

# TESIS DOCTORAL

**Impacto de la ausencia de respuesta T CD8+ CMV-específica  
en donantes CMV-seropositivos sobre la reactivación de CMV  
tras el trasplante hematopoyético en receptores  
CMV-seropositivos**

---

**Impact of the lack of CMV-specific CD8+ T response in  
CMV-seropositive donors on CMV reactivation after  
hematopoietic transplantation in CMV-seropositive recipients**

*Programa de doctorado:*

**BIOMEDICINA**

*Autor de la tesis:*

**JORGE VALLE ARROYO**

*Director de la tesis:*

**Dr. D. Julián de la Torre Cisneros**

Córdoba, Febrero de 2024

TITULO: *Impacto de la ausencia de respuesta T CD8+ CMV-específica en donantes CMV-seropositivos sobre la reactivación de CMV tras el trasplante hematopoyético en receptores CMV-seropositivos*

AUTOR: *Jorge Valle Arroyo*

---

© Edita: UCOPress. 2024  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>  
[ucopress@uco.es](mailto:ucopress@uco.es)

---









## **TESIS DOCTORAL**

# **Impacto de la ausencia de respuesta T CD8+ CMV-específica en donantes CMV-seropositivos sobre la reactivación de CMV tras el trasplante hematopoyético en receptores CMV-seropositivos**

Impact of the lack of CMV-specific CD8+ T response in CMV-seropositive donors on CMV reactivation after hematopoietic transplantation in CMV-seropositive recipients

*Programa de doctorado:*

**BIOMEDICINA**

*Autor de la tesis:*

**JORGE VALLE ARROYO**

*Director de la tesis:*

**Dr. D. Julián de la Torre Cisneros**

Córdoba, Febrero de 2024



## DOCTORANDA/O

Jorge Valle Arroyo

## TÍTULO DE LA TESIS:

Impacto de la ausencia de respuesta T CD8+ CMV-específica en donantes CMV-seropositivos sobre la reactivación de CMV tras el trasplante hematopoyético en receptores CMV-seropositivos

## INFORME RAZONADO DE LAS/LOS DIRECTORAS/ES DE LA TESIS

**(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma)**

El trabajo que se presenta en esta tesis doctoral ha permitido evaluar el impacto de la discordancia humoral/celular de donantes CMV-seropositivos sobre la reconstitución de la inmunidad celular CMV-específica y en la reactivación del CMV tras el trasplante hematopoyético en receptores CMV-seropositivos. Los resultados derivados de este trabajo han permitido al doctorando publicar dos artículos como primer autor:

- 1) Lack of cytomegalovirus (CMV)-specific cell-mediated immune response using QuantIFERON-CMV assay in CMV-seropositive healthy volunteers: fact not artifact. Publicado en la revista Scientific Reports.
- 2) Humoral/Cellular Immune Discordance in Stem Cell Donors: Impact on Cytomegalovirus-Specific Immune Reconstitution after Related Hematopoietic Transplantation. Publicado en la revista Transplantation and Cellular Therapy.

Asimismo, los resultados obtenidos han sido presentados en varios congresos nacionales (Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica -SEIMC-) e internacionales (European Congress of Immunology -ECI-). Además, el doctorando también ha participado en la publicación de otros trabajos científicos relacionados con la temática de su tesis.

Por tanto, el desarrollo de la tesis le ha permitido adquirir los conocimientos científicos suficientes para poder optar al título de Doctor en Biomedicina.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

**Córdoba, a 14 de febrero de 2024**

**Las/los directoras/es**

Fdo.: Julián De la Torre Cisneros





## **AGRADECIMIENTOS:**

En este apartado quiero manifestar mi gratitud a todas aquellas personas que han contribuido de una forma u otra en el desarrollo de este trabajo.

Gracias a todos los participantes y, en especial, a los pacientes que a pesar de que estaban atravesando graves problemas de salud, nos prestaron ayuda con sus muestras de sangre para poder llevar a cabo el estudio.

Al director de la tesis, el Dr. Julián de la Torre y a mis compañeras del grupo de Enfermedades infecciosas del Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC) por su ayuda en esta travesía. También me gustaría agradecer al Servicio de Hematología del Hospital Universitario Reina Sofía, así como al Centro de Transfusión, Tejidos y Células de Córdoba por su colaboración en el reclutamiento de pacientes. Por supuesto, también hay espacio para recordar y agradecer al resto de hospitales participantes, y las personas que, con su esfuerzo y abnegación, en cada uno de ellos, me han ayudado.

A mis amigos/as de la sala predoctoral de la 2ª planta del IMIBIC. Vuestras palabras de ánimo siempre me ayudaron en momento complicados. Nunca olvidaré aquellas largas tardes...

A mis padres, Antonio y Sole, por escucharme y aconsejarme siempre. Me siento responsable de no pocas de sus canas. Y muy especialmente, a mi hermana María Belén, que, a pesar de ser varios años más pequeña, ella me ha servido de ejemplo a mí, su positividad extrema (inconsciencia) y su capacidad para animarme consiguieron que tuviera la confianza que me faltaba durante esta dura etapa.

“La permanencia, perseverancia y persistencia a pesar  
de todos los obstáculos, desalientos e imposibilidades:  
es eso lo que distingue las almas fuertes de las débiles”

*Thomas Carlyle*





## ÍNDICE GENERAL

<b>1. ABREVIATURAS</b> .....	<b>1</b>
<b>2. RESUMEN</b> .....	<b>3</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>7</b>
<b>3.1 Estructura del Citomegalovirus</b> .....	<b>7</b>
<b>3.2 Ciclo de vida del virus</b> .....	<b>8</b>
<b>3.3 Epidemiología, vías de transmisión y patogénesis</b> .....	<b>10</b>
<b>3.4 Trasplante de progenitores hematopoyéticos</b> .....	<b>12</b>
3.4.1 Aspectos generales.....	12
3.4.2 Fuente de progenitores y tipos de trasplante según la identidad HLA.....	13
<b>3.5 Reconstitución inmune tras el trasplante alogénico de progenitores</b> .....	<b>14</b>
3.5.1 Reconstitución global.....	15
3.5.2 Reconstitución de la inmunidad mediada por células frente a CMV.....	17
<b>3.6 Complicaciones asociadas a la infección por CMV en el alo-TPH</b> .....	<b>18</b>
3.6.1 Factores de riesgo asociados a la infección por CMV en pacientes alo-TPH.....	19
3.6.2 Definiciones de infección y enfermedad por CMV en el TPH.....	20
<b>3.7 Estrategias de prevención de la infección por CMV en pacientes alo-TPH</b> .....	<b>21</b>
3.7.1 Profilaxis universal.....	23
3.7.2 Terapia anticipada.....	24
3.7.3 Fármacos empleados en la infección por CMV en el contexto del alo-TPH.....	25
<b>3.8 Control inmunológico de la infección por CMV</b> .....	<b>26</b>
3.8.1 Inmunidad innata.....	26
3.8.2 Inmunidad adaptativa.....	27
3.8.3 Principales técnicas de monitorización de la IMC-CMV.....	30
3.8.4 Importancia de la monitorización de la IMC-CMV en pacientes alo-TPH.....	35
<b>3.9 Discordancia inmune humoral/celular frente al CMV</b> .....	<b>38</b>
<b>4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>43</b>
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>50</b>
<b>5.1 Bloque I</b> .....	<b>50</b>
5.1.1 Características de los participantes y diseño del estudio.....	50
5.1.2 Determinación de los niveles de IgG e IgM anti-CMV.....	50
5.1.3 Tipaje HLA.....	51
5.1.4 Ensayo del QF-CMV para la determinación de la IMC-CMV.....	52

5.1.5	Análisis de la IMC-CMV mediante la técnica FASCIA .....	53
5.1.6	Cuantificación de la subpoblación de linfocitos T CD8+ CMV-específica mediante la tecnología de los dextrámeros .....	54
5.1.7	Análisis estadístico del bloque I .....	55
<b>5.2</b>	<b>Bloque II .....</b>	<b>58</b>
5.2.1	Diseño del estudio y participantes .....	58
5.2.2	Definiciones .....	59
5.2.3	Determinación de los niveles de IgG anti-CMV y de la carga viral .....	60
5.2.4	Determinación de la IMC-CMV mediante el ensayo del QF-CMV .....	60
5.2.5	Tecnología de los dextrámeros para la cuantificación de la subpoblación de los linfocitos T CD8+ CMV-específicos .....	61
5.2.6	Análisis estadístico del bloque II .....	61
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>66</b>
<b>6.1</b>	<b>Bloque I .....</b>	<b>66</b>
6.1.1	Características demográficas de los sujetos de estudio.....	66
6.1.2	Análisis de la discordancia humoral/celular .....	66
6.1.3	Diferencias en la respuesta proliferativa entre voluntarios discordantes y no discordantes .....	67
6.1.4	Caracterización de los individuos CMV-seropositivos discordantes y no discordantes (V+QFneg vs. V+QFpos) .....	69
6.1.5	Sujetos sanos discordantes CMV-seronegativos (V-QFpos) .....	73
<b>6.2</b>	<b>Bloque II .....</b>	<b>76</b>
6.2.1	Características clínicas y demográficas .....	76
6.2.2	Serología CMV e IMC-CMV de los donantes .....	78
6.2.3	Impacto del tipo de donante sobre la reconstitución estable de la IMC-CMV de los receptores después del alo-TPH .....	79
6.2.4	Impacto de la reactivación de CMV en la reconstitución de la IMC-CMV .....	80
6.2.5	Factores asociados con la reconstitución estable de la IMC-CMV .....	85
<b>7.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>96</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>109</b>
<b>9.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>113</b>
<b>10.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>141</b>







## 1. ABREVIATURAS

AF700	Alexa Fluor 700
Alo-TPH	Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos
APC	Aloficocianina
AUC	Área bajo la curva
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CMV	Citomegalovirus
CPA/APC	Células presentadoras de antígenos
D-	Donante CMV-seronegativo
D+	Donante CMV-seropositivo
D+QFneg	Donante CMV-seropositivo sin IMC-CMV (Discordante)
D+QFpos	Donante CMV-seropositivo con IMC-CMV (no discordante)
DE	Desviación estándar
ECIL 7	European Conference on Infections in Leukaemia 2017
EICH	Enfermedad de injerto contra huésped
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
ELIspot	Ensayo spot inmunoabsorbente ligado a enzimas
FSC	Forward Scatter
gB	Glicoproteína B del CMV
gH	Glicoproteína H del CMV
HLA	Antígeno leucocitario humano
IC	Intervalo de confianza
ICS	Tinción intracelular de citoquinas
IL	Interleuquina
IMC-CMV	Inmunidad mediada por células frente a CMV
IE-1	Proteína precoz 1 del CMV
IFNG	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
MFM	Micofenolato de mofetilo

---

MRT	Mortalidad relacionada con el trasplante
NK	Células Natural Killer
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Tampón fosfato salino
PBSA	PBS suplementado con albúmina sérica bovina
PE	Ficoeritrina
PHA	Fitohemaglutinina
pp65	Fosfolipoproteína 65 del CMV
PWM	Mitógeno de la <i>Phytolacca americana</i>
QF-CMV	QuantiFERON-CMV
R-	Receptor CMV-seronegativo
R+	Receptor CMV-seropositivo
RIQ	Rango intercuartílico
RPMI	Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute
RR	Razón de riesgo/Riesgo relativo
SEA	Enterotoxina A de <i>Staphylococcus aureus</i>
SEB	Enterotoxina B de <i>Staphylococcus aureus</i>
SSC	Side Scatter
TCR	Receptor de la célula T
TLR	Receptor tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
TPH	Trasplante de progenitores hematopoyéticos
UA	Unidades arbitrarias
UI	Unidades internacionales
V-	Voluntario sano CMV-seronegativo
V+	Voluntario sano CMV-seropositivo
V+QFneg	Voluntario sano CMV-seropositivo sin IMC-CMV (Discordante)
V+QFpos	Voluntario sano CMV-seropositivo con IMC-CMV (no discordante)
Vs.	versus

## 2. RESUMEN

En diferentes estudios previos, se ha observado que hay alrededor de un 20% de individuos sanos con serología positiva frente al citomegalovirus (IgG anti-CMV) que muestran una discordancia inmune, ya que, a pesar de ser CMV-seropositivos carecen de inmunidad mediada por células frente a CMV (IMC-CMV) cuando se analiza con la técnica del QuantiFERON-CMV (QF-CMV). **El objetivo principal** del presente proyecto de tesis doctoral es analizar el impacto de la discordancia humoral/celular de donantes CMV-seropositivos sobre la reconstitución de la IMC-CMV y en la reactivación del CMV tras el trasplante hematopoyético en receptores CMV-seropositivos.

