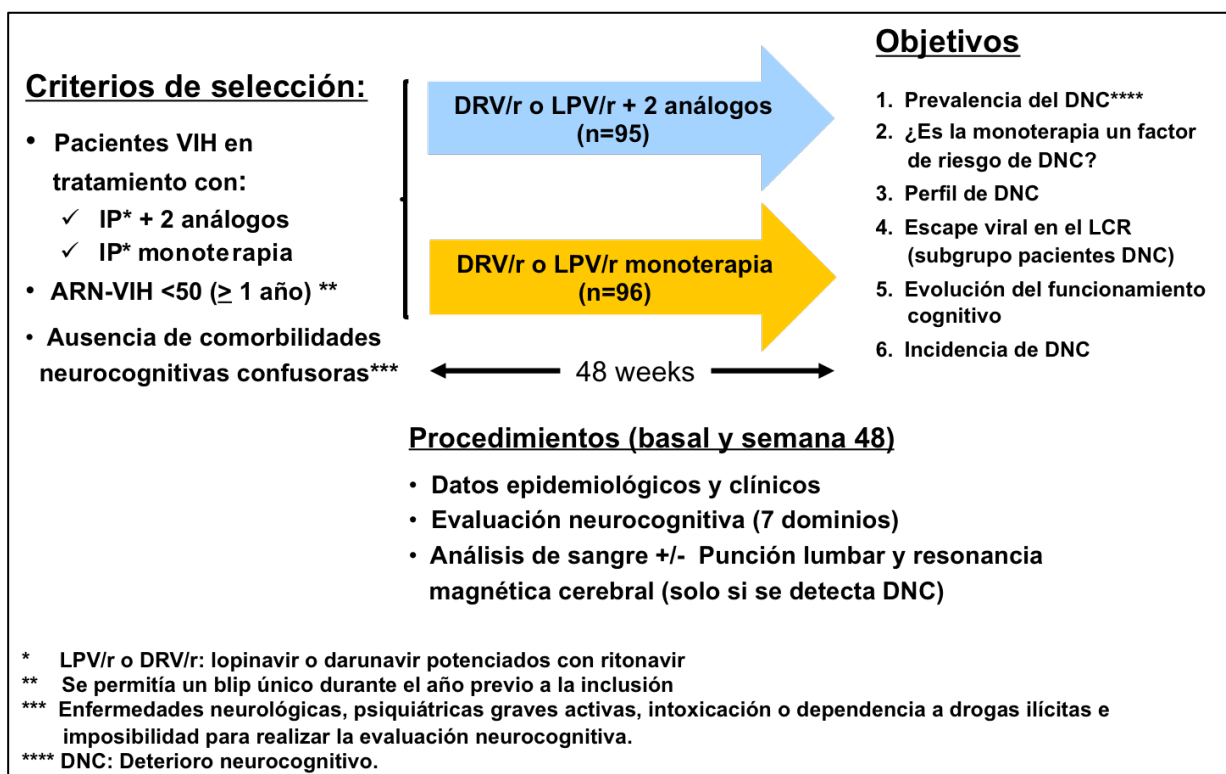
Figura 6: Flujo de pacientes del estudio



3.2. Diseño del estudio

El diseño y desarrollo del presente proyecto de tesis doctoral fue el siguiente:

Figura 7: Esquema del estudio



El estudio comprendía dos visitas, una basal y otra al año de seguimiento. Durante el periodo entre visitas los pacientes eran seguidos por sus médicos habituales de acuerdo a las normas de práctica clínica establecidas en sus respectivas unidades de VIH y a las guías de práctica clínica de GESIDA vigentes en ese momento [139]. Adicionalmente en cada visita, cada paciente completó una evaluación de su funcionamiento neurocognitivo y se sometió a un análisis de sangre.

A aquellos pacientes que fueron diagnosticados de deterioro neurocognitivo se les ofreció completar el estudio etiológico de deterioro neurocognitivo de acuerdo con las recomendaciones establecidas por el grupo de expertos de GESIDA para el diagnóstico de esta entidad [148]. Este estudio incluyó la realización de una punción lumbar y una resonancia magnética cerebral. Cincuenta pacientes fueron

diagnosticados de deterioro neurocognitivo basalmente, de los que 30 aceptaron someterse al estudio etiológico de ésta entidad.

En cada visita se recogieron, mediante entrevista y revisión de la historia clínica, los siguientes datos clínicos: Perfil socio-demográfico (edad, nacionalidad, etnia, género, nivel de educación); Historia de consumo de tabaco, alcohol y drogas ilícitas (tabaco, alcohol, marihuana, hachís, mórficos incluido metadona, cocaína y drogas de diseño); aspectos relacionados con la infección por VIH: Tiempo desde el diagnóstico de VIH, tiempo desde el inicio del tratamiento antirretroviral, tiempo desde el inicio del tratamiento antirretroviral actual, tiempo desde el último blip, nadir de CD4, categoría del CDC, vía de transmisión de la infección VIH, tipo de tratamiento antirretroviral actual, cambio del tratamiento antirretroviral durante el seguimiento, número de blips durante el seguimiento y fracaso virológico durante el seguimiento.

Presencia de comorbilidades médicas: hipertensión arterial, dislipemia, tumores, hepatitis C, hepatitis B, insuficiencia renal crónica, cardiopatía isquémica, insuficiencia cardíaca, enfermedad arterial periférica, alteraciones tiroideas, cirrosis hepática. Presencia de comorbilidades neurológicas: Encefalopatía de cualquier causa, infarto cerebral, accidente isquémico transitorio, infección del sistema nervioso central, traumatismo cerebral, epilepsia, neurosífilis, otras enfermedades del SNC. Presencia de comorbilidades psiquiátricas: Trastornos psicóticos y trastornos del estado de ánimo y ansiedad recogidos a través de la escala hospitalaria de ansiedad y depresión.

Tratamiento concomitante; Nivel auto-reportado de adherencia al tratamiento antirretroviral durante los 30 días previos a la visita; éxitus, hospitalización o pérdida del seguimiento; Resultados del análisis de sangre; Resultados del análisis del LCR cuando estaba disponible; Y resultados de la evaluación neurocognitiva.

3.3. Desarrollo de los objetivos del estudio

El primer objetivo de la tesis, comparar la prevalencia de deterioro neurocognitivo de los pacientes tratados con un lopinavir o darunavir potenciado con ritonavir en monoterapia vs. en terapia triple, se completó mediante el análisis de las evaluaciones del funcionamiento neurocognitivo realizadas en la visita basal del estudio. Para realizar este análisis, los pacientes que recibían monoterapia fueron divididos en dos subgrupos en función del tiempo en monoterapia (≤ 2 años vs > 2 años).

El segundo objetivo, determinar, de forma cruda y ajustada por otros cofactores confusores, si la monoterapia se asocia con la presencia de deterioro neurocognitivo, se realizó igualmente mediante el análisis de los resultados del funcionamiento neurocognitivo basal y de las potenciales comorbilidades neurocognitivas confusoras identificadas: Edad, género, raza, factor de riesgo de transmisión del VIH, años recibiendo tratamiento antirretroviral, años de supresión virológica, presencia de un único blip previo, niveles de CD4 (nadir y actual), años de educación, uso de drogas ilícitas, presencia de comorbilidades médicas, neurológicas o psiquiátricas, coinfección por el virus de la hepatitis c, uso de estatinas, nivel de triglicéridos, ratio colesterol total/HDL e índice HOMA-IR. Al igual que para el objetivo 1 los pacientes en monoterapia se dividieron en dos subgrupos en función del tiempo en monoterapia (≤ 2 años vs > 2 años).

El tercero de los objetivos, evaluar diferencias en el perfil de funcionamiento neurocognitivo de los pacientes que recibían tratamiento con monoterapia vs. terapia triple, se realizó igualmente analizando los resultados obtenidos en cada uno de los tests utilizados para evaluar el funcionamiento neurocognitivo basal de los pacientes incluidos en el estudio.

El cuarto objetivo de la tesis, comparar los porcentajes de escape viral y de inflamación en el LCR observados en pacientes diagnosticados de deterioro neurocognitivo que recibían tratamiento antirretroviral con monoterapia vs. terapia

triple, se realizó analizando los niveles de carga viral y los biomarcadores cuantificados en LCR en el subgrupo de pacientes diagnosticados basalmente de deterioro neurocognitivo, que accedieron a realizarse el estudio etiológico del mismo.

El quinto de los objetivos, evaluar si existen diferencias en la evolución neurocognitiva global y por dominios cognitivos de los pacientes que iniciaron tratamiento con monoterapia o con terapia triple, se realizó mediante la comparación del cambio del funcionamiento neurocognitivo medido por Z-scores, GDS y CR entre la visita basal y la de seguimiento.

El sexto de los objetivos, comparar las incidencias de deterioro neurocognitivo, de resolución del deterioro neurocognitivo y de declinar neurocognitivo entre los pacientes que iniciaron el tratamiento recibiendo monoterapia vs. terapia triple, se estimó analizando aparición o desaparición del deterioro neurocognitivo entre las visitas basal y de seguimiento y el cambio observado en el GDS y el CR.

Por último, el séptimo de los objetivos, evaluar, de forma cruda y tras ajustar por otras comorbilidades, si la monoterapia favorece un cambio de la función neurocognitiva más desfavorable que el observado tras un año de seguimiento en pacientes tratados con terapia triple, se realizó mediante la comparación del funcionamiento neurocognitivo medido por GDS en la visita de seguimiento ajustado por el funcionamiento neurocognitivo basal de cada paciente y por las comorbilidades que impactasen de forma significativa esa relación.

3.4. Técnicas utilizadas

Como hemos enunciado previamente, para la consecución de los objetivos recogidos en el presente proyecto de tesis doctoral se utilizaron las siguientes técnicas: Evaluación de la función neurocognitiva; Determinación de biomarcadores en sangre; Realización de punción lumbar y determinación de

biomarcadores en LCR; Y determinación ultrasensible de la carga viral del VIH.

3.4.1. Técnica 1: Evaluación de la función neurocognitiva

Para la evaluación del funcionamiento neurocognitivo en este estudio se utilizaron 14 pruebas neurocognitivas escogidas para detectar alteraciones en el funcionamiento de los 7 dominios cognitivos más frecuentemente afectados por la infección por VIH. En la tabla 6 se recogen los dominios evaluados, las pruebas utilizadas y los baremos empleados.

Tabla 6. Batería neurocognitiva utilizada en el estudio PICASSO

Dominios y pruebas neurocognitivas	Estudios normativos
Atención/memoria de trabajo	
<i>WAIS-III Digit Span</i>	N=2450 (edad: 16-89). Población americana. [149]
Flexibilidad mental	
<i>Stroop Colour and Word Test</i>	N=300 (edad 15-90). Población americana. [150]
<i>Trail making Test form B</i>	N=223 (edad 16-80). Población Española. [151]
Fluidez verbal	
<i>Controlled Oral Word Association Test (FAS)</i>	N=1300 (edad 16-95). Población americana. [152]
<i>Categoy fluency (Animals)</i>	N=1300 (edad 16-95). Población americana. [152]
Velocidad de procesamiento de la información	
<i>Trail Making Test Form A</i>	N=233 (edad 16-80). Población española. [151].

<i>WAIS-III Digit symbol</i>	N=2450 (edad 16-89). Población americana. [149].
<i>WAIS-III symbol search</i>	N=2450 (edad 16-89). Población americana. [149].
Aprendizaje	
<i>Verbal Selective Reminding test</i>	N=884 (edad 15-93). Población española. [153].
<i>Brief Visuospatial Memory test-revised</i>	N=588 (edad 18-79). Población americana. [154].
Recuerdo demorado	
<i>Verbal selective reminding test</i>	N=884 (edad 15-93). Población española. [153].
<i>Brief Visuospatial memory test-revised</i>	N=588 (edad 18-79). Población americana. [154].
Función motora fina	
<i>Grooved pegboard test-dominant hand</i>	N=1616 (edad 10-60). Población americana. [155].
<i>Grooved pegboard test-non dominant hand</i>	N=1616 (edad 10-60). Población americana. [155].
Funcionamiento premórbido	
<i>WAIS-III vocabulary subtest</i>	N=2450 (edad 16-89). Población americana. [149].

La selección y aplicación de las pruebas neurocognitivas se realizó siguiendo los criterios establecidos en 2007 por el grupo de expertos de la Asociación Americana de Neurología, para el diagnóstico de los trastornos neurocognitivos asociados al VIH [93]. Para asegurar la imparcialidad del examinador, nos aseguramos que el profesional que realizaba cada evaluación desconocía el tratamiento antirretroviral que recibía el paciente en ese momento.

Para cada prueba se obtuvo una puntuación cruda, la cual se ajustó, mediante la aplicación de estudios normativos (tabla 6), por el funcionamiento observado en el subgrupo poblacional que comparte las características demográficas del paciente evaluado. Mediante esta transformación se transformaron los valores crudos en z-scores (número de desviaciones estándar de la puntuación obtenida por el paciente respecto a la media poblacional) y estos z-scores a su vez se normalizaron en forma de t-scores ($t\text{-score} = 50 - z\text{-score} \times 10$).

De acuerdo con los criterios del grupo de expertos de la Asociación Americana de Neurología establecidos en 2007, se calculó la puntuación media de los z-score de las pruebas que evaluaban el funcionamiento del mismo dominio cognitivo (2 pruebas por dominio), con el fin de calcular la puntuación z-score para cada uno de los 7 dominios cognitivos evaluados. Igualmente se determinó, siguiendo los mismo criterios, que un paciente presentaba deterioro neurocognitivo si presentaba un z-score inferior a -1 (-1 desviación estándar sobre la media poblacional) en al menos dos de los 7 dominios cognitivos evaluados.

Tabla 7. Tabla de conversión de los T-Score en *deficit score* y *domain score*.