En primer lugar, evaluamos si la discordancia humoral/celular en sujetos sanos CMV-seropositivos con un resultado QFneg es, como sugieren algunos autores, un artefacto relacionado con el tipo de estímulo que utiliza el ensayo del QF-CMV, o si realmente estos sujetos muestran una IMC-CMV deficiente. Para ello, comparamos en un grupo de voluntarios sanos la IMC-CMV medida con el QF-CMV, que usa como estímulo 22 péptidos de CMV, con la IMC-CMV obtenida por la técnica FASCIA que usa como estímulo un lisado viral de CMV. De los 93 individuos reclutados, 71 fueron voluntarios CMV-seropositivos (V+), entre los que había 13 V+ discordantes (18.3%) (V+QFneg). Los sujetos V+QFneg tenían significativamente menor proliferación de linfocitos T CD4+ con el lisado viral que los no discordantes V+QFpos (154.0 vs. 301.5 células/ $\mu$ L;  $p=0.038$ ). También con los linfocitos T CD8+ observamos una tendencia hacia una menor proliferación en V+QFneg que en V+QFpos (4.0 vs. 12.5 células/ $\mu$ L;  $p=0.059$ ). Al estimular con las enterotoxinas A y B de *Staphylococcus aureus* la proliferación también fue menor en V+QFneg tanto en células T CD4+ (188.0 vs. 631.5 células/ $\mu$ L;  $p=0.018$ ) como en las T CD8+ (80.0 vs. 446.0 células/ $\mu$ L;  $p=0.003$ ).

En cuanto a la inmunidad humoral se observó que los sujetos V+QFneg tenían un nivel significativamente más bajo de IgG anti-CMV que los V+QFpos (1.7 UI/ml vs. 5.6 UI/ml;  $p=0.001$ ). En conclusión, los voluntarios V+QFneg muestran una IMC-CMV más débil que los individuos V+QFpos, no sólo en la liberación de IFNG sino también en la respuesta proliferativa y humoral. Además, este estudio también demuestra que un resultado QFneg en sujetos CMV-seropositivos no es un artefacto de la técnica.

Una vez que validamos el ensayo del QF-CMV para identificar a este grupo de individuos discordantes, llevamos a cabo la segunda parte del proyecto: evaluar el impacto de la ausencia de IMC-CMV en donantes CMV-seropositivos sobre la reconstitución de la IMC-CMV y en la reactivación del CMV tras el trasplante de progenitores hematopoyéticos en receptores CMV-seropositivos. De los 81 pacientes evaluables, 54 tenían donantes CMV-seropositivos con QFpos (D+QFpos), 13 tuvieron donantes discordantes (D+QFneg) y 14 donantes CMV-seronegativos (D-). Los receptores con donantes D+QFneg tenían menor probabilidad de reconstitución de la IMC-CMV que los receptores con D+QFpos (Log-rank,  $p=0.001$ ) o con D- (Log-rank,  $p=0.023$ ). De los 10 receptores con donante D+QFneg evaluables al mes +6 post-TPH, el 60% seguían siendo QFneg a pesar de haber tenido reactivación de CMV. En el análisis ajustado por otras variables, tener un donante D+QFneg se asociaba con una menor probabilidad de reconstitución de la IMC-CMV en comparación con los donantes D+QFpos (RR ajustado, 0.18; IC 95%, 0.06-0.52;  $p=0.001$ ) o con donantes D- (RR ajustado, 0.17; IC 95%, 0.05-0.59;  $p=0.005$ ). Por tanto, se llegó a la conclusión de que los receptores alo-TPH de donantes discordantes D+QFneg tienen menor probabilidad de reconstitución estable de la IMC-CMV durante los 12 meses del periodo de seguimiento que los receptores de donantes D+QFpos o D-. Esta incapacidad para desarrollar una reconstitución estable de la IMC-CMV se mantiene incluso tras la reactivación del CMV.

# **INTRODUCCIÓN**

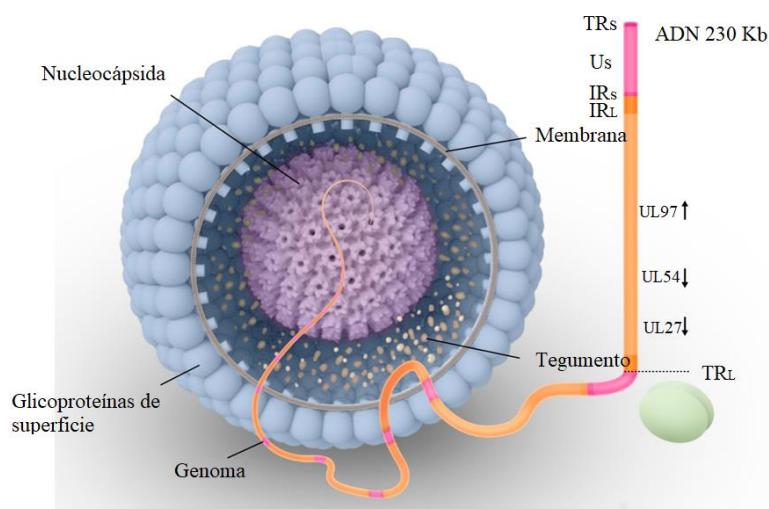


### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1 Estructura del citomegalovirus

El citomegalovirus (CMV) se encuadra taxonómicamente en el orden de los *Herpervirales*, familia *Herpesviridae*, subfamilia *Betaherpesvirinae* y género *Cytomegalovirus*. El CMV es uno de los patógenos de mayor tamaño capaz de infectar al ser humano y se caracteriza por presentar un ADN bicatenario lineal de unas 230 Kb (Figura 1), siendo el genoma más largo y complejo de los herpes. Este genoma está contenido en una nucleocápsida icosaédrica que se divide en dos regiones únicas denominadas “unique long” (UL) y “unique short” (US), cada una de las cuales está limitada por una secuencia repetida terminal, TRL y TRS, y por una secuencia repetida interna, IRL e IRS, respectivamente (1).

La nucleocápsida, que contiene el ADN, está formada por 162 capsómeros de unos 130 nm de diámetro, compuestos cada uno por dos unidades morfológicas distintas, 12 pentámeros y 150 hexámeros, dispuestos en forma de triple hélice (2,3).



**Figura 1. Representación de la estructura y componentes de un virión humano de CMV**  
(Adaptada de *El Chaer et al.*, 2016) (3).



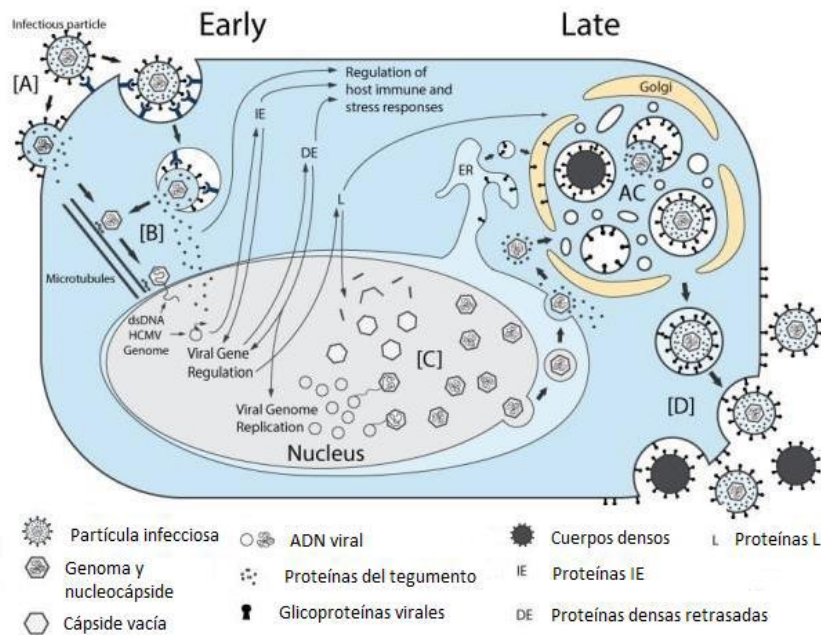
El tegumento constituye una superficie irregular de revestimiento formado principalmente por proteínas fosforiladas. Estas proteínas desempeñan papeles fundamentales en la entrada del virus en las células que infecta, en la expresión génica, en la evasión de la respuesta inmune, así como en la salida del virus de las células infectadas. La proteína pp65 se considera la proteína estructural más importante, principalmente por ser muy inmunogénica, constituyendo el principal antígeno diana de los linfocitos T CD8+ en la infección por CMV (4). Otras proteínas del tegumento con funciones importantes son las pUL47 y pUL48 que permiten a la cápsida viral, acceder al núcleo de la célula huésped mediante el sistema de microtúbulos celulares de la membrana nuclear.

La envoltura es una bicapa lipídica que contiene unas 19 glicoproteínas codificadas por el virus. Entre ellas están gB (UL55), gM (UL100), gN, gO (UL74) y otras muchas. Una de las más importantes es la gB (UL55) que constituye la principal diana de los anticuerpos. Además, estas glicoproteínas destacan también por participar en funciones tales como, el establecimiento de uniones glicoproteicas entre el virus y la célula hospedadora, lo que favorece la entrada de éste mediante fusión de membranas o endocitosis (5-7), provocando la infección de la célula y la posterior diseminación del virus (8).

### **3.2 Ciclo de vida del virus**

El ciclo de vida del CMV consta de una fase lítica y una fase de latencia. Durante la *fase lítica*, el virus penetra en las células (fibroblastos, macrófagos, células epiteliales y dendríticas, fundamentalmente) mediante fusión de membranas. En concreto, las partículas infecciosas entran en contacto con los receptores celulares gracias a las

glicoproteínas de la envuelta viral (gM y gB), dando lugar a la fusión de las membranas celulares. A continuación, se liberan la nucleocápsida y las proteínas del tegumento directamente en el citoplasma celular. Una vez en el citoplasma, la cápsida se desplaza hacia el núcleo, donde se produce la liberación del ADN viral (Figura 2) (9).



**Figura 2. Descripción general del ciclo de vida del CMV** (Adaptada de Jean Beltran et al., 2014) (9).

La expresión genómica se caracteriza por llevarse a cabo en una cascada de 3 fases. En primer lugar, se produce la expresión de los genes  $\alpha$  o Immediate Early (IE), que dan lugar a los primeros ARNm. Estos ARNm se traducen en las proteínas  $\alpha$  (también llamadas IE) que conducen al virus a la replicación lítica. Las proteínas IE regulan el ambiente de la célula hospedadora ya sea modulando factores involucrados en el control de la síntesis de ADN celular o alterando la respuesta inmune del huésped frente al virus favoreciendo con ello la segunda fase que sería la expresión de los genes virales tempranos Early Antigen (EA), implicados a su vez en la estimulación de la síntesis de

ADN, ARN y proteínas “Early” en la célula infectada. Después de la replicación del ADN tiene lugar la tercera fase de la cascada, la expresión de los genes virales tardíos “Late Antigen” (LA), la mayoría de los cuales darán lugar a proteínas y glicoproteínas estructurales (10). Los genes LA favorecen el inicio del ensamblaje de la cápsida en el núcleo, seguido de su salida al citoplasma gracias a la formación de un complejo que se fusiona con la membrana nuclear interna. Una vez en el citoplasma, la cápsida termina de formarse adquiriendo vesículas procedentes del retículo endoplasmático, aparato de Golgi y endosomas. Finalmente, estas vesículas se fusionarán con la membrana celular y se produce la liberación al espacio extracelular de los viriones (9).

Una vez que el sistema inmune es capaz de controlar la replicación del virus, éste entra en latencia. La *fase de latencia* del CMV puede definirse como el mantenimiento del genoma viral en ausencia de producción de viriones infecciosos, aunque mantiene la capacidad para reactivarse bajo determinadas condiciones. El virus se mantiene en latencia principalmente en las células precursoras mieloides CD34+ y monocitos CD14+, que se diferenciarán en macrófagos y células dendríticas (11). La fase de latencia va asociada a una respuesta inmune robusta por parte del hospedador (12).

### **3.3 Epidemiología, vías de transmisión y patogénesis**

La infección humana por CMV es extremadamente frecuente, afectando a la mayor parte de la población mundial. La prevalencia aumenta con la edad del individuo y puede variar, dependiendo de la localización geográfica y del nivel de desarrollo de cada país, desde un 60% en países desarrollados hasta un 90% en subdesarrollados (13,14).

La transmisión del CMV puede ocurrir de forma vertical u horizontal (15). La transmisión vertical es aquella que se da de madre CMV-seropositiva a hijo por vía transplacentaria. La transmisión horizontal es aquella que se produce por: 1) Contacto directo con fluidos corporales como saliva, orina, sangre u otras secreciones; 2) A través de transfusiones sanguíneas; 3) O transmisión por trasplante de órganos cuando éstos proceden de donantes CMV-seropositivos (tanto órgano sólido como trasplante de progenitores hematopoyéticos) (16,17).

La infección por CMV se detecta por la presencia de proteínas virales o ácidos nucleicos del virus en algún fluido corporal o muestra de tejido, aunque no se hayan mostrado síntomas relacionados. El desarrollo de la primoinfección varía dependiendo del estado inmunológico del individuo. De modo que, en personas sanas inmunocompetentes se suele cursar de manera asintomática o leve, debido a que poseen un sistema inmunológico funcional capaz de controlar y detener la replicación del virus (18). En la mayoría de estos casos, los síntomas son similares a un resfriado, con fiebre, malestar y dolor de cabeza. Mientras que, en individuos inmunocomprometidos, la infección puede llegar a ser mucho más grave (19).

Dentro de los individuos inmunosuprimidos, los pacientes trasplantados de progenitores hematopoyéticos representan un grupo especialmente vulnerable a la infección por CMV debido tanto a la enfermedad que sufren como a los tratamientos de quimio/radioterapia que se les administra. En este grupo de pacientes puede ocurrir tanto una primoinfección por CMV (en receptores CMV-seronegativos) como reactivaciones (en receptores CMV-seropositivos). En estos casos la infección puede dar lugar a complicaciones graves relacionadas con el propio trasplante, como la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) y finalmente el rechazo del órgano (20-22).

Durante la primoinfección, el CMV infecta a las *células epiteliales* y desde ahí, se disemina a otras células. Las células de la inmunidad innata expresan unos receptores, denominados *Toll Like Receptors (TLR)* que reconocen patrones moleculares del virus, teniendo como resultado la liberación de citoquinas antivirales y proinflamatorias. Otras células con un papel relevante en el control de la infección por CMV son las *células dendríticas*, las cuales participan en el procesamiento y presentación de los antígenos del CMV en su superficie asociados al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), lo que permite que se desarrolle la respuesta adaptativa. Las células presentadoras de antígenos (CPA) pueden actuar de dos formas: 1) Activando *los linfocitos T CD8+* con el CMH de clase I, lo que provoca la lisis de las células infectadas por CMV mediante citólisis mediada por la secreción de granzimas y perforinas o deteniendo la replicación del virus a través de la secreción de citoquinas como el interferón-gamma (IFNG) o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ); 2) A través de la presentación de los antígenos mediante el CMH de clase II que serán reconocidos por *los linfocitos T CD4+*, que por un lado activarán a *los linfocitos B* dando lugar a anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes CMV-específicos y por otro lado, inducirán la proliferación de células T CD8+ mediante la secreción de interleuquinas como la IL-2 (23).

### **3.4 Trasplante de progenitores hematopoyéticos**

#### **3.4.1 Aspectos generales**

El trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) es un procedimiento terapéutico ampliamente utilizado en la práctica clínica para el tratamiento de múltiples enfermedades hematológicas congénitas y adquiridas que afectan a la médula ósea

(24,25). Dicho procedimiento tiene como objetivo fundamental regenerar el tejido hematopoyético del paciente que por la propia enfermedad tiene una actividad anormal. La recuperación de la función hematológica e inmunológica tras el TPH se debe a la administración al paciente de progenitores hematopoyéticos sanos procedentes de un donante (trasplante alogénico, también llamado alo-TPH) o del propio paciente (trasplante autólogo) (26,27). Con el objetivo de eliminar las células anómalas (neoplásicas y/o malignas) y permitir que injerten los progenitores nuevos infundidos, en una fase previa al trasplante, se le administra al paciente altas dosis de quimioterapia y/o radioterapia. Dicho tratamiento recibe el nombre de *régimen de acondicionamiento*. Según su objetivo e intensidad, el régimen de acondicionamiento previo al trasplante puede ser de dos tipos (28):

- Mieloablatoivo: administración de altas dosis de quimioterapia provocando mayor citotoxicidad contra las células malignas, pero también con mayor toxicidad general. Se recomienda que se administre a pacientes con buen estado clínico basal.
- No mieloablatoivo (o intensidad reducida): este régimen, al ser menos agresivo, tiene menos capacidad de controlar la enfermedad, pero puede ser administrado a pacientes de edades avanzadas o a aquellos que muestren contraindicaciones al régimen mieloablatoivo.

### **3.4.2 Fuente de progenitores y tipos de trasplante según la identidad HLA**

Las células progenitoras pueden ser obtenidas: directamente de la médula ósea mediante punción; de sangre de cordón umbilical; o de la propia sangre periférica del donante, previa administración de tratamientos como el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). En la actualidad, la sangre periférica es la opción más utilizada,

fundamentalmente porque los factores estimulantes permiten la obtención de mayor número de progenitores hematopoyéticos (29,30). Por el contrario, el cordón umbilical es una fuente de progenitores cuyo uso clínico ha sufrido un gran descenso en los últimos años debido principalmente al poco volumen de sangre que se puede extraer en cada caso (31). En cuanto al tipo de donante empleado, los mejores resultados se han obtenido cuando se utilizan progenitores de un hermano con identidad total en el HLA (del inglés, *Human Leukocyte Antigen*) de clase I y clase II (trasplante HLA idéntico) (26). En el caso de que no sea posible esta opción, está la alternativa de un trasplante haploidéntico, en el que el donante comparte sólo uno de los haplotipos HLA con el paciente (32).

En los días posteriores a la infusión de los progenitores comienzan a surgir problemas, entre los que destacan las complicaciones infecciosas que coinciden con el complejo período de reconstitución del sistema inmune.

### **3.5 Reconstitución inmune tras el trasplante alogénico de progenitores**

La *reconstitución inmune* es un proceso lento, de expansión y generación de *novo* de células inmunes en un receptor a partir de un injerto sano (en el caso del trasplante alogénico el injerto procede de un donante). La recuperación de la función del sistema inmunológico es de suma importancia para superar con éxito el trasplante, hacer frente a posibles infecciones y evitar recaídas de la enfermedad (33,34).

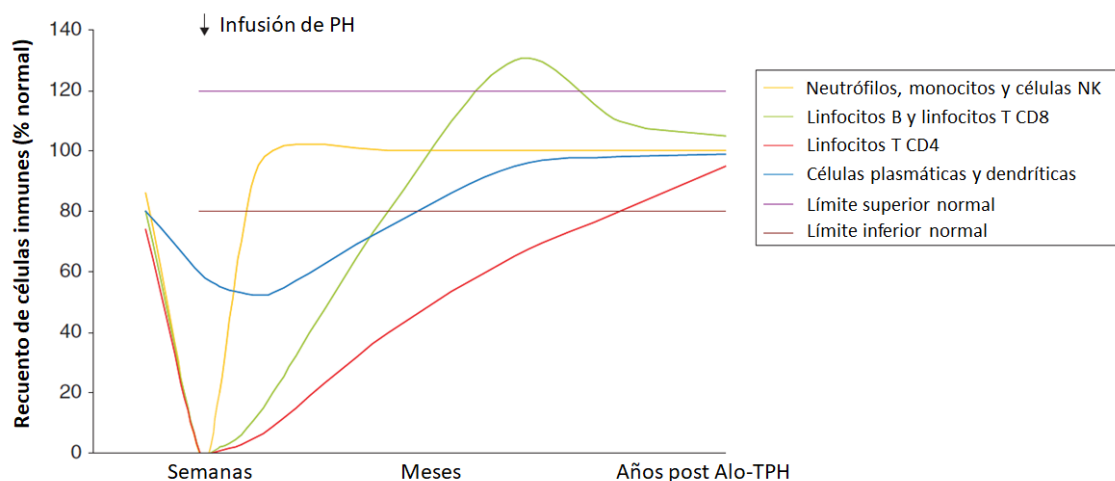
Existen varios factores que pueden influir en la reconstitución inmune post-TPH. Está descrito en numerosos estudios que la edad del paciente es uno de los factores más importantes (35,36). Otras variables como la fuente de progenitores hematopoyéticos, el régimen de acondicionamiento o el desarrollo de la EICH también pueden llegar a ser determinantes en el proceso de reconstitución inmune (37-39). De hecho, en cuanto a la

fuente de progenitores, hay evidencias de que la sangre periférica proporciona una reconstitución más temprana, de ahí que, en la actualidad sea la principal fuente usada en los alo-TPH (25).

### 3.5.1 Reconstitución global

Tras la infusión por vía intravenosa, los progenitores hematopoyéticos pasan al torrente sanguíneo y, terminan llegando a la médula ósea donde tiene lugar el prendimiento del injerto, proceso que suele durar entre 12 y 30 días dependiendo fundamentalmente de la fuente que se use, ya que como se ha mencionado anteriormente, está documentado que las poblaciones celulares tienden a reconstituir antes, si el injerto procede de sangre periférica que si lo hace de médula ósea o de cordón umbilical (40,41).

Tras el trasplante, el prendimiento de los monocitos es el primero en producirse, seguido rápidamente de granulocitos y células *Natural Killer* o NK (Figura 3) (42).



**Figura 3. Etapas de la reconstitución inmune después del TPH.** Recuento aproximado de las células inmunes expresado en porcentaje de recuentos normales (Adaptada de Storek, 2008) (42).



El recuento de monocitos se normaliza antes del primer mes post-trasplante (43). Los macrófagos son bastante resistentes a la quimio/radioterapia, por tanto, su número no baja sustancialmente. Esto hace que los macrófagos del receptor sean reemplazados gradualmente por los del donante durante varios meses después del trasplante (44). La reconstitución de los neutrófilos también es una de las primeras en producirse. Tarda unas 2 semanas si el injerto procede de sangre periférica, 3 semanas si es de médula ósea y hasta 4 semanas si es de cordón umbilical (45,46). Además, se ha relacionado el número de células CD34+ infundidas con el injerto con la recuperación cuantitativa de los neutrófilos (47,48). En cuanto a las células dendríticas, son detectables a las 2-3 semanas, aunque permanecen en niveles bajos durante los 3 primeros meses después del trasplante (49). Posteriormente, el recuento de células dendríticas mieloides (CD11+) tiende a normalizarse mientras que las plasmocitoides (CD123+) permanece bajo incluso un año después del trasplante (50).

En cuanto a la línea linfoide, el recuento de células NK en sangre parece recuperarse a las 3-4 semanas post-TPH, aunque hasta al menos 6 meses después se ha observado un desequilibrio entre el ratio de NK reguladoras (CD56<sup>high</sup>CD16<sup>low</sup>) y citotóxicas (CD56<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>) (51). Parece que durante este período post-trasplante, en el que la reconstitución de los linfocitos T no se ha producido por completo, suele haber mayor frecuencia de enfermedades debido a herpesvirus y es probable que las NK desempeñen un papel fundamental en la defensa contra ellos (52). Respecto a los linfocitos T, la concentración de linfocitos T CD8+ durante los 3 primeros meses post-TPH está por debajo de los niveles normales. Posteriormente, aumentan con rapidez y alcanzan valores normales o supranormales, un año después del trasplante. El rápido aumento podría ser debido a la expansión de células T CD8+ específicas para determinados herpesvirus presentes en el huésped (53-55). El recuento de linfocitos T

CD4+ es muy bajo durante los primeros meses. Después, aumentan lentamente hasta alcanzar los valores normales entre 1-5 años después del trasplante (37). El número de CD4+ semanas después del trasplante está significativamente relacionado con el número de células T CD4+ administradas con el injerto (56). Con relación a los linfocitos B, éstos muestran un número muy bajo, incluso indetectable durante los 2 primeros meses post-TPH (57). Posteriormente, van aumentando hasta alcanzar un nivel supranormal en un tiempo de 1-2 años, tras el cual, los niveles se normalizarán.

Por tanto, se puede decir que la reconstitución inmune post-TPH es un proceso lento y progresivo que puede tardar años en concluir.

### **3.5.2 Reconstitución de la inmunidad mediada por células frente a CMV**

Los linfocitos T CD4+ y CD8+ CMV-específicos desempeñan un papel fundamental en el control de la reactivación del CMV mediante la producción de diversas citoquinas como el IFNG, la IL-2 y el TNF- $\alpha$ , lo que contribuye a controlar la infección (58-61). Por tanto, una reconstitución rápida y eficiente de la inmunidad mediada por células frente a CMV (IMC-CMV) permite hacer frente a posibles reactivaciones del virus post-TPH (62,63). Sin embargo, hay factores que han demostrado retrasar la reconstitución de la IMC-CMV: el régimen de acondicionamiento, la serología CMV del donante, el uso de esteroides, la EICH, el trasplante de donantes no emparentados, la fuente de progenitores y el uso de profilaxis con ganciclovir (33,64-66).

En los pacientes TPH, el mayor riesgo de infección/reactivación por CMV ocurre dentro de los 100 primeros días post-TPH. En un estudio llevado a cabo por *Hakki et al.*, se asoció el bajo recuento de linfocitos T CD4+ y CD8+ en los 3 primeros meses después del trasplante con el retraso en el desarrollo de la IMC-CMV (65).

Numerosas publicaciones han demostrado que el porcentaje de las poblaciones celulares que constituyen la IMC-CMV y la reconstitución precoz de la misma protegen frente a las reactivaciones de CMV. Por ejemplo, hay evidencias de que una baja subpoblación de linfocitos T CD8+ CMV-específicos predispone a la infección por CMV, tanto precoz como tardía (67). Algo similar ocurre con los linfocitos T CD4+, ya que, un recuento bajo se asocia con la aparición de enfermedad tardía por CMV (> 100 días post-TPH) (68). Por el contrario, la reconstitución precoz de linfocitos T CD4+ CMV-específicos se asocia con una incidencia baja de infección por CMV (69).