T-score	Déficit Score	Rating Score	Descriptor del deterioro
≥ 50	0	1	Normal
49 – 45	0	2	Normal
44 – 40	0	3	Normal
39 – 35	1	5	Leve
34 – 30	2	6	Leve-moderado
29 – 25	3	7	Moderado
24 – 20	4	8	Moderado-severo
≤ -19	5	9	Severo

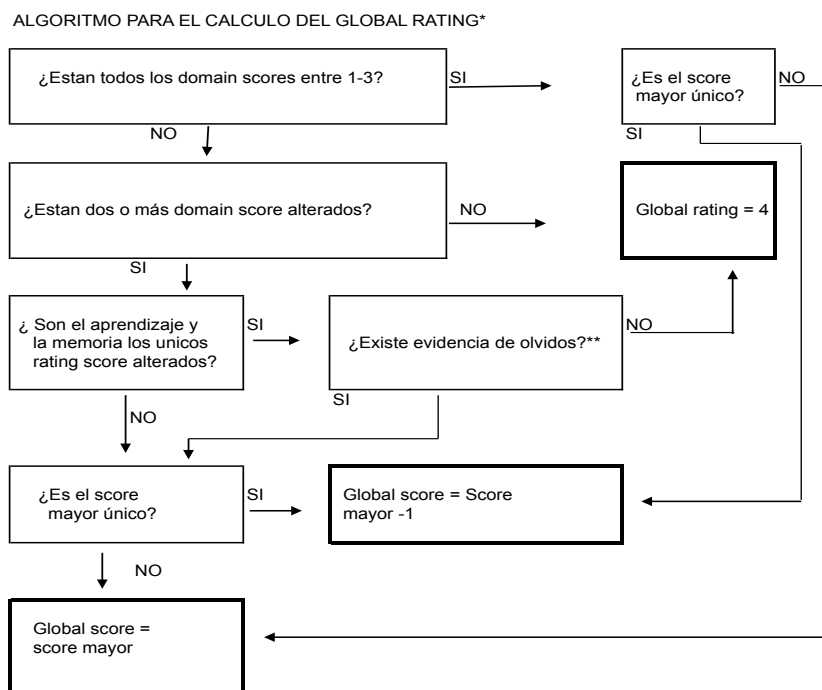
De forma adicional a esta determinación cualitativa de la función neurocognitiva

(deterioro vs. no deterioro), se estimó de forma cuantitativa el funcionamiento neurocognitivo de los pacientes mediante dos técnicas, el “*global deficit score*” (GDS) [110] y el “*Clinical rating*” (CR) [109]. Se utilizaron dos técnicas en vez de una para maximizar las posibilidades de encontrar diferencias en el funcionamiento neurocognitivo, al ser el GDS más sensible para detectar cambios en el funcionamiento neurocognitivo y el CR más específico [109].

El GDS se calcula como el resultado medio de los “*deficit score*” obtenidos a partir de los resultados T-score de cada test (tabla 7).

El GRS es más laborioso de calcular. Tras calcular los “*domain score*” para cada dominio cognitivo, debe aplicarse un algoritmo diagnóstico para calcular el CR (figura 8).

Figura 8. Algoritmo para el cálculo del CR



* Si 2 o menos domain scores faltan o si más de 2 faltan y al menos 2 de los disponibles están deteriorados (>=5), se usan los valores disponibles para calcular el global rating. En el resto no se puede calcular.

** Comparar los T-score de los test de memoria principales y los T-score de los test de memoria secundarios. Si al menos una pareja tiene ambos scores <40 (alterados) entonces existe evidencia de olvido.

3.4.2. Técnica 2: Determinación de biomarcadores en sangre

La determinación de biomarcadores en sangre se realizó mediante venopunción. La técnica empleada fue la estándar. Para su realización primero se procedió a seleccionar una vena adecuada en la cara anterior de la flexura del codo (venas basilica, cefálica o cubital media). Posteriormente se introdujo una palomilla, con receptáculo para botes de vacío incorporado, en la vena con un ángulo de aproximadamente 45°, la cual se reorientó en dirección paralela una vez que se ha penetrado en la luz de la vena para recoger la sangre.

Las muestras de sangre se recogieron en los siguientes tubos estériles de vacío tipo VACUTAINER (*Becton, Dickinson and Company*. Durham, Estados Unidos): Hematimetría (tubo con EDTAK₂ de 5ml), Bioquímica (tubo con gelosa de 5ml), Coagulación (tubo con citrato sódico de 5ml), Carga viral de VIH (tubo con gel separador y EDTAK₂ de 10ml), Linfocitos CD4+ (tubo con EDTAK₂ de 5ml), serología (tubo sin anticoagulante, con activador de coagulación y con silicón de 10 ml) y biobanco (tubo con gel separador y heparina de litio de 10ml). Las muestras fueron extraídas por un flebotomista experto y procesadas en los hospitales de referencia. Una muestra de plasma fue congelada en los biobancos de cada centro, previa firma del oportuno consentimiento informado.

Los análisis realizados incluyeron las determinaciones habituales recomendadas para el seguimiento de la infección por VIH [139]. Adicionalmente se determinaron también los niveles de TSH, complemento, testosterona, vitamina B12, ácido fólico, insulina e índice HOMA-IR. Todas éstas determinaciones se realizaron en los laboratorios de análisis clínicos de cada centro. El recuento de linfocitos CD4+, determinado mediante citometría de flujo, los ANA y el factor reumatoide fueron determinados por los servicios de inmunología de cada centro. Finalmente la determinación de la carga viral de VIH y las serologías de sífilis y VHC se realizaron en los laboratorios de microbiología de cada centro.

Para la cuantificación de la carga viral de VIH se realizó extracción de ARN automatizada mediante AMPLIPREP (ROCHE DIAGNOSTICS. Mannheim, Alemania) y posterior cuantificación mediante PCR: 1) COBAS Amplicor Monitor HIV-1 Test vs. 1.5 (ROCHE DIAGNOSTICS. Branchburg, NJ, EEUU. 2) COBAS TaqMan HIV-1 vs. 2.0 (ROCHE DIAGNOSTICS. Mannheim, Alemania. Y 3) BIOMÉRIEUX NucliSens HIV-1 EasyQ vs. 1.2 (BIOMÉRIEUX. Madrid, España).

Todas las técnicas descritas se realizaron dentro de la rutina habitual establecida en cada centro y de acuerdo con los estándares de calidad establecidos por los servicios de análisis clínicos, inmunología y microbiología.

3.4.3. Técnica 3: Determinación de biomarcadores en LCR

La determinación de biomarcadores en LCR se realizó mediante punción lumbar en aquellos pacientes diagnosticados de deterioro neurocognitivo que accedieron a completar el estudio etiológico de ésta entidad. La punción lumbar consiste en la obtención mediante meníngeo-punción con aguja fina de una porción del LCR del individuo.

La técnica utilizada en este estudio se realizó con el paciente sentado y reclinado sobre el respaldo de una silla. En un primer paso se procedió identificar sobre la piel de la espalda el espacio situado entre las segunda y tercera vértebra lumbar. A continuación procedimos a realizar: 1) asepsia de esta zona mediante una solución de povidona yodada aplicada en tres ocasiones mediante gasa estéril. 2) anestesia de la piel con 1 ml de bupivacaina al 1% administrada mediante punción subdérmica con aguja subcutánea. 3) anestesia del trayecto con 1 ml de bupivacaina al 1% administrada mediante punción intramuscular con aguja intramuscular. 4) Punción con aguja de punción lumbar de 22G a 5 mm por debajo del borde inferior de la apófisis espinosa de la 2ª vértebra lumbar y recolección de 8 ml de LCR en tubos estériles secos.

Las muestras obtenidas se procesaron en y en el Servicio de Microbiología de

cada centro. De forma adicional se almacenó una muestra en el biobanco del Hospital U. La Paz previa obtención del oportuno consentimiento informado.

A partir de las muestras obtenidas se midieron en el LCR los recuentos celulares, los niveles de proteínas, la glucorraquia y las concentraciones de adenosina deaminasa (ADA), B2 microglobulina, enolasa neuro-específica, proteína TAU, proteína básica de la mielina (PBM), proteína S100B y los niveles de inmunoglobulinas. Las determinaciones disponibles en la rutina de los Servicios de Análisis Clínicos de cada centro fueron procesadas en dichos servicios de acuerdo con los protocolos y estándares de calidad establecidos. El resto de muestras fueron procesadas en laboratorios de investigación del instituto de investigación biomédica del Hospital U. La Paz (IDIPAZ) con la siguiente metodología.

La cuantificación de la proteína TAU se realizó mediante la técnica INNOTEST de “*enzyme-linked immunosorbent assay*” (ELISA) en micropocillo (INNOGENETICS. Ghent, Bélgica). La cuantificación de la enolasa neuroespecífica se realizó en un analizador “*Modular Analytucs E170*” (ROCHE DIAGNOSTICS, *Branchburg, NJ*, EEUU) mediante la técnica de inmunoensayo mediante luminiscencia electroquímica. Los niveles de S100B se cuantificaron mediante test de ELISA ABNOVA (ABNOVA Taipéi, Taiwán). LA actividad ADA se determinó mediante ensayo enzimático en un analizador A25 (BIOSYSTEMS. Barcelona, España). Las concentraciones de PBM se cuantificaron usando un kit de ELISA comercial BECKMAN COULTER (BECKMAN COULTER (Brea, Estados Unidos). Los niveles de B2-microglobulina, IgG, IgA, IgM y albúmina fueron cuantificadas mediante nefelometría (IZASA SA. Barcelona, España).

A partir de los niveles de IgG en suero y LCR se calculó el índice *Tibbling* mediante la fórmula $(\text{IgG en LCR} / \text{IgG en suero}) / (\text{albúmina en LCR} / \text{albúmina en suero})$. Los valores de referencia usados para las técnicas analizadas fueron 270 pg/ml para la proteína TAU, 8,5 ng/ml para la enolasa neuroespecífica y 3 U/L para la ADA.

Adicionalmente, se realizaron las siguientes determinaciones microbiológicas en el LCR: Cuantificación mediante técnica de PCR de la carga viral de VIH (se utilizó la misma técnica que para la cuantificación en plasma). Cuantificación ultrasensible de la carga viral de VIH (la técnica para esta determinación se explica en el siguiente apartado). Cuantificación mediante PCR de las cargas virales de Citomegalovirus, Virus de Epstein-Barr, Virus herpes simple tipo I y II y virus JC y BK. Determinación de los niveles de IgG (ELISA) y “*Venereal Disease Research Laboratory*” (VDRL) frente al *treponema pallidum*. Estas técnicas se realizaron de acuerdo con los procedimientos rutinarios establecidos y validados por el Servicio de Microbiología Clínica de cada hospital.

3.4.4 Técnica 4. Determinación de la carga viral de VIH ultrasensible.

De forma adicional a la determinación convencional de carga viral de VIH se utilizó una técnica ultrasensible que permitía determinar la presencia o ausencia de material genético de VIH en la muestra biológica analizada. Para la realización de esta prueba se utilizaron 1000 µL de plasma o LCR. De estas muestras se extrajo mediante un sistema de extracción automatizado (*easyMAG*, *bioMérieux*, Madrid, España) el ARN viral existente en la muestra, sintetizándose posteriormente ADN circular utilizando hexámeros al azar y la transcriptasa reversa *Superscript*® III (*Invitrogen*, *Carlsbad*, *CA*). Un fragmento del gen *pol* conteniendo las secuencias codificantes de la transcriptasa reversa y la proteasa del VIH se amplificaron a partir de 20 µL de ADN circular. Se realizó una primera reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos EXT103F y EXT103R (240 nM) y una ADN polimerasa *Platinum*®*Taq* (2.5 U, *Invitrogen*). Esta reacción consistió en una desnaturalización de 5 minutos a 95°C seguida de 45 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos y 72°C durante otros 30 segundos. Posteriormente 2 µL de la muestra obtenida durante el primer eslabón del proceso se sometieron a una segunda reacción de PCR utilizando una ADN polimerasa de *Biotoools* 5 U/µl (2 U, *Biotoools*, Madrid, España) y los oligonucleótidos K103F y K103R (800 nM). Esta reacción de PCR consistió en una desnaturalización de 5 minutos a 95°C seguida de 30 ciclos a 95°C de 30 segundos, a 63°C de 30

segundos y a 72°C de 30 segundos. Las reacciones realizadas se procesaron en diferentes áreas de trabajo para minimizar el riesgo de contaminación. Se utilizaron como controles negativos dos reacciones PCR en paralelo. Los productos obtenidos a partir de la nested-PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

3.5. Análisis estadísticos

Los análisis descriptivos de los datos recogidos se presentaron como porcentajes en el caso de variables dicotómicas, como medias y desviaciones estándar en el caso de variables continuas de distribución normal y como medianas y rango intercuartil en el caso de variables continuas de distribución no normal.

De forma general, para la comparación de características basales entre los pacientes que recibían monoterapia y los que recibían terapia triple se emplearon: 1) El test Chi-cuadrado y el test exacto de Fisher (cuando el número de casos en una celda de la tabla de contingencia era >5) para evaluar variables basales cualitativas. 2) El test de la t de Student para evaluar variables basales cuantitativas con distribución normal entre dos grupos. 3) El test de ANOVA para evaluar variables basales cuantitativas con distribución normal entre más de dos grupos. 4) El test no paramétrico de “*Mann-Whitney U*” para comparar variables cuantitativas con distribución no normal entre dos grupos. Y 5) El test no paramétrico de “*kruskal-Wallis*” para comparar variables cuantitativas con distribución no normal entre más de dos grupos.

Para el análisis del objetivo primero, comparar la prevalencia de deterioro neurocognitivo entre los pacientes que recibían tratamiento con monoterapia vs. terapia triple, se determinaron las prevalencias (intervalo de confianza del 95%) de deterioro neurocognitivo y la mediana (rango intercuartil) del funcionamiento neurocognitivo medido por GDS en los tres grupos de tratamiento analizados (monoterapia ≤ 2 años, monoterapia > 2 años y triple terapia). Posteriormente se

comparó el porcentaje de deterioro neurocognitivo mediante el test de Chi-cuadrado y el funcionamiento neurocognitivo mediante el test de “*kruskal-Wallis*” entre los tres grupos de tratamiento analizados. Se consideraron significativos valores de $p < 0,05$.