### **3.6 Complicaciones asociadas a la infección por CMV en el alo-TPH**

Como se describe anteriormente, los pacientes trasplantados de progenitores constituyen uno de los principales grupos de riesgo a la hora de sufrir complicaciones infecciosas debido a los regímenes de acondicionamiento a los que son sometidos para poder recibir el trasplante y que suponen la aplasia medular del paciente (70,71), al posterior prendimiento del injerto y al lento proceso de reconstitución inmune.

Una de las principales complicaciones que surge es la infección por CMV, que es considerada una importante causa de morbilidad en estos pacientes (72). En los receptores del alo-TPH esta infección suele encuadrarse entre el día +30 y el día +100 post-TPH período en el cuál la reconstitución inmune de los linfocitos T CD4+ y CD8+ todavía están en valores mínimos (58,73-75). En los pacientes TPH, la infección por CMV puede causar alteraciones hepáticas, digestivas, afectación pulmonar o del sistema nervioso central siendo la neumonía la manifestación clínica más frecuente y con mayor tasa de mortalidad si no se trata a tiempo (68). En este contexto, se han descrito varios factores de riesgo asociados a la infección por CMV (76).

### 3.6.1 Factores de riesgo asociados a la infección por CMV en pacientes alo-TPH

La incidencia y severidad de la infección por CMV después del trasplante alogénico de progenitores, dependen de algunos factores de riesgo entre los que destacan:

- **Estado serológico frente a CMV de donante y receptor:** En los receptores de un TPH, el factor de riesgo más importante para la infección por CMV es la serología CMV de donante y receptor (68). Según la determinación serológica, los pacientes TPH se pueden clasificar como: de bajo riesgo (Donante CMV-seronegativo (D-)/Receptor CMV-seronegativo (R-), riesgo intermedio (D+/R-) y alto riesgo (D-/R+ y D+/R+) (77). Sin embargo, el papel de la serología CMV del donante en el caso de que el paciente sea CMV-seropositivo (R+) es controvertido, ya que, varios autores han señalado que tiene un papel importante en la evolución del trasplante, observándose diferencias entre los pacientes D-/R+ y D+/R+. En este sentido se ha publicado que los pacientes D-/R+ tienen mejor supervivencia, menor riesgo de recidiva y un descenso de la mortalidad relacionada con el trasplante (78). *Pietersma et al.* han descrito que en pacientes R+ la serología CMV del donante se asocia no sólo con la frecuencia de reactivación de CMV sino también con la magnitud de la reactivación viral. Así, los pacientes D+/R+ tienen mayor incidencia de reactivación de CMV que los D-/R+, debido a la reactivación de la cepa del donante. Por el contrario, los pacientes D-/R+ muestran mayor severidad en la reactivación del CMV (mayor carga viral y mayor duración de la replicación) que los D+/R+ debido a la ausencia de IMC-CMV transferida (79).
- **Regímenes de acondicionamiento:** La mayor incidencia de reactivación del CMV se relaciona con el acondicionamiento mieloablatoivo, ya que, la intensidad

de la quimioterapia y/o radioterapia es tan alta que hay una recuperación insuficiente de los linfocitos T CD8+ (80).

- **Grado de compatibilidad HLA entre donante y receptor:** Se ha relacionado un mayor riesgo de EICH aguda y mayor incidencia de reactivación del CMV en trasplantes haploidénticos que cuando existe identidad total HLA entre donante y receptor (81).
- **Dosis de inmunosupresión recibida:** Dosis altas de corticosteroides, tratamientos que deplecionan las células T como la globulina antitimocítica y el micofenolato de mofetilo (MFM), entre otros, se consideran fármacos de alto riesgo para la infección por CMV (82).
- **Otros factores** como la edad también se consideran de riesgo. La prevalencia de la infección por CMV aumenta con la edad (83,84), de modo que los pacientes de edades más avanzadas tienen más probabilidad de ser CMV-seropositivos.

### 3.6.2 Definiciones de infección y enfermedad por CMV en el TPH

A la hora de poder describir y manejar de manera uniforme las complicaciones clínicas de la infección por CMV en los pacientes TPH, en la *European Conference on Infections in Leukaemia* de 2017 (ECIL 7) se establecieron de forma consensuada las directrices para el tratamiento de la infección por CMV en pacientes con neoplasias hematológicas después de un TPH. Entre otros aspectos, se actualizaron varios conceptos relacionados con la infección y enfermedad por CMV (Tabla 1) (85,86).

**Tabla 1.** Conceptos relacionados con infección y enfermedad por CMV en el TPH

CONCEPTOS	DEFINICIONES
<b>Infección por CMV</b>	Se define como el aislamiento del virus, la detección de proteínas virales (antígenos) o la detección de ácido nucleico de CMV en cualquier fluido corporal o muestra de tejido
<b>Replicación de CMV</b>	Este término se puede utilizar para evidenciar la multiplicación del virus. A veces se utiliza este término en lugar de infección por CMV
<b>Primoinfección</b>	La infección primaria de CMV es definida como la primera detección de infección por CMV en un paciente previamente CMV-seronegativo
<b>Infección recurrente</b>	Se define como una nueva infección por CMV en un paciente que previamente ha tenido una infección por CMV documentada y a quien no se le ha detectado el virus durante un intervalo de al menos 4 semanas de vigilancia activa
<b>Reinfección</b>	Detección de infección por una cepa de CMV diferente a la que causó la infección inicial
<b>Reactivación de CMV</b>	Situación en la que dos cepas de CMV (la causante de la infección previa y la de la actual) son indistinguibles tanto por secuenciación de regiones específicas del genoma como utilizando técnicas moleculares de polimorfismos genéticos. En la clínica habitual se utilizan indistintamente los términos <i>reactivación</i> e <i>infección por CMV</i> para referirse a un episodio de infección por CMV
<b>Enfermedad por CMV</b>	Definida como síntomas y signos de daño orgánico y detección de CMV en el tejido afectado. Dependiendo del tejido dañado, existen determinadas peculiaridades para la detección del virus. En la ECIL 7, se estableció una nueva clasificación de enfermedad <i>probada</i> , <i>probable</i> y <i>posible</i> para todas las manifestaciones de enfermedad. Esta nueva categorización es de gran utilidad en manifestaciones pulmonares y gastrointestinales y supone un primer paso en el reconocimiento de las técnicas moleculares basadas en PCR-RT como técnicas válidas en el diagnóstico de enfermedad orgánica por CMV

### 3.7 Estrategias de prevención de la infección por CMV en pacientes alo-TPH

La primoinfección y la reactivación del CMV en receptores TPH se ha asociado con un aumento de la mortalidad, por lo que, prevenir la replicación del virus en estos pacientes es fundamental para mejorar su supervivencia (16,87).

En primer lugar, y siempre que sea posible, la prevención debería comenzar, por la elección del donante. Como ya se ha comentado anteriormente, la serología CMV del donante y del receptor constituye uno de los principales factores de riesgo en el contexto del alo-TPH. De modo que, en el caso de los receptores CMV-seronegativos se recomienda escoger un donante también CMV-seronegativo. Mientras que para los receptores CMV-seropositivos es preferible, cuando sea posible, escoger un donante que sea CMV-seropositivo (88,89).

En 2017, durante la ECIL 7 se actualizó el sistema de clasificación de la *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (ESCMID) para el tratamiento de la infección por CMV en pacientes TPH. La finalidad de este sistema es alcanzar un consenso para la optimización del manejo de la infección por CMV en estos pacientes (86). Este sistema de clasificación se basa en dos aspectos, por un lado, el *grado de recomendación* que va desde la A (muy recomendado) hasta la D (en contra de su uso) y, además, se utiliza el *nivel de evidencia*, que va desde el nivel I hasta el nivel III, para clasificar las recomendaciones en base a los ensayos clínicos, opiniones de expertos, etc.

Por tanto, se ha utilizado este sistema para clasificar los tratamientos antivirales recomendados en las dos estrategias terapéuticas utilizadas para la prevención de la infección o enfermedad por CMV en pacientes TPH: la profilaxis universal y la terapia anticipada.

### **3.7.1 Profilaxis universal**

La profilaxis tiene como objetivo reducir la incidencia de infección/reactivación y enfermedad por CMV post-TPH mediante la administración de fármacos antivirales en los pacientes en riesgo. Se recomienda su uso durante los primeros 100 días post-TPH, momento en el que la reconstitución de la inmunidad celular comienza a ser consistente.

El fármaco más importante para la profilaxis frente al CMV según el nivel de recomendación de la ESCMID es el letermovir que, además es uno de los fármacos antivirales más novedosos. Actúa inhibiendo la subunidad pUL56 de la terminasa viral del CMV. Se ha observado que consigue disminuir la tasa de infección/reactivación en los 100 primeros días post-TPH sin efectos tóxicos destacables (90). Por tanto, una de las principales recomendaciones en el alo-TPH es la profilaxis con letermovir para todos los pacientes CMV-seropositivos hasta el día +100 (grado de recomendación AI) (86,90).

Otros fármacos utilizados son el valaciclovir y el aciclovir a altas dosis. El valaciclovir se metaboliza a aciclovir tras la administración vía oral presentando una biodisponibilidad superior a la del propio aciclovir (grado de recomendación BI y CI, respectivamente) (91,92). En la actualidad, antivirales como el ganciclovir (CI) y el foscarnet (DII) son poco recomendados en la profilaxis frente al CMV para los pacientes alo-TPH debido a su toxicidad (93,94).

El mayor inconveniente de la profilaxis universal es que se aplica a todos los pacientes con riesgo de infección/reactivación por CMV lo que supone que algunos de estos pacientes recibirán medicamentos antivirales innecesariamente, exponiéndolos a efectos secundarios. De modo que, la exposición prolongada a estos fármacos puede provocar un aumento de la resistencia a los antivirales, toxicidad y predisposición a la enfermedad tardía por CMV (95,96).



### **3.7.2 Terapia anticipada**

La terapia anticipada es la estrategia terapéutica anti-CMV más utilizada en la actualidad en el alo-TPH (97). Su objetivo es disminuir la incidencia de enfermedad por CMV mediante la administración de tratamiento antiviral cuando los pacientes presentan infección/reactivación del virus, con cargas virales por encima de un punto de corte previamente establecido, permitiendo iniciar el tratamiento antes de que se desarrolle la enfermedad por CMV. El tratamiento se prolonga hasta que el número de copias del virus en plasma sea muy bajo o indetectable (medida por PCR cuantitativa en tiempo real). Para ello, se realiza una monitorización de la carga viral de al menos una vez por semana durante los 3 primeros meses post-trasplante y cada 15 días hasta los 6 meses post-trasplante a todos los pacientes que reciben un alo-TPH. Sin embargo, la frecuencia de la monitorización viral puede cambiar dependiendo de las complicaciones que surjan y según el criterio médico.

Hay pacientes considerados de riesgo medio o alto de infección o enfermedad por CMV en los que se inicia la terapia anticipada porque existe sospecha clínica de enfermedad por CMV a pesar de que la carga viral sea indetectable.

Las ventajas más destacadas de la terapia anticipada son: menor incidencia de enfermedad tardía por CMV, menor toxicidad farmacológica y menor coste, ya que, se aplica durante periodos más definidos del post-trasplante (98,99). Como inconveniente, se puede mencionar la falta de consenso a la hora de establecer la carga viral a partir de la cuál iniciar el tratamiento. Establecer este umbral de actuación serviría para armonizar la forma de proceder frente a casos clínicos similares en diferentes hospitales.

### 3.7.3 Fármacos empleados en la infección por CMV en el contexto del alo-TPH

Según la guía para el manejo de la infección por CMV en pacientes trasplantados de progenitores, consensuada y actualizada en la ECIL 7, existen varios fármacos que se pueden utilizar durante la infección o enfermedad por CMV. En la Tabla 2 se ofrecen un resumen del mecanismo de acción de los antivirales más usados (100-103).