Para el análisis del objetivo segundo, determinar si existe asociación entre la presencia de deterioro neurocognitivo y el uso de monoterapia, se determinó la existencia de asociación entre la presencia de deterioro neurocognitivo y el tipo de tratamiento utilizado (monoterapia ≤ 2 años, monoterapia > 2 años o triple terapia). Para ello se realizó un análisis de regresión logística con una aproximación estimativa, ajustado por la presencia o ausencia de deterioro neurocognitivo como variable dependiente y tomando como categoría de referencia la triple terapia. Los resultados obtenidos de forma cruda fueron ajustados por el efecto de aquellos cofactores neurocognitivos previamente seleccionados que producían una variación superior al 15% en la odds ratio deterioro neurocognitivo - tipo de tratamiento.

Para el análisis del objetivo tercero, evaluar diferencias en el perfil de funcionamiento neurocognitivo de pacientes que recibían tratamiento con monoterapia vs. terapia triple, se determinó mediante T-scores el funcionamiento neurocognitivo medio y la desviación estándar observada en cada uno de los 14 test utilizados de forma global y por tipo de tratamiento (monoterapia y triple terapia). Igualmente se determinó el porcentaje de deterioro neurocognitivo (T score < 40) y moderado (T score < 30) observado en cada prueba (global y por tipo de tratamiento). Los resultados obtenidos para cada grupo de tratamiento se compararon mediante el test de la t de Student. Se consideraron significativos aquellos valores de p inferiores a 0,05.

Adicionalmente, para evaluar la magnitud del efecto de las diferencias en el funcionamiento neurocognitivo observado en cada uno de los 14 tests evaluados, se empleó la d de Cohen. Los efectos fueron clasificados como pequeños ($< 0,5$), medianos (0,5 a 0,8) y grandes ($> 0,8$). Para determinar el efecto independientes del

grupo de tratamiento sobre cada medida neurocognitiva se utilizó un modelo de regresión lineal multivariante con aproximación estimativa que mantenía en el modelo aquellos cofactores neurocognitivos que producían un cambio mayor del 15% en el coeficiente de regresión de interés. Estos análisis se realizaron para el total de pacientes y para el subgrupo de pacientes diagnosticados de deterioro neurocognitivo.

Para el análisis del objetivo cuarto, comparar los porcentajes de escape viral y los niveles de inflamación en el LCR en el subgrupo de pacientes diagnosticados de deterioro neurocognitivo basalmente que recibían tratamiento con monoterapia vs. terapia triple, se emplearon los test no paramétricos de “*Mann-Whitney U test*” y “*kruskal-Wallis test*” para comparar los niveles de biomarcadores y de carga viral de VIH observados en los pacientes que recibían terapia triple y monoterapia. Se consideraron significativos aquellos valores de p inferiores a 0,05.

Para el análisis del objetivo quinto, evaluar diferencias en la evolución neurocognitiva global y por dominios cognitivos de los pacientes que iniciaron tratamiento con monoterapia o con terapia triple tras un año de seguimiento, se calcularon las medias y desviaciones estándar del GDS y del CR basales y al final del seguimiento para ambos grupos de tratamiento, así como el cambio observado en dichos parámetros entre la visita basal y la de seguimiento. Los cambios en el GDS y en el CR (seguimiento – basal) se compararon entre grupos de tratamiento, en la población por intención de tratar (todos los pacientes que completaron el seguimiento con independencia del tratamiento recibido) y por protocolo (pacientes que completaron el estudio en el grupo de tratamiento asignado) mediante el test de la t de Student. Con igual metodología se compararon los resultados Z-score obtenidos en cada dominio cognitivo para cada grupo de tratamiento. Se consideraron significativos aquellos valores de p inferiores a 0,05.

Para el análisis del objetivo sexto, comparar las incidencias de deterioro neurocognitivo, de resolución del deterioro neurocognitivo y de declinar neurocognitivo entre los pacientes que iniciaron el tratamiento recibiendo

monoterapia vs. terapia triple, se determinó la incidencia de deterioro neurocognitivo (pacientes sin deterioro neurocognitivo basal que desarrollaron deterioro neurocognitivo durante el seguimiento), la incidencia de resolución del deterioro neurocognitivo (pacientes con deterioro neurocognitivo basal que resolvieron el deterioro durante el seguimiento) y el porcentaje de pacientes que cumplían los criterios preestablecidos de deterioro neurocognitivo establecidos para el cambio del GDS ($>0,5$) y del CR (>1). Los porcentajes obtenidos en dichas determinaciones fueron comparadas entre grupos de tratamiento por intención de tratar y por protocolo mediante el test de Chi-cuadrado. Se consideraron significativos aquellos valores de p inferiores a 0,05.

Finalmente, para el análisis del objetivo séptimo, evaluar si la monoterapia favorece un cambio de la función neurocognitiva más desfavorable que el observado tras un año de seguimiento en pacientes tratados con terapia triple, de forma cruda y tras ajustar por otras comorbilidades, se utilizaron dos métodos. El primero fue un análisis de la covarianza utilizado para estimar el efecto ajustado mediante regresión lineal de recibir monoterapia sobre el resultado del GDS o del CR al final del periodo de seguimiento, ajustado por el GDS o el CR basal y usando el grupo de tratamiento triple como referencia. El resultado obtenido fue ajustado por aquellos cofactores neurocognitivos que modificaron la relación entre monoterapia y GDS o el CR al final del periodo de seguimiento $>15\%$. El segundo análisis de sensibilidad consistió en comparar mediante un modelo de regresión lineal los resultados del cambio del GDS o del CR obtenidos en los dos grupos de tratamiento.

4. PRINCIPALES RESULTADOS

A continuación se exponen los resultados más importantes obtenidos en el presente proyecto de tesis y que aparecen en el contenido de los artículos presentados:

En la figura 2 del artículo publicado en la revista PLOS ONE en 2013 se representaba la estimación (intervalo de confianza 95%) de la prevalencia de deterioro neurocognitivo para los tres grupos de tratamiento definidos: triple terapia, monoterapia ≤ 2 años y monoterapia > 2 años (Objetivo 1). Como podemos observar, no se identificaron diferencias en la prevalencia de deterioro neurocognitivo entre los pacientes que recibían triple terapia 31,6% (IC95%: 22,1% – 41,0%), monoterapia ≤ 2 años 25% (11,3% - 38,7%) o monoterapia > 2 años 21,4% (IC95%: 10,5% – 32,3%).

En esta misma figura se representaron estimaciones de la prevalencia de deterioro por subgrupos de pacientes con comorbilidades médicas, neurológicas y psiquiátricas. Los resultados obtenidos fueron similares en estos subgrupos con excepción del mayor porcentaje de deterioro neurocognitivo observado en el subgrupo de pacientes con comorbilidades neurológicas que recibían tratamiento triple (58,3%) o monoterapia ≤ 2 años (50%).

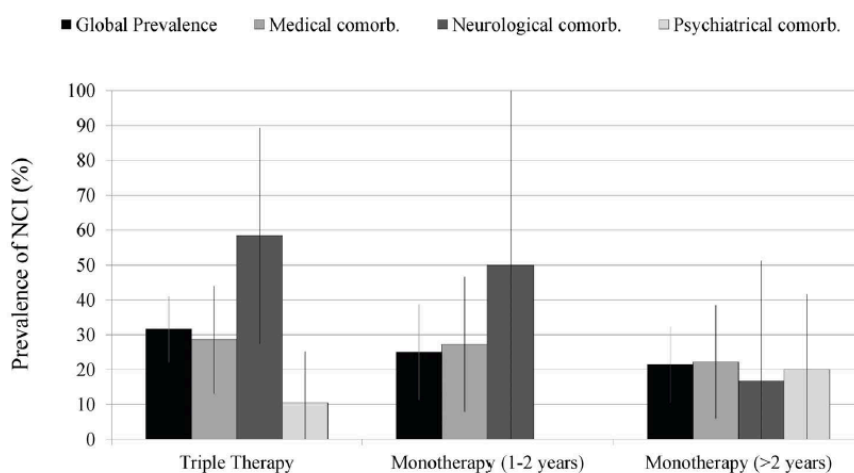
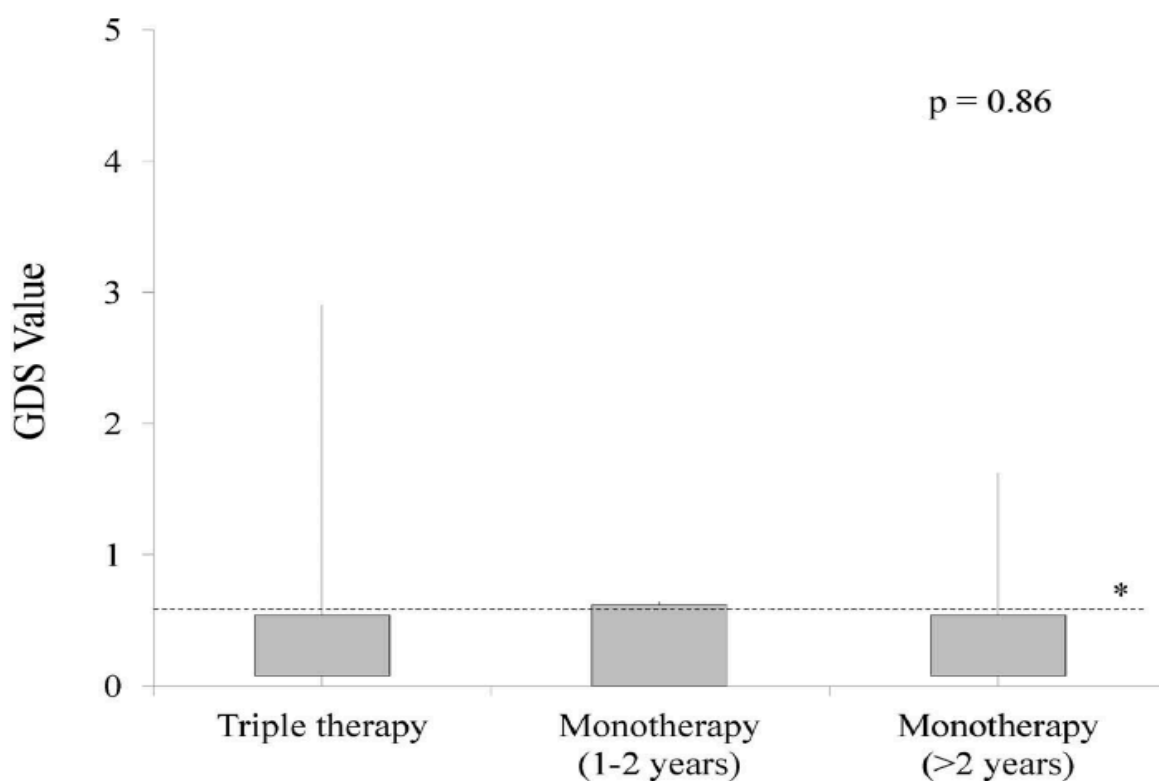


Figure 2. Global prevalence of neurocognitive impairment in each treatment group and by presence of comorbidities.

De forma adicional, en la figura 1 del mismo artículo se representó la distribución del deterioro neurocognitivo basal medido por GDS en los tres grupos de tratamiento definidos previamente. Como puede apreciarse, no se detectaron diferencias en los valores de GDS (mediana, rango intercuartil) entre grupos ($p=0.86$).



* Cut off value for normality (GDS = 0.5)

Figure 1. Distribution of neurocognitive performance by global deficit score (GDS).

En la tabla 3 del artículo publicado en PLOS ONE en 2013 se presentaban los resultados obtenidos en el modelo de regresión logística multivariante diseñado para evaluar el efecto de la monoterapia (≤ 2 años y > 2 años) sobre el riesgo de presentar deterioro neurocognitivo (odds ratio), utilizando la triple terapia a como grupo control (Objetivo 2). Como podemos observar en la tabla, la monoterapia con independencia del tiempo de duración de la misma, no se asoció con un mayor riesgo de deterioro neurocognitivo que la triple terapia, ni de forma cruda ni tras ajustar por los factores confusores que resultaron ser significativos en el modelo.

Table 3. Multivariate logistic regression step-wise model: odds ratios for neurocognitive impairment in monotherapy groups compared to triple therapy.

Model	Confounders included	S-MT (1–2 years)	L-MT (>2 years)
Crude		0.72 (0.31–1.67)	0.59 (0.27–1.28)
Step 1	Total duration of ART	0.94 (0.39–2.31)	0.60 (0.26–1.39)
Step 2	Years of education	0.77 (0.29–1.99)	0.43 (0.17–1.07)
Step 3	Ethnicity	0.99 (0.37–2.65)	0.51 (0.20–1.33)
Step 4	Transmission route	1.07 (0.39–2.94)	0.41 (0.15–1.13)
Step 5	HOMA index	0.85 (0.29–2.50)	0.40 (0.14–1.15)
FINAL MODEL		0.85 (0.29–2.50)	0.40 (0.14–1.15)

En la tabla 2 del artículo publicado en *Journal of Neurovirology* en 2014 se presentaba la comparación, cruda y ajustada por las variables neurocognitivas que resultaron significativas en el modelo (ver el pie de la tabla), de los T-score obtenidos en los 14 test neurocognitivos utilizados para evaluar el funcionamiento neurocognitivo basal de los pacientes tratados con monoterapia o terapia triple (objetivo 3). Así como el tamaño del efecto de la diferencia observada entre ambos grupos de tratamiento. Como podemos apreciar de forma cruda no se observaron diferencias en ninguno de los tests entre los grupos de tratamiento y de forma ajustada, solo se observaron diferencias a nivel del aprendizaje verbal y del recuerdo demorado verbal, que fueron inferiores en el grupo de pacientes en triple terapia y de las habilidades motoras realizadas con la mano dominante, que fueron inferiores en el grupo de pacientes en monoterapia. En cualquier caso, el tamaño del efecto de las diferencias fue pequeño para todos los tests evaluados ($d < 0,5$).