**Tabla 2.** Mecanismo de acción de los principales fármacos para la infección por CMV

FÁRMACOS	Mecanismos de acción	Inconvenientes
<b>Ganciclovir</b>	Terminador de la cadena de ADN en la replicación viral tras la fosforilación por pUL97	Mielotoxicidad
<b>Valganciclovir</b>	Éster del ganciclovir	Mielotoxicidad
<b>Aciclovir</b>	Interfiere con la ADN polimerasa viral inhibiendo la replicación viral	Toxicidad gastrointestinal
<b>Valaciclovir</b>	Éster del aciclovir	Toxicidad gastrointestinal
<b>Foscarnet</b>	Inhibición directa de la ADN polimerasa viral	Alta nefrotoxicidad
<b>Cidofovir</b>	Inhibición directa de la ADN polimerasa viral	Alta nefrotoxicidad
<b>Brincidofovir</b>	Derivado lipídico del Cidofovir	Toxicidad gastrointestinal
<b>Maribavir</b>	Inhibidor de la quinasa pUL97	Baja efectividad
<b>Letemovir</b>	Efectos sobre la subunidad pUL56 de la terminasa viral	Sin efectos tóxicos destacables

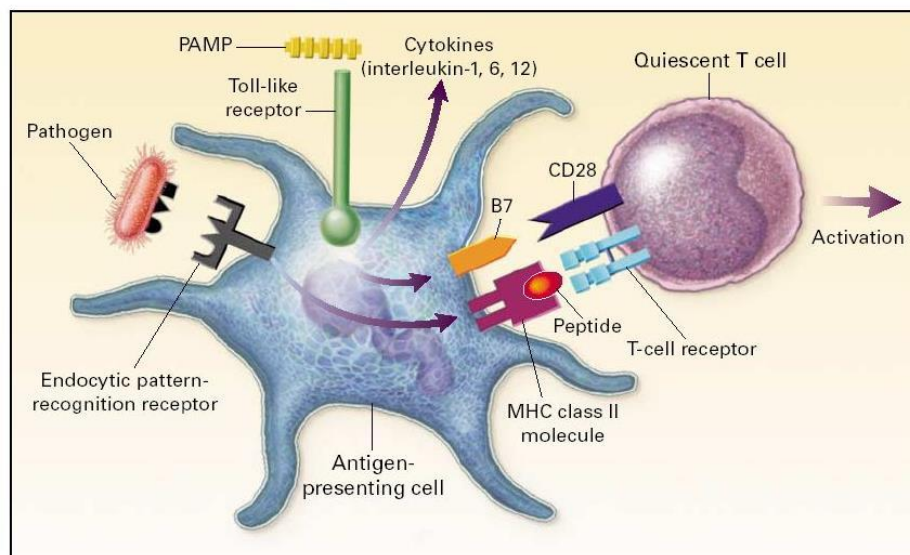
La elección de un fármaco u otro dependerá de factores relacionados con el estado basal del paciente: hemograma, función renal, comorbilidades, etc. La duración del tratamiento dependerá del tiempo que tarde el paciente en resolver la infección. En los pacientes TPH se intenta ajustar la duración y la dosis para minimizar/evitar efectos secundarios.

### 3.8 Control inmunológico de la infección por CMV

El control inmunológico de la infección por CMV es un proceso complejo que engloba tanto a la inmunidad innata como a la adaptativa.

#### 3.8.1 Inmunidad innata

La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa contra el CMV y es crucial para impulsar una respuesta inmune adquirida eficiente. Las células de la inmunidad innata expresan unos receptores, llamados *TLR* que reconocen los llamados *PAMP* (del inglés *pathogen-associated molecular patterns*) o patrones moleculares asociados a patógenos en los microorganismos (Figura 4) (104,105). El CMV activa la respuesta innata a través del TLR2, y se ha observado que algunos polimorfismos en este receptor se asocian a un mayor riesgo de infección en individuos trasplantados (106).



**Figura 4. Receptores involucrados en la interacción de la inmunidad innata y adaptativa.**

Reconocimiento del patrón molecular asociado a patógenos por los receptores Toll-like receptors, que generan señales que activan la respuesta inmune adaptativa (Wilkinson *et al.*, 2008) (104).

Las *células NK* ejercen una función esencial en la respuesta innata contra el CMV, debido a su actividad citotóxica y reguladora (104,107). Las *células dendríticas* también desempeñan una misión importante en el control de la infección por CMV, fundamentalmente como células presentadoras de antígenos, favoreciendo la activación de los *linfocitos T*. También cabe destacar, el papel de los *macrófagos* en la fagocitosis de las células infectadas por el virus (108).

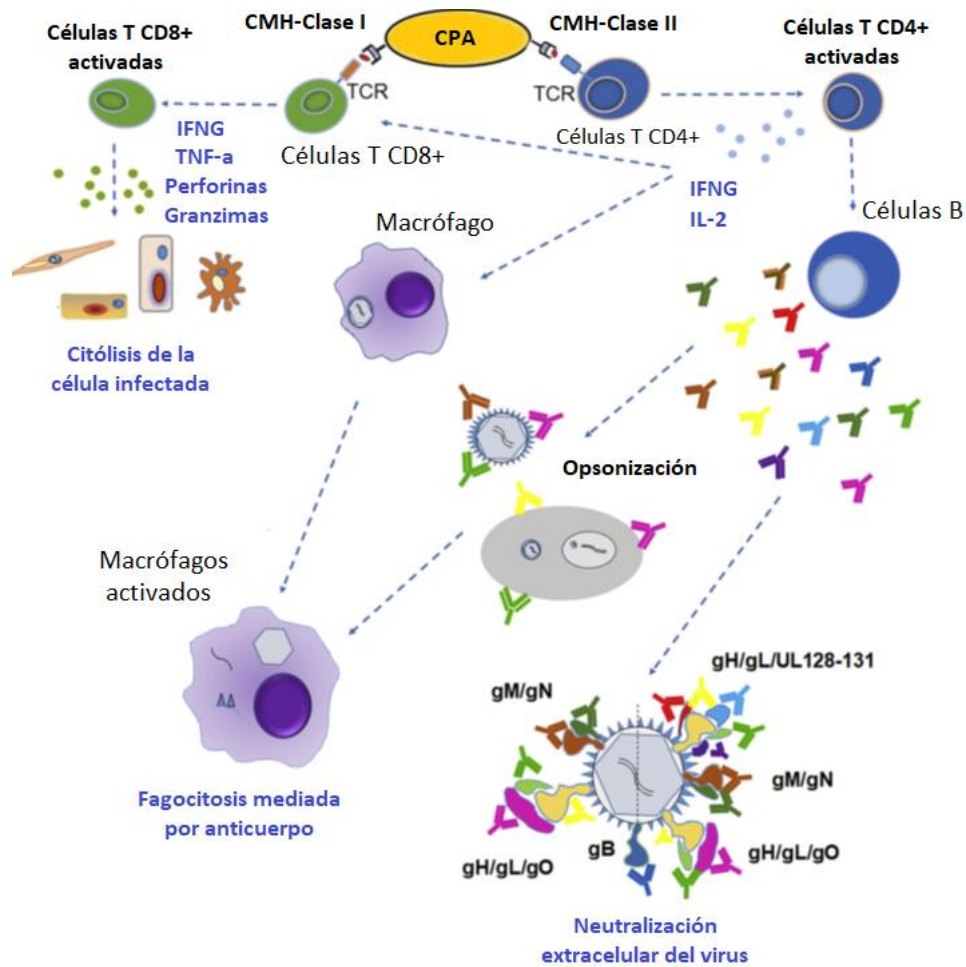
### **3.8.2 Inmunidad adaptativa**

La inmunidad adaptativa tiene un papel fundamental en el control de la infección por CMV, y tanto la inmunidad humoral (inmunoglobulinas) como celular (linfocitos T) intervienen en dicho control.

#### **A. INMUNIDAD HUMORAL**

La respuesta humoral, mediante la activación de los linfocitos B CMV-específicos, se encarga de la producción de anticuerpos neutralizantes que se dirigen, contra glicoproteínas de la envoltura, gB y gH del virus o contra proteínas del tegumento como pp65, lo que proporciona protección parcial frente a la infección del virus, limitando la gravedad de la primoinfección (109). También puede ocurrir la opsonización, por la cual el anticuerpo se une al antígeno viral, favoreciendo la fagocitosis por parte de los macrófagos (Figura 5) (110).

Tras la primoinfección, las inmunoglobulinas IgM e IgA van desapareciendo (vida media de 2-12 meses) mientras que las IgG perduran toda la vida. Por este motivo, el análisis serológico de las IgG anti-CMV es utilizado en clínica para determinar si un individuo está inmunizado o no frente al virus.



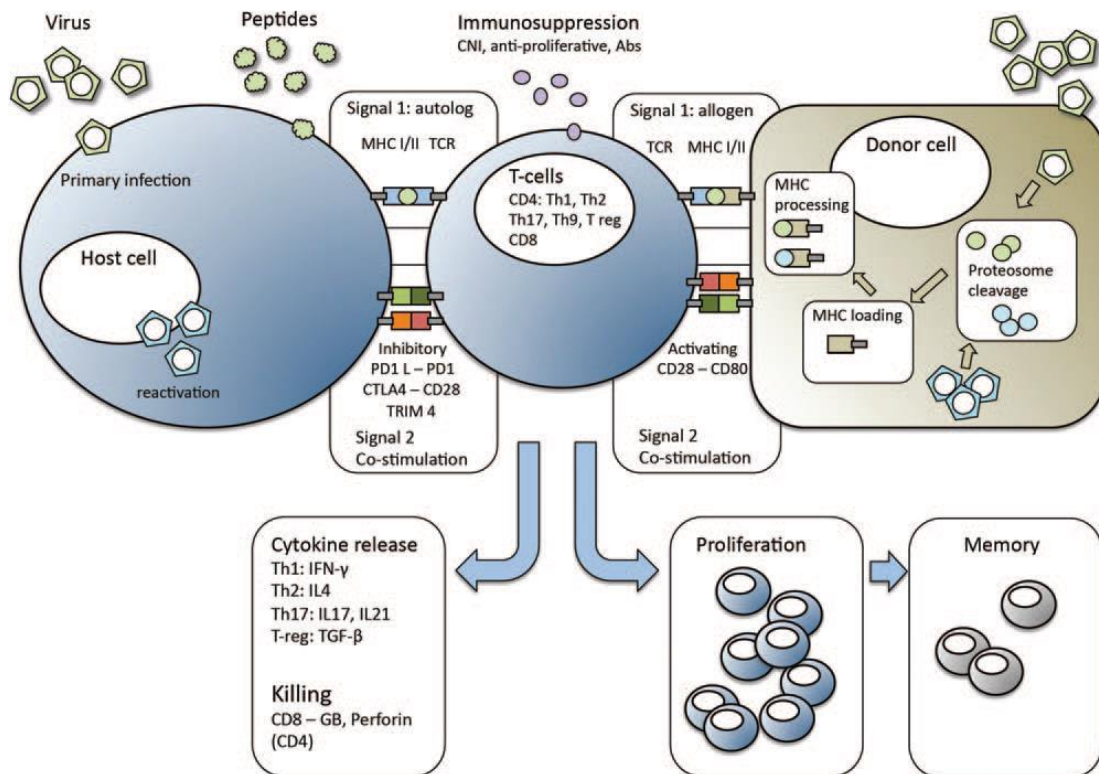
**Figura 5. El reconocimiento de las proteínas del CMV durante la infección primaria desencadena la activación y expansión de células T CMV-específicas.** Las células presentadoras de antígenos (CPA) procesan y muestran los antígenos de CMV en el complejo mayor de histocompatibilidad clase I, activando las células T CD8+ que secretan IFNG o TNF- $\alpha$  induciendo la supresión de la replicación intracelular del virus, o secretando granzimas y perforinas que inducen la lisis de células infectadas por el virus (Adaptada de *Sandonís et al., 2020*) (110).

## B. INMUNIDAD CELULAR

La inmunidad celular específica frente a CMV desempeña una función muy importante en el control de la infección del virus. De hecho, son los pacientes inmunocomprometidos, con una respuesta celular deficiente, los que sufren con más

frecuencia repeticiones recurrentes de CMV o enfermedad por CMV, lo que pone de manifiesto la importancia de la inmunidad celular (111-116).

Tanto los linfocitos T CD8+ como los CD4+ CMV-específicos juegan un papel fundamental en la eliminación del virus (117,118). Los linfocitos T CD8+ o linfocitos citotóxicos, son los encargados de lisar las células infectadas por el CMV, mediante la producción de citoquinas entre las que destacan la IL-2, IFNG y TNF- $\alpha$  y también produciendo moléculas efectoras como las granzimas y perforinas. Las perforinas se unen a la membrana plasmática de las células infectadas provocando la muerte por lisis osmótica. Las granzimas son proteasas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas de las células infectadas. Los CD8+ son capaces de reconocer una gran variedad de antígenos del CMV, desde las proteínas del virus que se expresan de forma temprana hasta las más tardías, aunque sus principales dianas son las proteínas IE-1 y pp65. Los linfocitos T CD4+ también juegan un papel crucial en la defensa contra la infección por CMV teniendo principalmente una función reguladora a través de la producción de citoquinas (Figura 6) (114). Se subdividen en dos grupos con una función diferente: 1) los CD4+ (Th1) se encargan de ayudar a los T CD8+ a combatir la infección por CMV mediante la producción de citoquinas; 2) los CD4+ (Th2) interactúan con los linfocitos B (inmunidad humoral) y producen IL-4, IL-6 e IL-10. Hay evidencias de fuertes respuestas proliferativas y de producción de citoquinas por parte de las células T CD4+ al reconocer proteínas del CMV como la pp65, gB y gH. (115).



**Figura 6. Interacción entre una célula infectada por CMV o presentadora de antígenos y el linfocito T CMV-específico en un individuo trasplantado.** Los péptidos virales son presentados por el CMH I o II y reconocidos por los linfocitos T CMV-específicos (Señal 1). La Señal 2 procede de la unión de moléculas co-estimuladoras con sus ligandos (Egli *et al.*, 2012) (114).

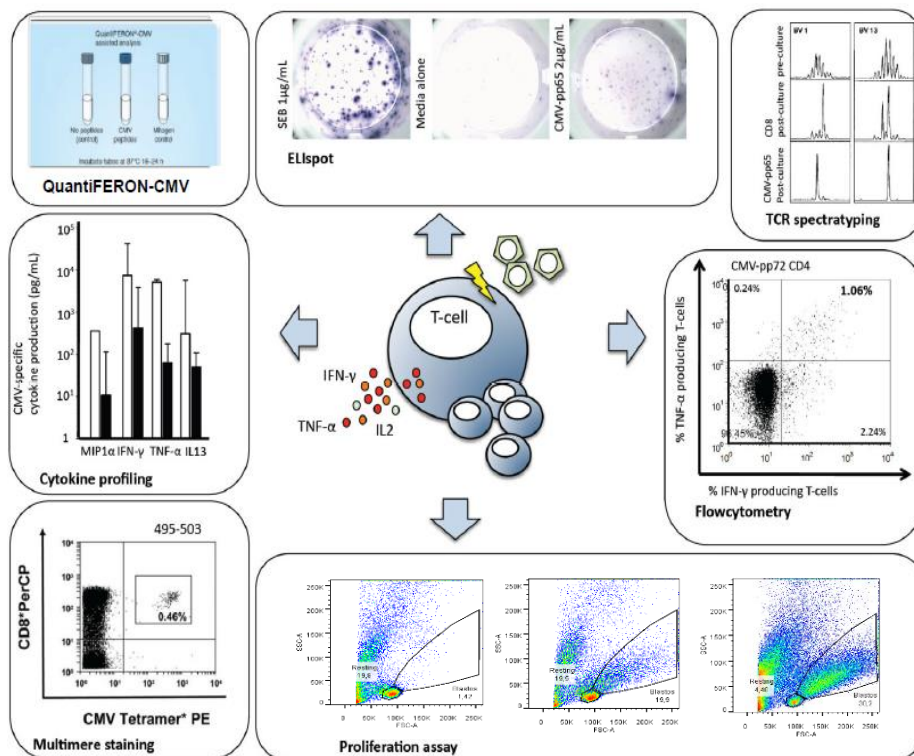
### 3.8.3 Principales técnicas de monitorización de la IMC-CMV

A nivel clínico, la determinación serológica (niveles de IgG anti-CMV) es la técnica más utilizada para saber si un individuo está inmunizado frente al CMV. La serología se considera un marcador subrogado de la inmunidad celular, por lo que, a los individuos con IgG anti-CMV (CMV-seropositivos) se les considera que están inmunizados a pesar de que, en muchos casos, no se analiza la respuesta celular.

La relevancia de la IMC-CMV en el control de la infección por CMV ha llevado a la necesidad de monitorizarla en el paciente trasplantado (pre y post-trasplante) dando lugar a diferentes técnicas que analizan la IMC-CMV (Figura 7) (114). Estas técnicas

proporcionan información adicional a la determinación de la IgG anti-CMV permitiendo identificar con más exactitud a los pacientes con mayor riesgo de replicación. Las técnicas se pueden dividir en 3 bloques:

- 1) Técnicas que analizan la funcionalidad de los linfocitos T mediante la producción de citoquinas: tinción intracelular (ICS), QuantiFERON-CMV (QF-CMV) y ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISpot).
- 2) Técnicas que permiten cuantificar los linfocitos T CMV-específicos como, por ejemplo, la técnica de tinción con multímeros HLA.
- 3) Técnicas que miden la capacidad proliferativa de los linfocitos T: técnica FASCIA.



**Figura 7. Técnicas de monitorización de los linfocitos T CMV-específicos.** Los métodos actuales para determinar la funcionalidad y cuantificación incluyen la tinción intracelular, el QuantiFERON-CMV, el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima, la tinción con multímeros y la técnica FASCIA (Adaptada de *Egli et al., 2012*) (114).

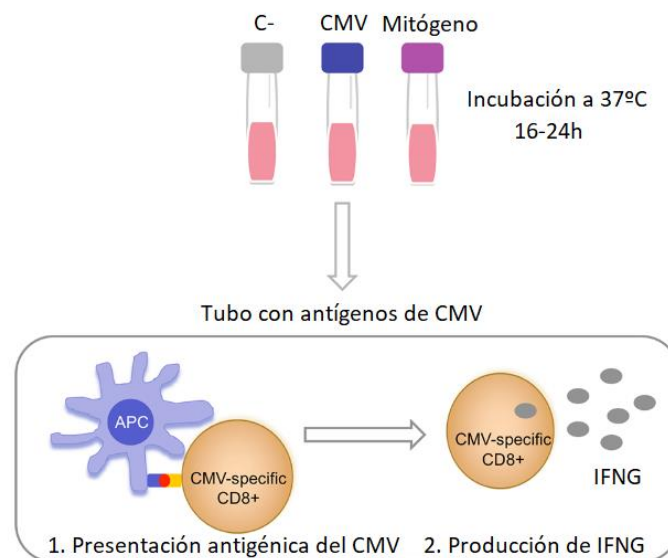


### A. Tinción intracelular de citoquinas

La tinción intracelular de citoquinas analizadas a través de citometría de flujo se basa en la detección inmunofenotípica de marcadores extracelulares de superficie (CD4, CD8, CD27, CD28, etc) y de citoquinas intracelulares (IL-2, IFNG, TNF- $\alpha$ ) secretadas tras la estimulación antigénica *in vitro* con péptidos virales. Este método ofrece una amplia información funcional de la IMC-CMV, ya que, permite conocer el estado de diferenciación de los linfocitos T.

### B. Técnica QuantiFERON-CMV

El QuantiFERON-CMV permite cuantificar el nivel de IFNG liberado por los linfocitos T CD8+ frente a CMV, al ser estimulados con 22 péptidos del virus (Figura 8) (119). Los péptidos tienen un tamaño determinado (9 aminoácidos) para que se unan específicamente a las moléculas de HLA de clase I y estimulen a los linfocitos T CD8+.



**Figura 8. Representación esquemática del ensayo del QuantiFERON-CMV.** En el tubo de antígenos del CMV, las células T CD8+ CMV-específicas del paciente que han estado expuestas previamente al virus reconocen a los antígenos de éste y responden secretando IFNG (Adaptada de Castón *et al.*, 2016) (119).

Son tres los posibles resultados que se pueden obtener: *positivo*, *negativo* e *indeterminado*. Un resultado es “positivo” (QFpos) cuando la respuesta en el tubo del CMV menos la del control negativo es  $\geq 0.2$  UI/mL de IFNG. Se consideró que los individuos con un resultado “positivo” tenían IMC-CMV. El resultado es “negativo” (QFneg) cuando dicha respuesta es  $< 0.2$  UI/mL. Por último, el resultado se considera “indeterminado” (QFind) cuando la respuesta en el tubo del CMV menos la del control negativo da un nivel de IFNG  $< 0.2$  UI/mL y el nivel de IFNG en el tubo del mitógeno menos el del control negativo es  $< 0.5$  UI/mL. Este resultado puede darse en situaciones determinadas como, por ejemplo: concentración de linfocitos insuficiente, llenados/mezclados incorrectos del tubo de mitógeno o incapacidad de los linfocitos del paciente para producir IFNG.

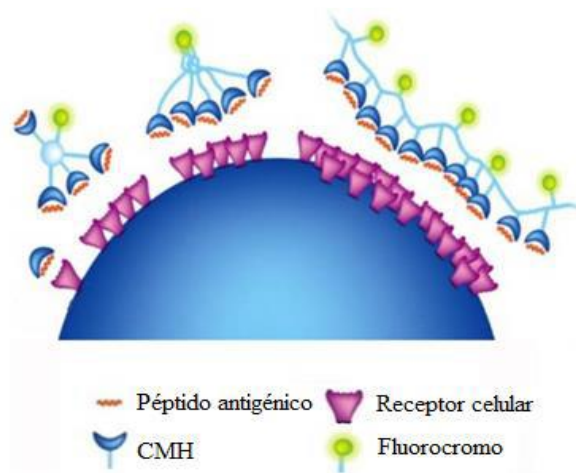
#### C. Ensayo ELISpot

El ELISpot (del inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay*) es un ensayo funcional de inmunoabsorción ligado a enzima que cuantifica los linfocitos T CD4+ y CD8+ secretores de IFNG en respuesta a la estimulación, con péptidos de CMV, de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, del inglés, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*). Esta cuantificación se realiza mediante el recuento de colonias formadoras de *spot* (SFC, del inglés, *Spot Forming Colonies*) con un lector automático y un software de análisis de imágenes.

#### D. Multímeros HLA

Los multímeros HLA son moléculas de HLA combinadas con péptidos de CMV que se unen específicamente al receptor TCR de los linfocitos T lo que permite

cuantificarlos. Dentro de los multímeros se encuentran los tetrámeros, pentámeros y más recientemente los dextrámeros. Estos últimos están formados por una cadena principal de dextrano que lleva un número determinado de HLA de clase I combinados con péptidos de CMV (Figura 9). Además, están unidos covalentemente a fluorocromos lo que permite identificarlos y cuantificarlos mediante citometría de flujo.



**Figura 9.** Imagen representativa de la estructura de un dextrámero y el mecanismo de unión al linfocito T (imagen cortesía de Immudex).

E. Técnica FASCIA (del inglés, *Flow-cytometric Assay of Specific Cell-mediated Immune response in Activated whole blood*)

La técnica FASCIA analiza la respuesta de los linfocitos T midiendo la capacidad proliferativa de los mismos al ser estimulados con un lisado de CMV y la formación de blastos (120). El lisado viral incluye proteínas implicadas en todas las fases del ciclo de replicación del virus, tempranas y tardías, además de proteínas nucleares, citoplasmáticas, estructurales y no estructurales. Esta técnica permite, además, medir en el sobrenadante el nivel de citoquinas secretadas por los linfocitos.

**Tabla 3.** Características de las técnicas de monitorización de la IMC-CMV

<b>TÉCNICAS DE MONITORIZACIÓN</b>					
<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>ICS</b>	<b>QF-CMV</b>	<b>ELISpot</b>	<b>Multímeros HLA</b>	<b>FASCIA</b>
<b>Análisis</b>	Funcional	Funcional	Funcional	Cuantificación	Funcional y cuantificación
<b>Muestra (mL)</b>	Sangre entera o PBMCs (1-2 mL)	Sangre entera (3-4 mL)	PBMCs (10 mL)	PBMCs (0.5-1 mL)	Sangre entera (1 mL)
<b>Duración (h)</b>	8-24	24	48	2-3	144-168
<b>Antígenos</b>	Péptido individual/ Lisado viral	Combinación de péptidos (pp65/gB/IE-1/pp50)	Péptido individual/ Lisado viral	Péptido individual (pp65, IE-1, pp50)	Lisado viral
<b>Ventajas</b>	Diferencia entre CD4+ y CD8+	Ejecución estandarizada y sencilla	Alta sensibilidad	Resultados inmediatos	Análisis funcional y cuantitativo
	Caracterización cuali y cuantitativa	Valores de corte conocidos	Alto rendimiento	Alta sensibilidad	Poca sangre
<b>Inconvenientes</b>	Requiere citómetro de flujo	Limitación en HLA poco frecuentes	Requiere lector ELISpot	Requiere citómetro de flujo	Lentitud en los resultados
	No estandarizado	Sólo detecta IFNG de células T CD8+	Valores de corte sin definir	No estandarizado	No estandarizado

### 3.8.4 Importancia de la monitorización de la IMC-CMV en pacientes alo-TPH

Numerosas publicaciones científicas ponen de manifiesto la importancia de la monitorización de la respuesta inmune frente al CMV tanto en el contexto del trasplante de órgano sólido como en el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. Como ya se ha comentado, los linfocitos T CD8+ CMV-específicos son esenciales en el control de la infección por CMV. De hecho, esta subpoblación linfocitaria es la principal

responsable de desarrollar una respuesta inmune protectora en la mayoría de los receptores de un alo-TPH frente a los antígenos pp65 e IE-1 de CMV. No menos importante, es la población de linfocitos T CD4+, crucial en la expansión de los T CD8+ funcionales (121).

El número de linfocitos T CD8+ CMV-específicos que producen IFNG parece constituir un marcador fiable de protección frente al virus (86). Algunos estudios clínicos prospectivos han explorado esta hipótesis, además de profundizar en el tema de la definición de los puntos de corte de la IMC-CMV con el objetivo de prevenir la infección. Todos estos trabajos concluyen destacando la importancia de implementar la monitorización de la IMC-CMV en pacientes TPH con riesgo de infección.