Table 2 Comparison of test results for patients on Monotherapy vs. Triple therapy

Neuropsychological measures	T-score, mean (SD)		Effect size (Cohen's <i>d</i>)	<i>p</i> value (crude)	regression Coefficient	<i>p</i> value (adjusted)
	TT	MT				
Digit span	50.0 (9.5)	52.4 (8.6)	0.26	0.08	1.75	0.10
Stroop test	53.5 (7.0)	53.8 (7.5)	0.04	0.78	-0.10	0.94
Trail Making Test form B	48.8 (10.6)	48.7 (8.0)	0.00	0.98	-1.16	0.44
Trail Making Test form A	53.0 (11.9)	53.8 (10.0)	0.07	0.64	-1.32	0.46
Digit symbol	42.3 (7.6)	43.9 (6.8)	0.21	0.14	-0.81	0.37
Symbol search	50.0 (8.8)	51.5 (8.3)	0.18	0.22	-1.19	0.29
Verbal learning	54.3 (8.7)	56.9 (10.5)	0.28	0.06	3.51	0.02
Visual learning	42.4 (13.5)	44.9 (12.5)	0.19	0.18	2.33	0.24
Verbal delayed recall	43.3 (10.6)	46.2 (11.9)	0.25	0.08	4.91	<0.01
Visual delayed recall	47.0 (14.1)	48.5 (12.9)	0.12	0.42	0.50	0.81
Phonologic verbal fluency	51.4 (10.7)	54.0 (11.7)	0.24	0.10	2.13	0.21
Semantic verbal fluency	52.3 (12.5)	52.5 (12.6)	0.01	0.92	-0.76	0.70
Motor skills dominant hand	47.2 (13.7)	44.1 (14.0)	0.23	0.12	-4.68	0.02
Motor skills non-dominant hand	43.8 (11.4)	43.2 (13.3)	0.10	0.52	-0.53	0.80

T-score for each NP measure is the standardization from raw scores. Standardized T-scores have a normal distribution with a mean of 50 and a standard deviation of 10. Verbal learning adjusted by years on antiretroviral therapy and triglycerides; verbal delayed recall by years on antiretroviral treatment, marihuana use, triglycerides, type of protease inhibitor prescribed, and vocabulary subtest; and motor skill with dominant hand by vocabulary subtest, nadir CD4 count, and HOMA index

TT triple therapy, MT monotherapy, SD standard deviation

Adicionalmente a estos resultados, en la figura 1 del mismo artículo se representaban los porcentajes de deterioro neurocognitivo leve o moderado observado entre los pacientes que reciben tratamiento con triple terapia (barras grises) o monoterapia (barras blancas). La única diferencia estadísticamente significativa fue la presencia de un mayor porcentaje de deterioro neurocognitivo moderado en los tests *Trail Making Test A* (triple terapia 5,3% vs monoterapia 0%; $p=0.03$) y *B* (triple terapia 5,3% vs monoterapia 0%, $p=0,03$).

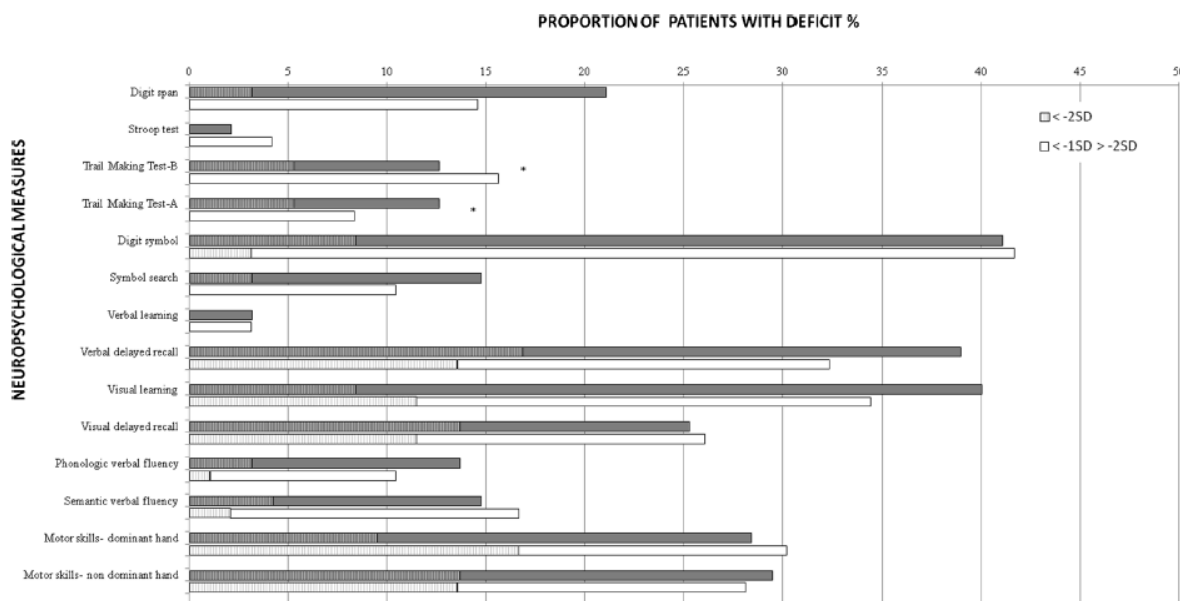


Fig. 1 Proportion of patients with mild and moderate deficits in the neuropsychological tests by treatment regimen. *Gray and white bars* indicate patients receiving triple therapy or monotherapy, respectively. *Striped sections* of the bars indicate proportions of patients with moderate deficits: result equal or lower than 2 standard deviations below mean performance of the reference population. *Non-striped sections* of the bars indicate proportion of patients with mild deficit: a result between 1 and 2

standard deviation below mean performance of the reference population. *Asterisk* indicates statistically significant values (chi-squared or Fisher's exact test comparison of proportions of patients with deficits between both treatment regimens). Significant differences found only in the proportion of patients with moderate deficits in Trail Making Test forms A and B

En la tabla 2 del artículo publicado en el “*Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome*” en 2014 se recogen los resultados del análisis de los biomarcadores y de la carga viral convencional y ultrasensible obtenidos a partir del análisis del LCR de los pacientes diagnosticados de deterioro neurocognitivo durante la evaluación basal del estudio (50 pacientes, 30 en triple terapia y 22 en monoterapia) que accedieron a someterse a la realización de una punción lumbar diagnóstica (30 pacientes, 16 en triple terapia y 14 en monoterapia) (objetivo 4). Como podemos observar, los resultados obtenidos fueron similares en los pacientes con independencia del grupo de tratamiento.

TABLE 2. HIV-RNA Detection and Concentration of Biomarkers in the CSF of Neurocognitively Impaired Patients Receiving Triple-Drug Therapy or Protease Inhibitor Monotherapy

	Triple Therapy (n = 16)	Monotherapy (n = 14)	P
Detectable HIV-RNA			
Standard assay, N (%)	1 (6.3)	1 (7.1)	1.0
Ultrasensitive assay, N (%)	8 (50.0)	10 (71.4)	0.28
WBC <5 cells/ μ L, N (%)	16 (100)	14 (100)	0.85
Total protein, median (IQR), mg/L	350 (262–524)	353 (265–374)	0.47
Total tau, median (IQR), pg/mL	185 (105–257)	177 (103–311)	0.83
MBP, median (IQR), ng/mL	0.7 (0.4–0.9)	0.9 (0.4–1.6)	0.68
NSE, median (IQR), ng/mL	26.9 (15.0–32.8)	26 (23.6–32.3)	0.65
Tibbling IgG, median (IQR)	0.7 (0.5–1.3)	0.6 (0.5–0.7)	0.32
β 2 microglobulin, median (IQR), mg/L	2 (1–2)	1 (1–2)	0.58
S100B* protein (IQR), pg/mL	246.8 (171–287.3)	252.4 (199.7–280.2)	0.79
ADA, median (IQR), U/L	4.7 (3.7–5.1)	4.8 (3.5–6.1)	0.91

*S100B determined in 6 patients receiving triple therapy and 13 receiving monotherapy because of not enough remaining samples available.

ADA, adenosine deaminase; IQR, interquartile range; MBP, myelin basic protein; NSE, neuron-specific enolase; WBC, white blood cells.

En la tabla 2 del artículo publicado en “*Clinical Infectious Diseases*” en 2014 se han comparado, por intención de tratar y por protocolo, los principales resultados neurocognitivos obtenidos en el estudio entre los dos grupos de tratamiento (objetivo 5). Igualmente en esta tabla se presentan los resultados del análisis de la covarianza utilizado para estimar el efecto de la monoterapia sobre el GDS o el CR al final del seguimiento (objetivo 7). Como podemos apreciar, no se identifican diferencias significativas en los resultados neurocognitivos analizados entre los grupos de tratamiento (monoterapia o triple terapia), con independencia de la población que haya sido analizada. Igualmente, el análisis de la covarianza no demostró que el uso de monoterapia se asocie a una peor evolución neurocognitiva.

Table 2. Crude and Adjusted Effect of Monotherapy on 1-Year Neurocognitive Changes by Different Estimates

Measure of Neurocognitive Change	Intention-to-Treat Analysis			On-Treatment Analysis		
	Triple Therapy (n = 67; 50.0%)	Monotherapy (n = 67; 50.0%)	P Value	Triple Therapy (n = 48; 42.8%)	Monotherapy (n = 64; 57.2%)	P Value
GDS						
Baseline, mean (SD)	0.44 (0.57)	0.37 (0.39)	.38	0.51 (0.65)	0.37 (0.39)	.16
Follow-up mean (SD)	0.37 (0.51)	0.28 (0.45)	.31	0.40 (0.57)	0.29 (0.46)	.25
Crude change, mean (95% CI)	-0.08 (-.14 to -.02)	-0.09 (-.16 to -.01)	.82	-0.11 (-.18 to -.03)	-0.08 (-.15 to -.01)	.61
Effect of monotherapy on change, mean (95% CI)						
Crude	1	-0.02 (-.11 to .07)	.60	1	-0.01 (-.10 to .11)	.92
Adjusted	1	-0.04 (-.14 to .05)	.38	1	-0.02 (-.12 to .09)	.78
CRs						
Baseline, mean (SD)	4.22 (1.92)	3.76 (2.08)	.40	4.29 (2.05)	3.86 (1.93)	.34
Follow-up, mean (SD)	3.88 (1.99)	3.21 (1.99)	.12	3.85 (2.13)	3.22 (2)	.11
Crude change, mean (95% CI)	-0.46 (-.83 to -.1)	-0.7 (-1.13 to -.27)	.32	-0.67 (-1.1 to -.24)	-0.44 (-.86 to -.01)	.31
Effect of monotherapy on change, mean (95% CI)						
Crude	1	-0.33 (-.85 to .19)	.22	1	-0.35 (-.92 to .23)	.24
Adjusted	1	-0.26 (-.84 to .31)	.36	1	-0.25 (-.87 to .37)	.43

Abbreviations: CI, confidence interval; CRs, clinical ratings; GDS, Global Deficit Score; SD, standard deviation.

En la figura 1 del mismo artículo se recogen los resultados neurocognitivos obtenidos en cada dominio neurocognitivo estudiado, tanto a nivel basal como al final del seguimiento (objetivo 5). En todos los dominios evaluados se observó un rendimiento cognitivo similar en ambos grupos de tratamiento, tanto a nivel basal como al final del seguimiento (todas las comparaciones mostraron un resultado $p > 0,05$).

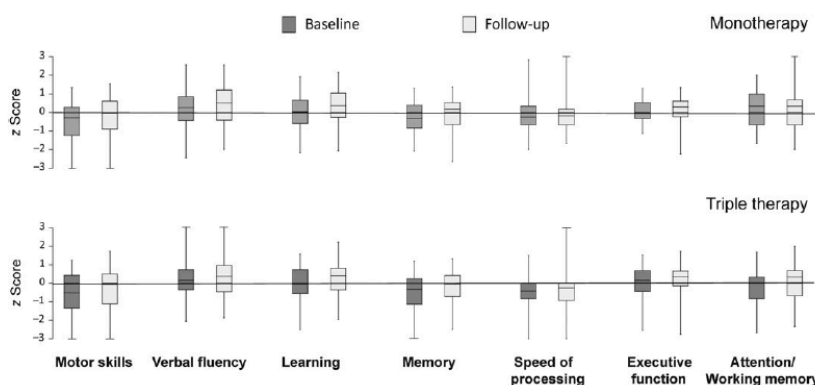


Figure 2. Neurocognitive performance distributed by ability domains in patients receiving monotherapy or triple therapy, at baseline and at 1-year follow-up.

Finalmente en la tabla 3 del mismo artículo se presenta la distribución de deterioro neurocognitivo a nivel basal y al final del tratamiento para ambos grupos de tratamiento, así como las incidencias de desarrollar deterioro neurocognitivo o de

recuperación del deterioro neurocognitivo (objetivo 7). Como se puede observar tanto la incidencia de deterioro (monoterapia 22,2% vs. triple terapia 21,1%; $p=0,91$) como la de recuperación (monoterapia 10,2% vs. triple terapia 6,3%; $p=0,48$) fueron similares en ambos grupos de tratamiento.

Table 3. Prevalence of Neurocognitive Impairment by Treatment Group at Baseline and After 1 Year of Follow-up^a

Impairment Category	Patients, No. (%)			
	Monotherapy (n = 67)		Triple Therapy (n = 67)	
	Baseline	Follow-up	Baseline	Follow-up
Nonimpaired	49 (73.1)	48 (71.6)	48 (71.6)	49 (73.1)
Impaired	18 (26.9)	19 (28.4)	19 (28.4)	18 (26.9)
Change from impaired to unimpaired	...	4 (22.2)	...	4 (21.1)
Change from unimpaired to impaired	...	5 (10.2)	...	3 (6.3)

^a Neurocognitive impairment as defined by the American Association of Neurology in 2007 [19].

La evaluación del declinar neurocognitivo (objetivo 7) no ha sido recogida por ninguna tabla o figura en los artículos publicados, quedando recogidos estos resultados en el texto del artículo publicado en el “*Clinical Infectious Diseases*” en 2014. Para una mayor claridad, hemos elaborado la siguiente tabla que recoge estos resultados. Como podemos apreciar, no se detectaron diferencias en los porcentajes de declinar neurocognitivo entre los pacientes que iniciaron tratamiento con monoterapia o los que lo hicieron con terapia triple.

	Monoterapia	Terapia triple	p
Declinar neurocognitivo por GDS, n (%)	2 (3%)	1 (1,5%)	0,56
Declinar neurocognitivo por CR, n (%)	12 (18,2%)	16 (23,9%)	0,42

5. CONCLUSIONES

De acuerdo con los datos obtenidos en nuestra investigación, los pacientes infectados por VIH, con carga viral indetectable que reciben tratamiento estable con lopinavir o darunavir potenciado con ritonavir en monoterapia, en comparación con pacientes con las mismas características y con el mismo entorno geográfico que reciben tratamiento con lopinavir o darunavir potenciado con ritonavir y dos análogos de nucleos(t)idos:

1. Presentan la misma prevalencia de deterioro neurocognitivo.
2. Presentan un funcionamiento neurocognitivo similar, analizado tanto de global como por dominios neurocognitivos.
3. No presentan peor evolución de su funcionamiento neurocognitivo, analizado tanto de global como por dominios neurocognitivos.
4. No presentan tasas de incidencia de deterioro neurocognitivo ni de mejoría cognitiva diferentes.
5. Presentan porcentajes de declinar neurocognitivo similares.

Igualmente, los pacientes infectados por VIH, con carga viral indetectable que reciben tratamiento estable con lopinavir o darunavir potenciado con ritonavir en monoterapia y que han sido diagnosticados de deterioro neurocognitivo, en comparación con pacientes con las mismas características y con el mismo entorno geográfico que reciben tratamiento con lopinavir o darunavir potenciado con ritonavir y dos análogos de nucleos(t)idos:

6. Presentan porcentajes similares de escape viral en LCR, incluso cuando se utilizan técnicas de detección ultrasensibles.

7. No presentan niveles de inflamación a nivel del LCR diferentes.
8. Presentan un perfil de su funcionamiento neurocognitivo similar.

6. PERSPECTIVAS

En base a los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral, los pacientes que reciben tratamiento antirretroviral en monoterapia con darunavir o lopinavir potenciado con ritonavir no tienen mayor riesgo de presentar deterioro neurocognitivo y la misma tasa de control virológico en el LCR que los pacientes que reciben tratamiento convencional con darunavir o lopinavir potenciado con ritonavir + dos análogos de nucleós(t)idos.

Nuestros resultados, que confirman la seguridad neurocognitiva observada en el estudio MOST [147], han sido ratificados por dos ensayos clínicos, PIVOT y PROTEA, y por un meta-análisis que analiza los end-points neurocognitivos de 13 ensayos clínicos randomizados que evaluaron la eficacia y la seguridad de la monoterapia [142, 144, 156]. El estudio PIVOT es un ensayo clínico multicéntrico, randomizado y abierto diseñado para comparar la pérdida de opciones terapéuticas tras 5 años de seguimiento en pacientes VIH avirémicos (>6 meses) que son randomizados a continuar tratamiento con tres antirretrovirales o cambiar tratamiento a un inhibidor de proteasa potenciado en monoterapia. El estudio PIVOT incluyó un subestudio neurocognitivo en el que los pacientes eran sometidos a una evaluación neurocognitiva breve (3 tests, 5 medidas) en las semanas basal, 12, 48, 96, 144, 192 y final del estudio. A lo largo de todo el estudio, el funcionamiento neurocognitivo observado fue similar con independencia del tipo de tratamiento recibido.

El estudio PROTEA es también un ensayo clínico multicéntrico, randomizado y abierto diseñado para comparar la eficacia y seguridad tras 96 semanas de seguimiento, en pacientes VIH avirémicos (>1 año) que reciben tratamiento

antirretroviral convencional, de continuar tratamiento triple con darunavir potenciado con ritonavir asociado con dos análogos de nucleós(t)idos o cambiar a darunavir potenciado con ritonavir en monoterapia. El estudio PROTEA incluyó un subestudio neurocognitivo similar al del PIVOT (ambos utilizaron los mismos tests) que evaluó el cambio crudo y ajustado de la función neurocognitiva tras 48 semanas. De nuevo no se observaron diferencias en la evolución neurocognitiva en función del tipo de tratamiento.

Adicionalmente, los resultados comunicados del ensayo clínico MODAt [157], que evaluaba la seguridad neurocognitiva a 96 semanas de la monoterapia con atazanavir/ritonavir (n=28) frente a la de atazanavir/ritonavir + 2 nucleos(t)idos (n=37), parecen sugerir que la seguridad neurocognitiva observada en nuestro estudio con lopinavir/ritonavir y darunavir/ritonavir en monoterapia sería también aplicable a la monoterapia con atazanavir/ritonavir. Si bien, estos resultados son relevantes y apoyan nuestros hallazgos, debemos recordar que la monoterapia con atazanavir/ritonavir no es una terapia aceptada actualmente, al no haber demostrado su no inferioridad frente a la triple terapia. Este hecho queda reflejado en el mayor porcentaje de abandonos observado en el brazo de monoterapia en el MODAt. Teniendo en cuenta que el análisis realizado solo incluyó a los pacientes que completaron el estudio, no podemos descartar que el mayor porcentaje de abandonos observados en el brazo de la monoterapia no fuese consecuencia de una pérdida de control a nivel del SNC.

Como fortaleza, nuestro estudio es el único de los tres que ha utilizado una batería neurocognitiva extensa aplicada por psicólogos expertos. Mientras PIVOT y PROTEA emplearon cinco medidas, aplicadas por un psicometrista, para evaluar el funcionamiento de tres dominios cognitivos, nosotros empleamos 14 medidas, aplicadas por un psicólogo experto, para evaluar el funcionamiento de siete dominios cognitivos. Por ello, nuestro estudio es el único con capacidad para establecer tasas de prevalencia e incidencia de deterioro neurocognitivo de acuerdo con los criterios diagnósticos establecidos en 2007 por la AAN [93]. Igualmente nuestro estudio es el único que ha realizado una evaluación

pormenorizada del funcionamiento neurocognitivo por dominios.

Como debilidad, nuestro estudio aunque prospectivo, no fue aleatorizado. Por ello no podemos excluir, como argumentaban Gates y Cysique en una reciente revisión sobre estrategias de investigación en neuroVIH [158], un sesgo de selección que favorezca a la monoterapia. Mientras la terapia triple no presenta limitaciones de uso, la monoterapia solo se recomienda en pacientes muy adherentes, con largo tiempo de indetectabilidad, que no hayan presentado fracasos virológicos previos con inhibidores de proteasa y preferiblemente que no presenten un nadir de CD4 bajo [143].

Si consideramos que la falta de adherencia, el nadir bajo y el fracaso virológico previo pueden relacionarse con infecciones del SNC más virulentas, compartimentalización de clones resistentes y con un peor funcionamiento neurocognitivo, es posible que el funcionamiento neurocognitivo de los pacientes en tratamiento triple fuese peor que el de los pacientes que inician una monoterapia con inhibidores de proteasa y por tanto si la evolución neurocognitiva con la monoterapia fuese peor, este efecto quedase enmascarado por un peor funcionamiento basal.

Diversos factores hacen poco probable esta hipótesis: Primero, aunque se observaron diferencias significativas en el perfil basal de los pacientes en mono y triple terapia, no se encontraron diferencias clínicamente relevantes en los niveles de adherencia basales ni en el nadir de CD4. Segundo, los pacientes que llevaban más de dos años en monoterapia tenían una proporción de deterioro neurocognitivo numéricamente menor que la de los pacientes en monoterapia durante 2 años o menos. Y tercero, la evolución neurocognitiva observada tanto en este estudio como en otros (PROTEA, PIVOT o MOST [147]) fue similar entre la monoterapia y la terapia triple.

Otras debilidades de nuestro estudio son la ausencia de baremos validados en población española para algunos de las pruebas aplicadas, la ausencia de

corrección por efecto de la práctica o la potencia del estudio, que no permite detectar diferencias en el funcionamiento neurocognitivo de escasa magnitud. Estas limitaciones comunes al resto de estudios, podrían causar cierto grado de inexactitud en la evaluación realizada, si bien este factor afectaría a los dos grupos de tratamiento por igual. En cuanto a la potencia, fue diseñado con la suficiente como para que diferencias clínicamente relevantes hubiesen sido detectadas.

Respecto al control de la infección VIH en el LCR, confirmamos la existencia, en pacientes avirémicos en sangre, de porcentajes de escape viral en LCR similares para la monoterapia y la triple terapia observados en el ensayo clínico MOST que comparaba el control virológico en LCR tras 48 semanas en pacientes aleatorizados a mantener tratamiento triple con lopinavir potenciado con ritonavir y dos análogos o cambiar a lopinavir potenciado con ritonavir en monoterapia (4 pacientes en cada grupo). Resultados similares se obtuvieron también con darunavir potenciado con ritonavir en el subestudio neurocognitivo del ensayo clínico PROTEA, donde ninguno de los 71 pacientes evaluados presentaba escape viral en el LCR ni basalmente ni en semana 48.

En comparación con los estudios PROTEA y el MOST, nuestro estudio del LCR tiene la fortaleza de haber incluido un estudio de carga viral ultrasensible tanto en plasma como en LCR. Por el contrario, tiene la limitación de haber incluido únicamente pacientes diagnosticados de deterioro neurocognitivo. Una limitación común a los tres estudios es su falta de potencia estadística para establecer diferencias entre la triple terapia y la monoterapia. Aunque esta importante limitación no permite confirmar que el riesgo de escape viral en el LCR sea igual con la monoterapia que con la terapia triple, los datos obtenidos de las evaluaciones neurocognitivas sugieren que de existir diferencias, su impacto a nivel del funcionamiento neurocognitivo debe ser limitado.

A diferencia de lo observado en nuestro estudio, en los ensayos clínicos PROTEA, MOST o MONOI [159] se detectaron pacientes que presentaban niveles de carga viral en LCR superiores, a los detectados en plasma (>50 copias/mL). Uno de

estos pacientes en el PROTEA y cuatro en el MOST presentaban niveles de carga viral bajos tanto en plasma como en el LCR y se encontraban asintomáticos. Por el contrario, cuatro pacientes en el MOST, dos pacientes en el MONOI y uno en el PROTEA presentaron cuadros neurológicos agudos en el contexto de un fallo viral en plasma y en LCR que se resolvieron al re-intensificar el tratamiento antirretroviral. Un aspecto relevante y común a todos estos pacientes es la presencia de nadires de CD4 bajos.

En los pacientes asintomáticos, dado que el aclaramiento de la carga viral de VIH es más rápido en sangre que en el LCR por la capacidad de opsonización del plasma, la explicación más factible para estos hallazgos sería la existencia de un fallo temporal de adherencia previo a la extracción. Por el contrario, los casos sintomáticos sugieren un fallo en el control de la replicación viral en el SNC motivado probablemente por una selección en el compartimento cerebral de clones con alta neuro-virulencia y con una susceptibilidad reducida al inhibidor de la proteasa.

La presencia de fallo virológico en el SNC en pacientes asintomáticos o que desarrollan síntomas neurológicos de forma aguda no es exclusiva de los pacientes que reciben monoterapia. Diversos estudios han reportado casos similares en pacientes que recibían tratamiento triple, siendo numéricamente superiores éstos casos a los reportados en pacientes en monoterapia. La rareza de estos casos, junto con su aparición en pacientes en tratamiento triple sugiere que deben existir otros factores distintos al uso de monoterapia per se, que expliquen su desarrollo.

Por último, aunque en nuestro estudio no encontramos niveles aumentados en los biomarcadores analizados en el LCR, otros estudios han encontrado niveles aumentados de S100B (MOST) o neopterinina (PROTEA) en los pacientes que recibían monoterapia en comparación con los pacientes que recibían triple terapia. Dado que estos hallazgos no se han podido relacionar con un peor control virológico en el LCR, cabe la posibilidad de que se deban a un efecto directo de los

análogos de nucleós(t)idos sobre el tejido cerebral.

En resumen, nuestros resultados en el contexto de la evidencia clínica disponible, confirman la seguridad neurocognitiva de la estrategia terapéutica de simplificación del tratamiento antirretroviral con inhibidores de proteasa potenciados y la ausencia de datos que sugieran un riesgo de deterioro neurocognitivo mayor asociado al uso de esta estrategia. Quedaría por confirmar con estudios específicos bien potenciados que la monoterapia, en pacientes adecuadamente seleccionados, tiene la misma capacidad de control de la infección por VIH y de la inflamación del SNC que la terapia triple.

Dada la dificultad de realizar este tipo de estudios, se han planteado alternativas para analizar el efecto de la monoterapia sobre el SNC en comparación con la terapia triple. Como consecuencia del presente proyecto de tesis y en esta línea, estamos desarrollando un proyecto FIS comparativo entre pacientes en monoterapia y terapia triple con RMN cerebral de alta resolución. En este estudio pretendemos analizar de forma prospectiva el efecto de la monoterapia sobre los volúmenes cerebrales, sobre la integridad neuronal y los niveles de inflamación (medidos mediante espectroscopia) y sobre la integridad de la sustancia blanca (tensión de difusión). Las ventajas de este estudio sobre un estudio realizado en LCR son la ausencia de técnicas invasivas y la capacidad de poder valorar directamente el efecto del tratamiento sobre estructuras cerebrales. Por el contrario, con este estudio no seremos capaces de evaluar el control virológico en el LCR.

Por último, aunque este proyecto de tesis sustenta la seguridad neurocognitiva de las terapias no convencionales alternativas al tratamiento triple convencional, no se han resuelto todos los interrogantes existentes respecto a estas terapias. Por ejemplo, está por aclarar si la monoterapia con darunavir potenciado con el nuevo potenciador cobicistat va a mantener el perfil de seguridad neurocognitiva observado con ritonavir. Aunque su efecto fármaco-dinámico es similar, existen diferencias significativas entre ambos potenciadores que podrían influir en su

capacidad de controlar la infección por VIH en el SNC.

Sabemos que las concentraciones mínimas de darunavir alcanzadas cuando va potenciado con cobicistat son menores que cuando va potenciado con ritonavir [160]. Esto podría influir sobre las concentraciones mínimas alcanzadas en el LCR y por tanto es posible que el número de pacientes que alcancen niveles infra terapéuticos pueda ser mayor que el observado con ritonavir. Igualmente el efecto de cobicistat y ritonavir sobre la glicoproteína P es diferente. Si consideramos que esta glicoproteína es la responsable de sacar el darunavir del SNC, cabría esperar un comportamiento fármaco-dinámico diferente en este compartimento con ambos potenciadores.