En el trabajo *El Haddad et al.* hipotetizaron con la idea de utilizar el ELISpot para medir los niveles de IFNG y así predecir el riesgo de reactivación de CMV de bajo nivel en pacientes TPH. La reactivación de bajo nivel se definió como una carga viral < 1000 UI/mL o < 500 UI/mL (en pacientes con EICH o con corticoides en el momento de la evaluación) y que no precisaron terapia anti-CMV. Mientras que la progresión de la infección por CMV clínicamente significativa fue definida como una carga viral > 1000 UI/mL (en pacientes que recibieron alo-TPH de donante emparentado o trasplante autólogo) o > 500 UI/mL (en pacientes con alo-TPH de donante no emparentado y que iniciaron el tratamiento antiviral). Los investigadores observaron que la progresión de la infección ocurrió en el 56% (31/55) de los pacientes alo-TPH y que 29/31 de ellos tenían baja IMC-CMV. Además, los pacientes con baja IMC-CMV tenían 8.3 veces más probabilidad de experimentar progresión de la infección que los que tenían una IMC-CMV alta ( $p < 0.001$ ). De modo que concluyeron que había una fuerte asociación entre la baja IMC-CMV y la progresión de la infección por CMV en pacientes TPH y que era necesaria la implementación de una monitorización seriada de la IMC-CMV durante el

período post-TPH lo que permitiría identificar a los pacientes de alto riesgo de infección por CMV (122).

En el estudio de *Yong et al.* se monitorizó la IMC-CMV en 94 pacientes TPH tomando datos basales y en el mes +3, +6, +9 y +12 post-TPH usando el QF-CMV, el ELISpot y la ICS. A los 3 meses post-TPH, los pacientes que desarrollaron enfermedad por CMV (n=8) tenían una producción significativamente menor de IFNG por parte de los linfocitos T CD8+, medida con el QF-CMV, que los pacientes que sólo tenían una reactivación de CMV sin haber desarrollado enfermedad (n=26) y que los pacientes con algún “blip” de carga viral (n=25) (p=0.0008). Estos resultados fueron muy similares a los obtenidos con el ensayo ELISpot. Además, otro de los resultados más relevantes obtenidos en este estudio fue que los pacientes que experimentaron reactivación del CMV mostraban una proporción reducida de linfocitos T CD4+ y CD8+ polifuncionales (IFNG+/TNF $\alpha$ +) comparados con los pacientes sin reactivación. Finalmente, este estudio también concluye poniendo de manifiesto la importancia de la monitorización y cuantificación de la IMC-CMV después del TPH (123).

En línea con lo descrito anteriormente, las dos guías más actuales sobre el manejo de la infección por CMV en pacientes trasplantados de progenitores hematopoyéticos defienden la monitorización de la IMC-CMV durante la reconstitución inmune tras el TPH, ya que, según explican el análisis de la población de linfocitos T CMV-específicos productores de IFNG proporciona información útil a nivel clínico para el control y manejo de la infección y aportaría información adicional a los resultados periódicos de carga viral del paciente, permitiendo identificar a los pacientes de alto riesgo. Además, permitiría individualizar la terapia anticipada e identificar otras complicaciones asociadas a la infección (86,124).

### **3.9 Discordancia inmune humoral/celular frente al CMV**

A pesar de la relevancia de la respuesta de los linfocitos T en el control de la infección por CMV, desde un punto de vista clínico, la inmunidad celular frente al virus siempre ha estado en un segundo plano debido fundamentalmente a la laboriosidad de las técnicas existentes para su determinación y a la dificultad para su automatización. Por este motivo, ha sido el estudio serológico frente a CMV (presencia de IgG anti-CMV) el que normalmente se ha llevado a cabo en los hospitales para identificar a los pacientes en riesgo de infección. La razón es simple, el análisis de los niveles de IgG anti-CMV se realiza de forma automática, sencilla y rápida. Como la serología se considera un marcador subrogado de la inmunidad celular, a los individuos con IgG frente a CMV (CMV-seropositivos) se les considera que están inmunizados, a pesar de que no se analiza la IMC-CMV.

Desde hace varios años nuestro grupo ha desarrollado proyectos de investigación centrados en evaluar la utilidad clínica de la monitorización de la IMC-CMV en pacientes trasplantados de órgano sólido. El objetivo era determinar si una combinación de determinación serológica (respuesta humoral) y celular sería más fiable para identificar a los pacientes con mayor riesgo de sufrir complicaciones relacionadas con el CMV, tras el trasplante, que la que aporta la serología por sí sola (125). La técnica empleada por nuestro grupo para medir la IMC-CMV ha sido el QF-CMV, que mide la liberación de IFNG por los linfocitos T CD8+ al ser estimulados con péptidos de CMV. En dos estudios llevados a cabo en candidatos a trasplante y en pacientes trasplantados de órgano sólido observamos que había alrededor de un 20% de individuos CMV-seropositivos que eran QFneg frente a CMV, es decir, que a pesar de tener inmunidad humoral frente al virus carecían de IMC-CMV (125,126). Este subgrupo de pacientes que mostraba discordancia

entre la inmunidad humoral y celular tenía más riesgo de sufrir replicación de CMV en el post-trasplante que los pacientes no discordantes (125).

Además, no fuimos el único grupo de investigación que identificó esta discordancia humoral/celular en la infección por CMV. Por ejemplo, también fue descrita por *Bestard et al.* que, utilizando la técnica de ELISpot, observaron que un 43% (12/28) de los candidatos a trasplante renal CMV-seronegativos tenían respuesta de linfocitos T cuando se estimulaban con péptidos de CMV (127).

En 2001, *Zhu et al.* también identificaron esta discordancia humoral/celular en un grupo de individuos sanos. De hecho, de las 50 muestras de sangre de donantes sanos que constituían su estudio, un 28% resultaron ser discordantes. Al exponer los PBMCs de los individuos discordantes y de los no discordantes a estímulos antigénicos de CMV, observaron que sólo un 43% de los discordantes incrementaban sus niveles de IL-2 frente al virus mientras que el 100% de los no discordantes aumentaban la IL-2 en presencia de antígenos del virus. En cuanto al IFNG, un 50% de los discordantes frente al 67% de los no discordantes aumentan los niveles de esta citoquina frente a estímulos de CMV (128).

En definitiva, el hecho de tener esta discordancia humoral/celular parece que conlleva mayor riesgo de complicaciones asociadas a la infección por CMV en individuos trasplantados, de ahí la importancia de evaluar el impacto que tiene el hecho de ser donante CMV-seropositivo de progenitores hematopoyéticos con discordancia humoral/celular frente al CMV en los receptores CMV-seropositivos de un alo-TPH.





## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



#### **4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

Los trabajos científicos incluidos en esta memoria de tesis doctoral han sido diseñados para: 1) Caracterizar la discordancia inmune humoral/celular frente al CMV en individuos sanos y 2) Determinar el impacto de esta discordancia humoral/celular de donantes CMV-seropositivos sobre la reconstitución de la IMC-CMV y en la reactivación del CMV en receptores CMV-seropositivos tras el alo-TPH.

Los resultados obtenidos en los diferentes trabajos se agrupan en dos bloques. Las hipótesis y objetivos se detallan a continuación de forma separada para cada bloque:

##### **Bloque I. La falta de IMC-CMV en voluntarios sanos CMV-seropositivos medida con el ensayo del QuantiFERON-CMV: ¿artefacto o realidad?**

**Antecedentes:** El QuantiFERON-CMV es un ensayo que mide IMC-CMV cuantificando el IFNG liberado por linfocitos T CD8+ después de la estimulación con un conjunto de péptidos de CMV restringidos por HLA. En algunos estudios observacionales realizados en pacientes trasplantados de órgano sólido encontramos que en torno al 20% de los candidatos a trasplante CMV-seropositivos, carecieron de IMC-CMV utilizando la técnica del QF-CMV y mostraron un mayor riesgo de infección post-trasplante. Sin embargo, la explicación de un resultado QFneg en individuos CMV-seropositivos es controvertida. Algunos autores sostienen que los resultados negativos podrían estar relacionados con la incapacidad de algunos individuos para reconocer los péptidos del QF-CMV. Para aclarar este punto analizamos, en un grupo de voluntarios sanos, la IMC-CMV con el QF-CMV y, en paralelo, con el ensayo FASCIA, que mide la respuesta proliferativa de linfocitos tras la estimulación con un lisado de CMV.

**Hipótesis:** Los voluntarios sanos CMV-seropositivos que carecen de IMC-CMV mediante la técnica del QF-CMV (V+QFneg) muestran una respuesta proliferativa de linfocitos T CD4+ y CD8+ CMV-específicos deficiente, al ser estimulados con lisado viral de CMV.

**Objetivo:** Evaluar si la discordancia humoral/celular en sujetos sanos CMV-seropositivos con un resultado QFneg es un artefacto relacionado con el tipo de estímulo que utiliza el ensayo del QF-CMV (22 péptidos de CMV) o si realmente estos sujetos muestran una IMC-CMV deficiente al ser medida con la técnica FASCIA que cuantifica la respuesta proliferativa de linfocitos T usando un estímulo diferente (lisado de CMV).

**Publicación derivada:** *“Lack of cytomegalovirus (CMV)-specific cell-mediated immune response using QuantiFERON-CMV assay in CMV-seropositive healthy volunteers: fact not artifact”*. Valle-Arroyo J, Aguado R, Páez-Vega A, Pérez AB, González R, Fornés G, Torre-Cisneros J, Cantisán S. Scientific Reports. 2020 Apr 28;10(1):7194.

**Financiación:** Este trabajo fue apoyado por los Planes Nacionales de I+D+i 2008-2011/2013-2016, el Instituto de Salud Carlos III, la Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, el Ministerio de Economía y Competitividad y la Red Española de Investigación en Patologías Infecciosas (número de subvención REIPI RD16/0016/0008).

**Bloque II. Análisis del impacto de la discordancia humoral/celular frente a CMV de donantes CMV-seropositivos sobre la reconstitución de la IMC-CMV y en la reactivación del CMV en receptores CMV-seropositivos tras el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.**

**Antecedentes:** La reactivación del CMV es una de las principales causas de complicaciones después del alo-TPH. Está documentado que la serología frente al CMV del donante y del receptor se considera un factor de riesgo para la reactivación del virus en los receptores de un alo-TPH y que la IMC-CMV es fundamental en el control inmunológico del CMV. De modo que, sería interesante evaluar el impacto de la discordancia humoral/celular frente a CMV de los donantes CMV-seropositivos sobre los receptores CMV-seropositivos, ya que cabría suponer que estos pacientes tendrían más riesgo de sufrir complicaciones relacionadas con el virus, dado que adquieren una inmunidad incompleta frente al CMV. Los resultados permitirían establecer un manejo individualizado de este subgrupo de pacientes traduciéndose, cuando sea posible, en una mejor elección del donante compatible.

**Hipótesis:** Los receptores CMV-seropositivos cuyo trasplante de progenitores hematopoyéticos procede de un donante discordante (CMV-seropositivo pero que carecen de IMC-CMV) son los que tienen mayor riesgo de sufrir complicaciones relacionadas con el CMV, ya que, tienen una reconstitución menos funcional y más tardía de la IMC-CMV y, como consecuencia, presentarán una elevada incidencia de reactivación del virus y mayor severidad.

**Objetivo:** Analizar el impacto de la discordancia humoral/celular de donantes CMV-seropositivos (D+QFneg) sobre la reconstitución de la IMC-CMV y en la reactivación del CMV tras el alo-TPH en receptores CMV-seropositivos.

**Publicación derivada:** “*Humoral/Cellular Immune Discordance in Stem Cell Donors: Impact on Cytomegalovirus-Specific Immune Reconstitution after Related Hematopoietic Transplantation*”. Valle-Arroyo J, Páez-Vega A, Fernández-Moreno R, López-Jiménez J, Luna A, Duarte R, Serrano-Martínez F, Villar S, Fernández-Alonso M, Reina G, González-Rico C, Fariñas MC, Rojas R, Herrera C, Martín C, García-Torres E, Torre-Cisneros J, Cantisán S. *Transplantation and Cellular Therapy*. 2022 Oct;28(10):703.e1-703.e8.