De igual modo, está por aclarar si otras alternativas a la triple terapia con menos fármacos que incluyan antirretrovirales con una penetración baja en el LCR, como por ejemplo la combinación de atazanavir potenciado con ritonavir o cobicistat y lamivudina, supondrán o no un riesgo para la seguridad neurocognitiva del individuo. Para intentar evaluar este caso concreto, el doctorando está coordinando un subestudio neurocognitivo anidado dentro del ensayo clínico SALT cuyo objetivo es comparar la evolución neurocognitiva tras 96 semanas de pacientes randomizados a continuar tratamiento triple con atazanavir potenciado con ritonavir más dos análogos de nucleós(t)idos o lamivudina.

Además, está por confirmar si la seguridad cognitiva observada con tratamientos alternativos a la triple terapia en un escenario de control virológico del VIH se podrá extrapolar al escenario del paciente naïve. A este respecto están pendientes de comunicación los resultados neurocognitivos del ensayo clínico NEAT en el que se comparó el cambio en el funcionamiento neurocognitivo en pacientes que iniciaban tratamiento antirretroviral con darunavir/ritonavir + 2 análogos de nucleos(t)idos vs. darunavir/ritonavir + raltegravir [161].

Con independencia de los resultados individuales de cada estudio, consideramos que el compendio de los estudios presentados ha supuesto un importante avance

en el conocimiento de los efectos del tratamiento antirretroviral sobre la evolución del funcionamiento neurocognitivo. Ha permitido poner en cuestión el paradigma existente previamente que postulaba que la preservación de la función neurocognitiva dependía del número de fármacos neuro-activos utilizados para controlar la infección. Y ha contribuido a demostrar la seguridad neurocognitiva de los tratamientos que solo incluyen uno o dos fármacos antirretrovirales.

Fruto, entre otros factores, de los avances en el conocimiento de la seguridad neurocognitiva del tratamiento con inhibidores de proteasa en monoterapia presentados en nuestros trabajos, en la actualidad se siguen desarrollando nuevas estrategias de deintensificación del tratamiento antirretroviral con nuevos fármacos como el dolutegravir o la rilpivirina.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Barre-Sinoussi F, Cherman J, Rey F et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220: 868.
2. International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy: 2014 Release. EC46, Montreal, Canada, July 2014. Disponible en: ictonline.org/virustaxonomy.asp. Consultado el 27 de Mayo de 2015.
3. Levy JA. HIV pathogenesis and long-term survival. *AIDS* 1993; 7: 1401-10.
4. Leis J. Standardized and simplified nomenclature for proteins common to all retroviruses. *J Virol* 1988; 62: 1808.
5. Gelderblom H. Fine structure of VIH and SIV. En: Korber B, eds. *VIH Molecular Immunology Database* 1997. National Institute of Allergy and Infectious Diseases; 1997.
6. Muesing M, Smith D, Cabradilla C et al. Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature* 1985; 313: 450-58.
7. Gottlinger H, Sodroski J, Haseltine W. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 5781.

8. Paxton W, Connor R, Landau N. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: Requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *J Virol* 1993; 67: 7229.
9. Jacks T, Power M, Masiarz F et al. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 Gag-Pol expression. *Nature* 1988; 331: 280.
10. Ashorn P, McQuade T, Thaisrivongs S et al. An inhibitor of the protease blocks maturation of human and simian immunodeficiency viruses and spread of infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 7472.
11. Miller M, Jaskolski M, Rao J et al. Crystal structure of a retroviral protease proves relationship to aspartic protease family. *Nature* 1989; 337: 576.
12. Brown P, Bowerman B, Varmus H et al. Correct integration of retroviral DNA in vitro. *Cell* 1987; 49: 347.
13. Wiskerchen M, Muesing M. Human immunodeficiency virus type 1 integrase: Effects of mutations on viral ability to integrate, direct viral gene expression from unintegrated viral ADN templates, and sustain viral propagation in primary cells. *J Virol* 1995; 69: 376.
14. Hart T, Kirsh R, Ellens H et al. Binding of soluble CD4 proteins to human immunodeficiency virus type 1 and infected cells induces release of envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2189.
15. Hwang S, Boyle T, Lyerly K et al. Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science* 1991; 253: 71.
16. Feng Y, Broder C, Kennedy P et al. HIV-1 entry cofactor: Functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996; 272: 872.
17. Preston B, Poiesz B, Loeb L. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 1988; 242: 1168.
18. Roberts J, Bebenek K, Kunkel T. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* 1988; 242: 1171.
19. app M, Green M. Sequence-specific RNA binding by the HIV-1 Rev protein. *Nature* 1989; 342: 714.
20. Lama J, Mangasarian A, Trono D. Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef and Vpu inhibitable manner. *Current Biology* 1999; 9: 622.
21. Fisher A, Ensoli B, Ivanoff L et al. The sor gene of HIV-1 is required for efficient virus transmission in vitro. *Science* 1987; 237: 888.
22. Miller JH, Presnyak V, Smith HC. "The dimerization domain of HIV-1 viral infectivity factor Vif is required to block APOBEC3G incorporation with virions". *Retrovirology* 2007; 4: 81.

23. Von Schwedler U, Kornbluth R, Trono D et al. The nuclear localization signal of the matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 allows the establishment of infection in macrophages and quiescent T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 7311
24. Muthumani K, Choo AY, Zong WX, et al. "The HIV-1 Vpr and glucocorticoid receptor complex is a gain-of-function interaction that prevents the nuclear localization of PARP-1". *Nat. Cell Biol* 2006; 8: 170–9.
25. Willey R, Maldarelli F, Martin M et al. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J Virol* 1992; 66: 7193.
26. Iimkai T, Strebel K, Hoggan M et al. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J Virol* 1990; 64: 621.
27. Bour S, Schubert U, Strebel K. "The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein specifically binds to the cytoplasmic domain of CD4: implications for the mechanism of degradation". *J Virol* 1995; 69: 1510–20.
28. Estrabaud E, Le Rouzic E, Lopez-Vergès S, et al. Regulated degradation of the HIV-1 Vpu protein through a betaTrCP-independent pathway limits the release of viral particles. *PLoS Pathog* 2007; 3: e104.
29. García J, Miller A. Downregulation of cell surface CD4 by nef. *Res Virol* 1992; 143: 52.
30. Cullen B. HIV-1 Nef protein: An invitation to a kill. *Nat Med*; 1999; 5: 585.
31. Rogel M, Wu L, Emerman M. The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene prevents cell proliferation during chronic infection. *J Virol* 1995; 69: 882.
32. Sattentau Q, Clapham P, Weiss R et al. The human and simian immunodeficiency viruses VIH-1, VIH-2 and SIV interact with similar epitopes on their cellular receptor, the CD4 molecule. *AIDS* 1988; 2: 101.
33. Harouse J, Bhat S, Spitalnik S et al. Inhibition of entry of VIH-1 in neural cell lines by antibodies against galactosyl ceramide. *Science* 1991; 253: 320.
34. Abraham L, Fackler OT. HIV-1 Nef: a multifaceted modulator of T cell receptor signaling. *Cell Commun Signal* 2012; 10: 39.
35. Arthos J, Cicala C, Martinelli E, et al. HIV-1 envelope protein binds to and signal through integrin $\alpha 4\beta 7$, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. *Nat Immunol* 2008; 9: 301–309.
36. Maddon PJ, McDougal JS, Clapham PR, et al. HIV infection does not require endocytosis of its receptor, CD4. *Cell* 1998; 54: 865–874.
37. Hartley O, Klasse PJ, Sattentau QJ, Moore JP. V3: HIV's switch-hitter. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005; 21: 171–189.

38. Chen B, Vogan EM, Gong H, Skehel JJ, Wiley DC, Harrison SC. Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core. *Nature* 2005; 433: 834–841.
39. Berger EA, Doms RW, Fenyo EM, et al. A new classification for HIV-1. *Nature* 1998; 391: 240.
40. Melikyan GB. Common principles and intermediates of viral protein-mediated fusion: The HIV-1 paradigm. *Retrovirology* 2008; 5: 111.
41. Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE (1997). *Retroviruses*. Cold Spring Harbor; NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
42. Smith, JA, Nunnari G, Preuss M, Pomerantz RJ, Daniel R. "Pentoxifylline Suppresses Transduction by HIV-1-Based Vectors". *Intervirology* 2007; 50: 377–386.
43. Pereira LA, Bentley K, Peeters A, Churchill MJ and Deacon NJ. A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 663–668.
44. Schiralli Lester GM and Henderson AJ. Mechanisms of HIV Transcriptional Regulation and Their Contribution to Latency. *Mol Biol Int* 2012; ; 2012: 614120.
45. Raha T, Cheng SW, and Green MR. HIV-1 Tat stimulates transcription complex assembly through recruitment of TBP in the absence of TAFs. *Plos Biol* 2005; 3: e44.
46. Bres V, Yoh SM, Jones KA. The multi-tasking P-TEFb complex. *Curr Opin Cell Biol* 2008; 20: 334–340.
47. Zhang Z, Klatt A, Gilmour DS, and Henderson AJ. Negative elongation factor NELF represses human immunodeficiency virus transcription by pausing the RNA polymerase II complex. *J Biol Chem* 2007; 282: 16981–16988.
48. Trono D, Van Lint C, Rouzioux C, et al. HIV persistence and the prospect of long-term drug-free remissions for HIV-infected individuals. *Science* 2011, 329: 174-180.
49. Wong JK, Hezareh M, Günthard HF et al. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science* 1997; 278: 1291–1295.
50. Pierson T, McArthur J, and Siliciano RF. Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 665–708.
51. Yukl S, Pillai S, Li P et al. Latently-infected CD4+ T cells are enriched for HIV-1 Tat variants with impaired transactivation activity. *Virology* 2009; 387: 98–108.
52. van der Sluis RM, Pollakis G, van Gerven ML, Berkhout B, and Jeeninga RE. Latency profiles of full length HIV-1 molecular clone variants with a subtype specific promoter. *Retrovirology* 2011; 8: 73.

53. Jordan A, Bisgrove D, and Verdin E. HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro. *EMBO J* 2003; 22: 1868–1877.
54. Narayanan A, Kehn-Hall K, Bailey C, and Kashanchi F. Analysis of the roles of HIV-derived microRNAs. *Expert Opin Biol Ther* 2011; 11: 17–29.
55. Murakami T, Freed EO. Genetic evidence for an interaction between human immunodeficiency virus type 1 matrix and alpha-helix 2 of the gp41 cytoplasmic tail. *J Virol*. 2000; 74: 3548-54.
56. Sundquist WI and Kräusslich HG. HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; 2: a006924.
57. Chan R, Uchil PD, Jin J, et al. Retroviruses human immunodeficiency virus and murine leukemia virus are enriched in phosphoinositides. *J Virol* 2008; 82: 11228–11238.
58. Hill M, Tachedjian G, Mak J. The packaging and maturation of the HIV-1 Pol proteins. *Curr HIV Res* 2005; 3: 73-85.
59. Louis JM, Ishima R, Torchia DA, Weber IT. HIV-1 protease: Structure, dynamics, and inhibition. *Adv Pharmacol* 2007; 55: 261–298.
60. Usami Y, Popov S, Popova E, Inoue M, Weissenhorn W, Gottlinger H. The ESCRT pathway and HIV-1 budding. *Biochem Soc Trans* 2009; 37: 181–184.
61. Peel S, Macheboeuf P, Martinelli N, Weissenhorn W. Divergent pathways lead to ESCRT-III-catalyzed membrane fission. *Trends Biochem Sci* 2011; 36: 199-210.
62. Malim MH, Bieniasz PD. HIV restriction factors and mechanisms of evasion. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2: a006940.
63. Skaug B, Chen ZJ. Emerging role of ISG15 in antiviral immunity. *Cell* 2010; 143: 187–190.
64. Haller C, Fackler OT. HIV-1 at the immunological and T-lymphocytic virological synapse. *Biol Chem* 2008; 389: 1253–1260.
65. Jolly C, Mitar I, Sattentau QJ. Adhesion molecule interactions facilitate human immunodeficiency virus type 1-induced virological synapse formation between T cells. *J Virol* 2007; 81: 13916–13921.
66. Valcour V, Chalermchai T, Sailasuta N, et al. Central nervous system viral invasion and inflammation during acute HIV infection. *J Infect Dis* 2012; 206: 275-82.
67. Gonzalez-Scarano F, Martin-Garcia J. The neuropathogenesis of AIDS. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 69-81.
68. Haase AT. Pathogenesis of lentivirus infections. *Nature* 1986; 322: 130-6.

69. Mukhtar M, Harley S, Chen P et al. Primary isolated human brain microvascular endothelial cells express diverse HIV/SIV-associated chemokine coreceptors and DC-SIGN and L-SING. *Virology* 2002; 297: 78-88.
70. Bomsel M. Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nat Med* 1997; 3: 42-7.
71. Morris A, Marsden M, Halcrow K et al. Mosaic structure of human immunodeficiency virus type 1 genome infecting lymphoid cells and the brain: evolution of regional populations. *J Virol* 1999; 73: 8720-31.
72. Lawrence DM, Major EO. HIV-1 and the brain: connections between HIV-1-associated dementia, neuropathogenesis and neuroimmunology. *Microbes Infect* 2002; 4: 301-8.
73. Bagasra O, Lavi E, Bobroski L et al. Cellular reservoirs of HIV-1 in the central nervous system of infected individuals: identification by combination of in situ polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *AIDS* 1996; 10: 573-85.
74. Gorry PR, Ong C, Thorpe J et al. Astrocyte infection by HIV-1: mechanism of restricted virus replication, and the role in the pathogenesis of HIV-1-associated dementia. *Curr HIV Res* 2003; 1: 463-473.
75. Kramer-Hammerle S, Rothenaigner I, Wolff H et al. Cells of the central nervous system as targets and reservoirs of the human immunodeficiency virus. *Virus Res* 2005; 111: 194-213.
76. Bartz SR, Emerman M. Human immunodeficiency virus type I Tat induces apoptosis and increases sensitivity to apoptotic signals by up-regulating FLICE/caspase-8. *J Virol* 1999; 73: 1956-63.
77. Haughey NJ, Mattson MP. Calcium dysregulation and neuronal apoptosis by the HIV-1 proteins Tat and gp120. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; Suppl2: S55-61.
78. Nath A. Human immunodeficiency virus proteins in neuropathogenesis of HIV dementia. *J Infect Dis* 2002; 186: S193-S198.
79. Pandey V, Bolsover SR. Immediate and neurotoxic effects of HIV protein gp120 act through CXCR4 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 274:212-5.
80. Stewart SA, Poon B, Song JY et al. Human immunodeficiency virus type 1 vpr induces apoptosis through caspase activation. *J Virol* 2000; 74: 3105-11.
81. Pomerantz RJ. Effects of HIV-1 Vpr on neuroinvasion and neuropathogenesis. *DNA Cell Biol* 2004; 23: 227-38.
82. Overton ET, Kauwe JS, Paul R, et al. Performances on the CogState and standard neuropsychological batteries among HIV patients without dementia. *AIDS Behav* 2011; 15: 1902-9.

83. Vander Meer P, Illich AM, Gonzalez-Scarano F et al. Immunohistochemical analysis of CCR2, CCR3, CCR5 and CXCR4 in the human brain: potential mechanisms for HIV dementia. *Exp Mol Pathol* 2000; 69: 192-201.
84. Toborek M, Lee YW, For a G et al. Mechanisms of the blood-brain barrier disruption in HIV-1 infection. *Cell Mol Neurobiol* 2005; 25: 181-99.
85. Gartner S, Liu Y. Insights into the role of immuneactivation in HIV neuropathogenesis. *J Neurovirol* 2002; 8: 69-75.
86. Forloni G, Demicheli F, Giorgi S, et al. Expression of amyloid precursor protein mRNAs in endothelial, neuronal, and glial cells: modulation by interleukin-1. *Brain Res* 1992; 16: 128–134.
87. Yamamoto M, Kiyota T, Horiba M, Buescher JL, Walsh SM, Gendelman HE, Ikezu T. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha regulate amyloid-beta plaque deposition and beta-secretase expression in Swedish mutant APP transgenic mice. *Am J Pathol* 2007; 170: 680–92.
88. Liao YF, Wang BJ, Cheng HT, Kuo LH, Wolfe MS. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interferon-gamma stimulate gamma-secretase-mediated cleavage of amyloid precursor protein through a JNK-dependent MAPK pathway. *J Biol Chem* 2004; 279: 49523–49532.
89. Rempel H, Pulliam L. HIV-1 tat inhibits neprilysin and elevates amyloid beta. *AIDS* 2005; 19: 127–135.
90. Scott JC, Woods SP, Carey CL et al. Neurocognitive consequences of HIV infection in older adults: An evaluation of the cortical hypothesis. *AIDS Behav* 2011; 15:1187: 96.
91. Sacktor N, Skolasky R, Selnes OA, et al. Neuropsychological test profile differences between young and old human immunodeficiency virus-positive individuals. *J Neurovirol* 2007; 13: 203–9.
92. Heaton RK, Franklin DR, Ellis RJ et al. HIV-associated neurocognitive disorders before and during the era of combination antiretroviral therapy: differences in rates, nature and predictors. *J Neurovirol* 2011; 17: 3-16.
93. Antinori A, Arendt G, Becker JT, et al. Updated research nosology for HIV associated neurocognitive disorders. *Neurology* 2007; 69: 1789–99.
94. Price, R.W. (1997). In M.A. Sande & P.A. Volberding (Eds.), *The Medical Management of AIDS* (5th ed). Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company.
95. Cysique LA, Maruff P, Brew BJ. Prevalence and pattern of neuropsychological impairment in human immunodeficiency virus-infected/acquired immunodeficiency syndrome (HIV/AIDS) patients across pre- and post-highly active antiretroviral therapy eras: a combined study of two cohorts. *J Neurovirol* 2004; 10: 350–7.
96. Grupo de Expertos de la Secretaría del Plan Nacional Sobre el Sida (SPNS); Sociedad Española de Psiquiatría (SEP); Grupo de Estudio de Sida (GESIDA);

- Sociedad Española de Infectología Pediátrica (SEIP). [Consensus document on psychiatric and psychological aspect in adults and children with HIV infection]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2016 Jan;34: 53.e1-53.e14.
97. Winston A, Garvey L, Scotney E et al. Does acute hepatitis C infection affect the central nervous system in HIV-1 infected individuals? *J Viral Hepatitis* 2010; 17: 419-26.
 98. Jayadev S, Garden GA. Host and viral factors influencing the pathogenesis of HIV-associated neurocognitive disorders. *J Neuroimmune Pharmacol* 2009; 4: 175-189.
 99. Del Guerra FB, Fonseca JL, Figueiredo VM, Ziff EB, Konkiewitz EC. Human immunodeficiency virus-associated depression: contributions of immunoinflammatory, monoaminergic, neurodegenerative, and neurotrophic pathways. *J Neurovirol* 2013; 19: 314-27.
 100. Robertson K, Bayon C, Molina JM, et al. Screening for neurocognitive impairment, depression, and anxiety in HIV-infected patients in Western Europe and Canada. *AIDS Care* 2014; 26: 1555-61.
 101. Cysique LA, Brew BJ. Prevalence of non-confounded HIV-associated neurocognitive impairment in the context of plasma HIV RNA suppression. *J Neurovirol* 2011; 17: 176-83.
 102. Sacktor N, McDermott MP, Marder K, et al. HIV-associated cognitive impairment before and after the advent of combination therapy. *J Neurovirol* 2002; 8: 136-42.
 103. [no autor listen]. Nomenclature and research case definitions for neurologic manifestations of human immunodeficiency virus-type 1 (HIV-1) infection. Report of a Working Group of the American Academy of Neurology AIDS Task Force. *Neurology* 1991; 41: 778-85.
 104. Grant I, Franklin DR Jr, Deutsch R, et al. Asymptomatic HIV-associated neurocognitive impairment increases risk for symptomatic decline. *Neurology* 2014; 82: 2055-62.
 105. Blackstone K, Moore DJ, Heaton RK, et al. Diagnosing symptomatic HIV-associated neurocognitive disorders: self-report versus performance-based assessment of everyday functioning. *J Int Neuropsychol Soc* 2012; 18: 79-88.
 106. Cherner M, Cysique L, Heaton RK, et al. Neuropathologic confirmation of definitional criteria for human immunodeficiency virus-associated neurocognitive disorders. *J Neurovirol* 2007; 13: 23-28.
 107. Cysique LA, Franklin D Jr, Abramson I, et al. Normative data and validation of a regression based summary score for assessing meaningful neuropsychological change. *J Clin Exp Neuropsychol* 2011; 33: 505-22.
 108. Blackstone K, Moore DJ, Heaton RK, et al. Diagnosing symptomatic HIV-associated neurocognitive disorders: self-report versus performance-based assessment of everyday functioning. *J Int Neuropsychol Soc* 2012; 18: 79-88.

109. Blackstone K, Moore DJ, Franklin DR, et al. Defining neurocognitive impairment in HIV: deficit scores versus clinical ratings. *Clin Neuropsychol* 2012; 26: 894-908.
110. Carey CL, Woods SP, Gonzalez R, et al. Predictive validity of global deficit scores in detecting neuropsychological impairment in HIV infection. *J Clin Exp Neuropsychol* 2004; 26: 307-19.
111. Sakamoto M, Marcotte TD, Umlauf A, et al. Concurrent classification accuracy of the HIV dementia scale for HIV-associated neurocognitive disorders in the CHARTER Cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2013; 62: 36-42.
112. Ellis RJ, Evans SR, Clifford DB, et al. Clinical validation of the NeuroScreen. *J Neurovirol* 2005;11: 503-11.
113. D'Arminio Monforte A, Cinque P, Mocroft A et al. Changing incidence of central nervous system diseases in the EuroAIDS cohort. *Ann Neurol* 2004; 55: 320-8.
114. Simioni S, Cavassini M, Annoni JM et al. Cognitive dysfunction in HIV patients despite long-standing suppression of viremia. *AIDS* 2010; 24: 1243-50.
115. Letendre S, Marquie-Beck J, Capparelli E et al. Validation of the CNS penetration-effectiveness rank for quantifying antiretroviral penetration into the central nervous system. *Arch Neurol* 2008; 65: 65-70.
116. Letendre S, Ellis RJ, Deutsch R et al. Correlates of Time-to-Loss-of-Viral-Response in CSF and Plasma in the CHARTER Cohort: CPE Score predicts CSF suppression. 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. San Francisco, CA, 2010. Abstract 430.
117. Letendre SL, McCutchan JA, Childers ME, et al. Enhancing antiretroviral therapy for human immunodeficiency virus cognitive disorders. *Ann Neurol* 2004; 56: 416-23.
118. Cysique LA, Vaida F, Letendre S, et al. Dynamics of cognitive change in impaired HIV-positive patients initiating antiretroviral therapy. *Neurology* 2009; 73: 342-8.
119. Marra CM, Zhao Y, Clifford BD, et al. Impact of combination antiretroviral therapy on cerebrospinal fluid HIV RNA and neurocognitive performance. *AIDS* 2009; 23: 1359-66.
120. Tozzi V, Balestra P, Salvatori MF, et al. Changes in cognition during antiretroviral therapy: comparison of 2 different ranking systems to measure antiretroviral drug efficacy on HIV-associated neurocognitive disorders. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009; 52: 56-63.
121. Smurzynski M, Wu K, Letendre S, et al. Effects of central nervous system antiretroviral penetration on cognitive functioning in the ALLRT cohort. *AIDS* 2011; 25: 357-65.
122. Antinori A, Lorenzini P, Giancola ML et al. Antiretroviral CNS Penetration-Effectiveness (CPE) 2010 ranking predicts CSF viral suppression only in patients

- with undetectable HIV-1 RNA in plasma. 18th Conference on retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, USA, 2011. Abstract 426.
123. Ellis RJ, Letendre S, Vaida F, et al. Randomized trial of central nervous system-targeted antiretrovirals for HIV-associated neurocognitive disorder. *Clin Infect Dis* 2014; 58: 1015-22.
 124. Heaton RK, Clifford DB, Franklin DR Jr, et al. HIV-associated neurocognitive disorders persist in the era of potent antiretroviral therapy: CHARTER Study. *Neurology* 2010; 75: 2087-96.
 125. Heaton RK, Franklin DR Jr, Deutsch R, et al. Neurocognitive change in the era of HIV combination antiretroviral therapy: the longitudinal CHARTER study. *Clin Infect Dis* 2015; 60: 473-80.
 126. Robertson K, Liner J, Meeker RB. Antiretroviral neurotoxicity. *J Neurovirol* 2012; 18: 388–399.
 127. Akay C, Cooper M, Odeleye A, et al. Antiretroviral drugs induce oxidative stress and neuronal damage in the central nervous system. *J Neurovirol* 2014; 20: 39–53.
 128. Winston A, Duncombe C, Li PCK, et al. Does choice of combination antiretroviral therapy (cART) alter changes in cerebral function testing after 48 weeks in treatment-naïve, HIV-1-infected individuals commencing cART? A randomized controlled study. *Clin Infect Dis* 2010; 50: 920–929.
 129. Ciccarelli N, Fabbiani M, Di Giambenedetto S, et al. Efavirenz associated with cognitive disorders in otherwise asymptomatic HIV-infected patients. *Neurology* 2011; 76: 1403–1409.
 130. Waters L, Fisher M, Winston A, et al. A phase IV, double-blind, multicentre, randomized, placebo-controlled, pilot study to assess the feasibility of switching individuals receiving efavirenz with continuing central nervous system adverse events to etravirine. *AIDS* 2011; 25: 65–71.
 131. Nguyen A, Calmy A, Delhumeau C, et al. A randomized cross-over study to compare raltegravir and efavirenz (SWITCH-ER study). *AIDS* 2011; 25: 1481–1487.
 132. Robertson KR, Su Z, Margolis DM, et al. Neurocognitive effects of treatment interruption in stable HIV-positive patients in an observational cohort. *Neurology* 2010; 74:1260–1266.
 133. Letendre SL, Ellis R, Ances B, McCutchan J. Neurologic complications of HIV disease and their treatment. *Top HIV Med* 2010; 18: 45-55.
 134. Garvey L, Winston A, Sabin C, the UK CHIC Study Group. Does cART with greater CNS penetration prevent the development of CNS opportunistic diseases? 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. San Francisco, USA, 2010. Abstract 427. At: retroconference.org/2010/Abstracts/38931.htm

135. Caniglia EC, Cain LE, Justice A, et al. Antiretroviral penetration into the CNS and incidence of AIDS-defining neurologic conditions. *Neurology* 2014; 83: 134–141.
136. Joska JA, Gouse H, Paul RH, Stein DJ, Flisher AJ. Does highly active antiretroviral therapy improve neurocognitive function? A systematic review. *J Neurovirol.* 2010; 16: 101-14.
137. Desplats P, Dumaop W, Smith D, et al. Molecular and pathologic insights from latent HIV-1 infection in the human brain. *Neurology.* 2013; 80: 1415-23.
138. Ellis RJ, Badiee J, Vaida F, et al. CD4 nadir is a predictor of HIV neurocognitive impairment in the era of combination antiretroviral therapy. *AIDS* 2011; 25: 1747-51.
139. Panel GESIDA. Documento de consenso de Gesida/Plan Nacional sobre el Sida respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (Actualización enero 2011). Disponible en: www.gesida-seimc.org/contenidos/guiasclinicas/2011/gesidadcyr2011-Documentoconsenso-TAR-adulto-verordenador.pdf
140. Pulido F, Arribas JR, Delgado R, et al. Lopinavir-ritonavir monotherapy versus lopinavir-ritonavir and two nucleosides for maintenance therapy of HIV. *AIDS* 2008; 22: F1-9.
141. Arribas JR, Horban A, Gerstoft J, et al. The MONET trial: darunavir/ritonavir with or without nucleoside analogues, for patients with HIV RNA below 50 copies/ml. *AIDS* 2010; 24: 223-30.
142. Paton NI, Stöhr W, Arenas-Pinto A, et al. Protease inhibitor monotherapy for long-term management of HIV infection: a randomised, controlled, open-label, non-inferiority trial. *Lancet HIV* 2015; 2: e417-26.
143. Pulido F, Pérez-Valero I, Delgado R, et al. Risk factors for loss of virological suppression in patients receiving lopinavir/ritonavir monotherapy for maintenance of HIV suppression. *Antivir Ther* 2009; 14: 195-201.
144. Clarke A, Johanssen V, Gerstoft J, et al. Protea Analysis of neurocognitive function and CNS endpoints in the PROTEA trial: darunavir/ritonavir with or without nucleoside analogues. *J Int AIDS Soc* 2014; 17: 19526.
145. Gisslén M, Fuchs D, Hagberg L, Svennerholm B, Zetterberg H. Cerebrospinal fluid viral breakthrough in two HIV-infected subjects on darunavir/ritonavir monotherapy. *Scand J Infect Dis* 2012; 44: 997-1000.
146. Imaz A, Cayuela N, Niubó J, Tiraboschi JM, Izquierdo C, Cabellos C, Podzamczer D. Short communication: focal encephalitis related to viral escape and resistance emergence in cerebrospinal fluid in a patient on lopinavir/ritonavir monotherapy with plasma HIV-1 RNA suppression. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2014; 30: 984-7.

147. Gutmann C, Cusini A, Günthard HF, et al. Randomized controlled study demonstrating failure of LPV/r monotherapy in HIV: the role of compartment and CD4-nadir. *AIDS* 2010; 24: 2347-54.
148. Grupo de expertos del Grupo de Estudio de Sida (GeSIDA) y de la Secretaría del Plan Nacional sobre el Sida (SPNS), Podzamczer Palter D, Muñoz-Moreno JA, et al. [Consensus statement on the clinical management of human immunodeficiency virus-associated neurocognitive disorders]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014; 32: 37-47.
149. Wechsler D. (1997). Wechsler adult intelligence scale: Administration and scoring manual (3rd ed). San Antonio, TX: The Psychological Corporation.
150. Golden,CJ, & Freshwater, SM. (2002). Stroop color and Word test: A manual for clinical and experimental uses. Wood Dale, IL: Stoetling Company.
151. Periañez JA, Ríos-Lago M, Rodríguez-Sánchez JM, et al. Trail Making Test in traumatic brain injury, schizophrenia, and normal ageing: sample comparisons and normative data *Arch Clin Neuropsychol* 2007;22(4):433–447.
152. Tombaugh TN, Kozak, J, Rees L. Normative data stratified by age and education for two measures of verbal fluency: FAS and animal naming. *Arch Clin Neuropsychol* 1999; 14: 167–177.
153. Morales, M, Campo P, Fernández A, Moreno D, Yáñez J, Sañudo I. Normative data for a six-trial administration of a spanish version of the verbal selective reminding test. *Arch Clin Neuropsychol* 2010; 25: 745–761.
154. Benedict RH. (1997). Brief Visuospatial Memory Test-Revised. Odessa, FL: Psychological Assessment Resources, Inc.
155. Trites RL. (1977). Neuropsychological Test Manual. Ottawa, Ontario: Royal Ottawa Hospital.
156. Arribas JR, Girard PM, Paton N et al. Efficacy of protease inhibitor monotherapy vs. triple therapy: meta-analysis of data from 2303 patients in 13 randomized trials. *HIV Med*. 2015. doi: 10.1111/hiv.12348.
157. Caramatti G, Ferretti F, Di Biagio A, et al. Similar neurocognitive performance in patients on ATV/r monotherapy vs triple therapy. Seattle: CROI 2015; 2015. <http://www.croiconference.org/sessions/similar-neurocognitive-performance-patients-atvr-monotherapy-vs-triple-therapy>.
158. Gates TM, Cysique LA. The Chronicity of HIV Infection Should Drive the Research Strategy of NeuroHIV Treatment Studies: A Critical Review. *CNS drugs* 2016. DOI 10.1007/s40263-015-0302-7.
159. Katlama C, Valantin MA, Algarte-Genin M, et al. Efficacy of darunavir/ritonavir maintenance monotherapy in patients with HIV-1 viral suppression: a randomized open-label, noninferiority trial, MONOI-ANRS 136. *AIDS* 2010; 24: 2365-74.

160. Kakuda TN, Opsome M, Timmers M, et al. Pharmacokinetics of darunavir in fixed-dose combination with cobicistat compared with coadministration of darunavir and ritonavir as single agents in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 2014; 54: 949-57.
161. Raffi F, Babiker AG, Richert L, et al. Ritonavir-boosted darunavir combined with raltegravir or tenofovir-emtricitabine in antiretroviral-naive adults infected with HIV-1: 96 week results from the NEAT001/ANRS143 randomised non-inferiority trial. *Lancet* 2014; 384: 1942-51.

E. APENDICES

APÉNDICE 1: Factor de impacto y Área temática de las revistas (JCR 2014)

Revista	Factor de impacto	Área temática
J ANTIMICROB CHEMOTH	5,338 (D1)	Enfermedades Infecciosas
PLOS ONE	3,730 (Q1)	Medicina Interna
J NEUROVIROL	2,850 (Q2)	Neurología
JAIDS	4,653 (Q1)	Enfermedades Infecciosas
CLIN INFECT DIS	9,374 (D1)	Enfermedades Infecciosas

APÉNDICE 2: Justificación de la contribución del doctorando

Artículo I. Perez-Valero I, Bayon C, Cambron I, Gonzalez A, Arribas JR. *Protease inhibitor monotherapy and the CNS: peace of mind?* J Antimicrob Chemother. 2011;66(9):1954-62.

La contribución del doctorando, Ignacio Pérez Valero, a este primer trabajo consistió en: Revisión sistemática de la literatura indexada en Pubmed hasta 2011 de acuerdo con los términos “HIV” AND (“*Protease Inhibitor Monotherapy*” OR “*Darunavir*” OR “*Lopinavir*”) AND (“*Neurocognitive*” OR “*HIV-associated Neurocognitive Disorder*” OR “*CSF*” OR “*Cerebrospinal Fluid*”). Revisión de los trabajos presentados en congresos científicos cuyo objetivo fuese evaluar la monoterapia con inhibidores de proteasa en los que se presentaron resultados relacionados con el efecto de ésta estrategia sobre el SNC. Colaboración en la redacción del artículo. Colaboración en las correcciones requeridas por los evaluadores de la revista.

Artículo II. Pérez-Valero I, González-Baeza A, Estébanez M, Montes-Ramírez ML, Bayón C, Pulido F, Bernardino JI, Zamora FX, Monge S, Gaya F, Lagarde M, Rubio R, Hernando A, Arnalich F, Arribas JR. *Neurocognitive impairment in patients treated with protease inhibitor monotherapy or triple drug antiretroviral therapy.* PLoS One 2013;8(7):e69493.

La contribución del doctorando a este segundo trabajo consistió en: Colaboración en el planteamiento inicial y posterior desarrollo del proyecto. Colaboración en la selección de las pruebas neurocognitivas utilizadas. Colaboración en la elaboración del CRD y base de datos del estudio. Colaboración en la elaboración de una herramienta de corrección de la evaluación neurocognitiva automatizada con cálculo automático del GDS y de la presencia/ausencia de deterioro neurocognitivo. Colaboración en la evaluación del grado y tipo de deterioro neurocognitivo. Colaboración en la evaluación de los resultados. Colaboración en

la realización de los análisis estadísticos. Colaboración en la redacción del artículo. Colaboración en las correcciones requeridas por los evaluadores de la revista.

Artículo III. González-Baeza A, Carvajal F, Bayón C, Pérez-Valero I, Estébanez M, Bernardino JI, Monge S, Lagarde M, Hernando A, Arnalich F, Arribas JR. *Pattern of neurocognitive function in patients receiving boosted protease inhibitor monotherapy: a detailed neuropsychological study.* J Neurovirol. 2014;20(4):362-70.

La contribución del doctorando a este tercer trabajo consistió en: Colaboración en el planteamiento inicial y posterior desarrollo del proyecto. Colaboración en la selección de las pruebas neurocognitivas utilizadas. Colaboración en la elaboración del CRD y base de datos de estudio. Colaboración en la elaboración de una herramienta de corrección de la evaluación neurocognitiva automatizada. Colaboración en la evaluación del grado y tipo de deterioro neurocognitivo. Colaboración en la evaluación de los resultados. Colaboración en la realización de los análisis estadísticos. Colaboración en la redacción del artículo. Colaboración en las correcciones requeridas por los evaluadores de la revista.

Artículo IV Estébanez M, Stella-Ascariz N, Mingorance J, Pérez-Valero I, González-Baeza A, Bayón C, Lakatos B, Borobia A, Arnalich F, Arribas JR. *A comparative study of neurocognitively impaired patients receiving protease inhibitor monotherapy or triple-drug antiretroviral therapy.* J Acquir Immune Defic Syndr 2014;67(4):419-23

La contribución del doctorando a este cuarto trabajo consistió en: Colaboración en el planteamiento inicial y posterior desarrollo del proyecto. Colaboración en la evaluación del deterioro neurocognitivo de los pacientes. Colaboración en la realización de las punciones lumbares diagnósticas. Colaboración en la selección de los biomarcadores en LCR adecuados para evaluar niveles de inflamación.

Colaboración en el procesamiento de la carga viral de VIH y de los biomarcadores en las muestras de LCR obtenidas. Colaboración en la realización de los análisis estadísticos. Colaboración en la redacción del artículo. Colaboración en las correcciones requeridas por los evaluadores de la revista.

Artículo V. Pérez-Valero I, González-Baeza A, Estébanez M, Monge S, Montes-Ramírez ML, Bayón C, Pulido F, Bernardino JI, Zamora FX, González-García JJ, Lagarde M, Hernando A, Arnalich F, Arribas JR. *A prospective cohort study of neurocognitive function in aviremic HIV-infected patients treated with 1 or 3 antiretrovirals.* Clin Infect Dis. 2014;59(11):1627-34.

Por último, la contribución del doctorando a este quinto trabajo consistió en: Colaboración en el planteamiento inicial y posterior desarrollo del proyecto. Colaboración en la selección de las pruebas neurocognitivas utilizadas. Colaboración en la elaboración del CRD y base de datos de estudio. Colaboración en la elaboración de una herramienta de corrección de la evaluación neurocognitiva automatizada con cálculo automático del GDS y de los CR. Colaboración en el seguimiento clínico de los pacientes. Colaboración en la evaluación del grado y tipo de deterioro neurocognitivo. Colaboración en la evaluación de los resultados. Colaboración en la realización de los análisis estadísticos. Colaboración en la redacción del artículo. Colaboración en las correcciones requeridas por los evaluadores de la revista.

ABREVIATURAS

- ADA – Adenosina Deaminasa
- ADN - Ácido Desoxirribonucleico
- ANI – *Asymptomatic Neurocognitive Impairment*
- APOBEC3G - *Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G*
- APP – Proteína precursora del amiloide
- ARN - Ácido Ribonucleico
- ARNtLys - Iniciadores de ARN transferente
- BHE – Barrera hemato-encefálica
- BNCS – Brief Neuro-Cognitive Screen
- CCL2 - Quimioquina C-C ligando tipo 2
- CCL3 - Quimioquina C-C ligando tipo 3
- CCL4 - Quimioquina C-C ligando tipo 4
- CCL5 - Quimioquina C-C ligando tipo 5
- CCR1 - Receptores de quimiocinas C-C tipo 1
- CCR2 - Receptores de quimiocinas C-C tipo 2
- CCR3 - Receptores de quimiocinas C-C tipo 3
- CCR5 – Receptores de quimiocinas C-C tipo 5
- CD4 – Cúmulo de Diferenciación 4
- CHARTER - The CNS HIV Anti-Retroviral Therapy Effects Research
- CPE Score – CNS Penetration and Effectiveness Score
- CXCL3 - Quimioquina C-X3-C ligando
- CXCL8 - Quimioquina C-X8-C ligando
- CXCR – Receptores de quimiocinas de la familia C-X-C
- CXCR4 – Receptor de quimiocinas C-X-C tipo 4
- DS – Desviación Estándar
- env – Envelope glycoprotein gene
- Env – Glicoproteína de la envuelta
- ESCRT - complejos cortos endosómicos necesarios para el transporte
- gag - Group-specific antigen gene
- Gag - Group-specific antigen
- GDS – Global Deficit Score
- GRS – Global Rating Score
- gp – Glicoproteínas
- HAD – *HIV-Associated Dementia*
- HAND – HIV-Associated Neurocognitive Disorder
- HAX-1 - Proteína X-1 asociada al HCLS1
- HDS – HIV Dementia Score

HTLV - *Human T-lymphotropic virus*
IgG – Inmunoglobulina G
IL-1 - interleuquina-1
IL-8 – Interleuquina 8
IL-1 β - Interleuquina-1 beta
LCR – Líquido ceforraquideo
Lck - *Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*
LEDGF/p75 - Proteína lenticular factor de crecimiento derivado del epitelio/p75
LTR - Promotor retroviral
MCMD - Minor cognitive motor disorder
MCP-1 – Proteína-1 quimoatrayente de monocitos
MND – *Mild Neurocognitive Disorders*
nef - *Negative Factor* gene
Nef - *Negative Factor*
NELF - Negative Elongation Factor
NLS - Señal de localización nuclear
NMDA - N-metil-D-aspartato
PBM – Proteína Básica de la Mielina
p10 – Proteasa viral
p15 – ARNasa
p31 – Integrasa viral
p50 – Transcriptasa inversa
p53 – Proteína tumoral p53
pol - DNA polymerase gene
Pol - DNA polymerase
rev - Regulator of Virion gene
Rev - Regulator of Virion
RNAP II – ARN polimerasa 2
SNC – Sistema Nervioso Central
TAR - *Transactivator active region*
tat - Trans-Activator of Transcription gene
Tat - Trans-Activator of Transcription
TBP – Proteína de unión a TATA
TNF- α - factor de necrosis tumoral alfa
VDRL - *Venereal Disease Research Laboratory*
vif - *Virion Infectivity Factor* gene
Vif - *Virion Infectivity Factor*
VIH - Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1
VIH-2 - Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2
vpr - *Viral Protein Regulatory gene*

Vpr - *Viral Protein Regulatory*

VprBP - *Vpr binding protein*

vpu - *Viral Protein Unknown gene*

Vpu - *Viral Protein Unknown*

XMRV - *Xenotropic murine leukemia virus-related virus*