**Financiación:** Este trabajo fue apoyado por el Plan Nacional de I+D+i 2013-2016, el Instituto de Salud Carlos III (Subvención PI15/01419 otorgada a Sara Cantisán), la Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, el Ministerio de Ciencia e Innovación, la Red Española de Investigación en Patologías Infecciosas (Subvención REIPI RD16/0016/0008, a Julián de la Torre). Además, también fue cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional “Una manera de hacer Europa” Programa Operativo de Crecimiento Inteligente 2014-2020.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**





**MATERIAL Y MÉTODOS**  
**BLOQUE I**

---

## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1 Bloque I**

#### **5.1.1 Características de los participantes y diseño del estudio**

Se trata de un estudio transversal llevado a cabo con voluntarios sanos procedentes del Centro de Transfusión, Tejidos y Células de Córdoba. Los participantes fueron reclutados desde octubre de 2017 hasta junio de 2019. Se tomó una única muestra de sangre de cada voluntario a partir de la cual se determinó la serología CMV y la IMC-CMV (utilizando el QF-CMV y la técnica FASCIA). Según la serología CMV, se utilizó la nomenclatura de V+ y V- para referirnos a los voluntarios sanos CMV-seropositivos y CMV-seronegativos, respectivamente. En cuanto al resultado del QF-CMV, se denominó QFpos a aquellos individuos con respuesta celular frente a CMV y QFneg a los que no tenían IMC-CMV. Los voluntarios discordantes CMV-seropositivos se llamaron V+QFneg mientras que los discordantes CMV-seronegativos, V-QFpos.

El Consentimiento informado fue obtenido de cada uno de los sujetos y el proyecto fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Reina Sofía de Córdoba. El estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

#### **5.1.2 Determinación de los niveles de IgG e IgM anti-CMV**

El nivel de anticuerpos IgG anti-CMV se determinó mediante dos métodos comerciales diferentes: un ensayo semicuantitativo (expresado en unidades arbitrarias; UA/mL) y un ensayo cuantitativo (expresado en unidades internacionales; UI/mL). En el

ensayo semicuantitativo, los anticuerpos se analizaron por quimioluminiscencia en la Unidad de Microbiología del Hospital Reina Sofía (Diasorin SA, Madrid, España). Las muestras con una concentración de IgG anti-CMV inferior a 12.0 UA/ml se consideraron CMV-seronegativas. En el método cuantitativo (DIAsource Immunoassays SA, Louvain-la-Neuve, Belgium) se utilizó la curva de calibración y el estándar internacional recomendados por la Organización Mundial de la Salud. El análisis con el método cuantitativo se llevó a cabo en nuestro laboratorio del Instituto de Investigación IMIBIC.

En el subgrupo de voluntarios discordantes CMV-seronegativos, además de las determinaciones anteriores, también se realizó una determinación semicuantitativa de la IgM anti-CMV.

### **5.1.3 Tipaje HLA**

Se extrajo ADN genómico de 200 µl de sangre utilizando el kit comercial QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN Hilden, Germany). Las muestras fueron procesadas automáticamente (QIAcube QIAGEN Hilden, Germany). La determinación del tipaje HLA se realizó utilizando INNO-LIPA HLA-A Multiplex, que es un método de PCR-SSO reverse (Fujirebio Europe N.V., Gante, Belgium). Los alelos HLA-A se determinaron con el software LIRASTM para INNO-LIPA HLA. En aquellas muestras que no pudieron ser analizadas por SSO, se utilizó la técnica SSP.

La extracción de ADN se realizó en nuestro laboratorio del IMIBIC mientras que el tipaje HLA fue llevado a cabo por el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba.

#### 5.1.4 Ensayo del QF-CMV para la determinación de la IMC-CMV

El QF-CMV permite analizar la respuesta de los linfocitos T CD8+ frente al CMV mediante la cuantificación del IFNG liberado, al ser estimulados con 22 péptidos del virus. Los péptidos tienen un tamaño determinado (9 aminoácidos) para que se unan específicamente a las moléculas de HLA de clase I y estimulen a los linfocitos T CD8+. Los alelos incluidos son: A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44 B51, B52, B57, B58, B60 y Cw6 (A30, B13) que abarcan más del 98% de la población humana. Todos los individuos reclutados para este estudio tenían HLA capaces de reconocer a los péptidos del QF-CMV.

El QF-CMV fue llevado a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Cellestis, QIAGEN company, Melbourne, Australia). Este test consta de dos fases, una primera de incubación y otra de cuantificación. Un mililitro de sangre total heparinizada se recoge en tres tubos, que contienen: 1) control negativo (sin antígenos), 2) una mezcla de 22 péptidos de CMV y 3) fitohemaglutinina (PHA) (mitógeno utilizado como control positivo). Los tres tubos se agitan y se incuban a 37°C durante 16-24 horas y posteriormente se centrifugan 15 minutos a 2000-3000 g para recoger el plasma. En la segunda fase, se cuantifica el IFNG producido en el plasma mediante ELISA estándar.

Son tres los posibles resultados que se pueden obtener: *positivo* (QFpos), *negativo* (QFneg) e *indeterminado* (QFind). Un resultado es “positivo” cuando la respuesta en el tubo del CMV menos la del control negativo es  $\geq 0.2$  UI/mL de IFNG. Se consideró que los individuos con un resultado “positivo” tenían respuesta inmune celular específica frente al CMV. El resultado es “negativo” cuando dicha respuesta es  $< 0.2$  UI/mL. Cuando la respuesta en el tubo de CMV menos la del control negativo da un nivel de IFNG  $< 0.2$  UI/mL y el nivel de IFNG en el tubo del mitógeno menos el del control negativo es  $< 0.5$  UI/mL el resultado se considera “indeterminado”. Este último resultado

puede producirse en situaciones de concentración de linfocitos insuficiente, disminución de la actividad de los linfocitos por manipulación incorrecta de las muestras, llenados/mezclados incorrectos del tubo de mitógeno o incapacidad de los linfocitos del paciente para producir IFNG, como en el caso de los pacientes que se han sometido recientemente a un TPH.

### **5.1.5 Análisis de la IMC-CMV mediante la técnica FASCIA**

La técnica FASCIA analiza la respuesta de los linfocitos T midiendo la capacidad proliferativa de los mismos y la formación de blastos al ser estimulados con un lisado de CMV. El lisado viral incluye proteínas implicadas en todas las fases del ciclo de replicación del virus, tempranas y tardías, además de proteínas nucleares, citoplasmáticas, estructurales y no estructurales. Esta técnica permite además medir en el sobrenadante el nivel de citoquinas secretadas por los linfocitos.

En esta técnica, la sangre completa se diluyó 1:9 en RPMI suplementado con L-glutamina, penicilina y estreptomina denominado a partir de ahora RPMIc (completo). Se mezclaron 450 µL de la sangre diluida con 50 µL de lisado viral de CMV (5µg/mL) (Microbix Biosystems Inc, Canada), mitógeno Pokeweed (PWM) (5 µg/mL) (Sigma-Aldrich, USA), con la enterotoxina A y B de *Staphylococcus aureus* (SEA y SEB) (0.1 µg/mL de cada uno) (Sigma-Aldrich, USA) y con RPMI (control negativo) en tubos falcon estériles de polipropileno de 12 x 75 mm hasta llegar a un volumen final de 500 µL. El PWM es una lectina procedente de *Phytolacca americana* que estimula la diferenciación policlonal de los linfocitos B. Las enterotoxinas A y B de *Staphylococcus aureus* son consideradas superantígenos que producen una gran estimulación de la población de linfocitos T. A continuación, se incubaron las muestras durante una semana

a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y un 95% de humedad. Pasado este tiempo, se recogió y congeló el sobrenadante. Las células fueron teñidas con anti-CD3 AF700 (BD Biosciences, USA) y anti-CD8 APC (Miltenyi Biotec, Germany). Además, el tubo de PWM fue también teñido con anti-CD19 Viogreen (Miltenyi Biotec, Germany). Los tubos fueron incubados durante 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Tras la incubación, los eritrocitos fueron lisados con un buffer de lisis (Beckman Coulter, USA) y las muestras se volvieron a centrifugar 5 minutos a 1800 rpm. Los sobrenadantes fueron descartados y las células resuspendidas en 450 µL de PBS (del inglés, *phosphate buffered saline*) suplementado con un 1% de albúmina procedente de suero bovino (PBSA). Los blastos fueron adquiridos durante 80 segundos en un citómetro LSR Fortessa Flow Cytometer (Beckman Coulter, CA, USA).

El número absoluto de células proliferativas fue calculado usando un tubo Trucount (BD Biosciences, CA, USA). Los valores de las muestras no estimuladas (con RPMI) se restaron a los valores de las muestras estimuladas.

#### **5.1.6 Cuantificación de la subpoblación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> CMV-específica mediante la tecnología de los dextrámeros**

El número de linfocitos T CD8<sup>+</sup> CMV-específicos fue cuantificado usando los dextrámeros-HLA (Immudex, Denmark). Se usaron dos dextrámeros específicos de CMV: 1) HLA-A\*0201/NLVPMVATV, epítipo procedente de la proteína pp65 de CMV y 2) HLA-A\*0101/VTEHDTLLY, epítipo también derivado de pp65. Se usaron 0,5x10<sup>6</sup> PBMCs y se incubaron con 5 µL de los dextrámeros durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se marcaron usando el anti-CD3 AF700 (BD Biosciences), TCR αβ (APC-Vio700) y anti-CD8 PE-700 (Miltenyi Biotec) y se incubaron durante 15 minutos

a 4°C en oscuridad. Después de dos lavados con PBSA, las células se pasaron por el citómetro de flujo LSR Fortessa (Becton Dickinson). Finalmente, los datos se analizaron con el software FlowJo versión vX.0.6 (Tree Star, USA). Los dot plots se generaron usando el mismo software.

### **5.1.7 Análisis estadístico del bloque I**

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software estadístico IBM SPSS 24.0 (SPSS Inc., Chicago IL, USA). Las variables categóricas fueron comparadas usando el test Chi-cuadrado o el test de Fisher mientras que las variables cuantitativas se compararon usando la prueba U de Mann-Whitney. Los valores fueron considerados estadísticamente significativos cuando el p-valor < 0.05. Los gráficos se diseñaron usando el GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc).





**MATERIAL Y MÉTODOS**  
**BLOQUE II**

---

## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.2 Bloque II**

#### **5.2.1 Diseño del estudio y participantes**

Estudio prospectivo, observacional y multicéntrico llevado a cabo en pacientes CMV-seropositivos que han sido sometidos a un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. En el estudio participaron 5 centros españoles (Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla de Santander, Clínica Universidad de Navarra, Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda de Madrid y Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid) y los pacientes fueron reclutados entre junio de 2016 y julio de 2020. Este trabajo se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki y fue aprobada por el Comité Ético de cada hospital. Además, se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes.

Todos los pacientes eran mayores de edad, CMV-seropositivos y sometidos a un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos procedente de un donante emparentado. Para evaluar los episodios de reactivación de CMV de los receptores, se monitorizó su IMC-CMV durante los 12 meses posteriores al trasplante mediante el ensayo del QuantiFERON-CMV. Para ello se tomó una muestra de sangre el día +14 después del TPH, semanalmente hasta el mes +2 y mensualmente hasta el mes +6 y una última muestra en el mes +12. La determinación de la IMC-CMV de donantes y receptores fue llevada a cabo en nuestro laboratorio del IMIBIC. Además, se aislaron y criopreservaron PBMCs de los pacientes. La carga viral fue determinada al menos semanalmente durante la hospitalización, cada dos semanas hasta el mes +3 y cuando

clínicamente era necesario. Los pacientes de este estudio siguieron una estrategia de terapia anticipada (principalmente valganciclovir o foscarnet). Ninguno de ellos siguió profilaxis primaria con letermovir. Adicionalmente, se obtuvo una única muestra de sangre de los donantes para determinar la IMC-CMV y aislar PBMCs. Cuando se utilizó sangre periférica como fuente de progenitores hematopoyéticos, la muestra de sangre fue extraída antes de que los donantes se sometieran a los factores estimulantes de colonias de granulocitos para la movilización de los progenitores.

### **5.2.2 Definiciones**

La infección y la enfermedad por CMV fueron definidas de acuerdo con la ECIL 7. La infección por CMV fue definida como la detección de ácidos nucleicos de CMV en plasma mientras que la enfermedad por CMV se definió como los síntomas y/o signos clínicos asociados a la presencia del virus.

Una de las variables principales fue la reconstitución estable de la IMC-CMV que se definió como tener un resultado positivo para el QF-CMV persistente durante un período superior a 2 meses. También se evaluó la reactivación del CMV, aunque para este estudio sólo se consideró la reactivación clínicamente significativa (definida como aquellos casos en los que hay una carga viral de CMV  $> 500$  UI/mL en plasma y que además requieren terapia antiviral específica). La carga viral pico se definió como la carga viral máxima detectada en cualquier momento del período post-trasplante. La duración del periodo de replicación de CMV se calculó como el número total de días desde el primer análisis de PCR positivo hasta el primer análisis de PCR negativo. En pacientes con 2 o más episodios de replicación, la duración total de la replicación fue considerada como la suma total de días de los diferentes episodios. El prendimiento mieloide se

determinó como el tiempo transcurrido desde el trasplante hasta el primero de 3 días con un recuento estable de neutrófilos  $> 500 \times 10^3 / \mu\text{L}$ .

Como se indica anteriormente, todos los receptores incluidos en el estudio fueron CMV-seropositivos y se clasificaron en 3 grupos según el resultado de la serología CMV e IMC-CMV de su donante, como receptores procedentes de donante D+QFpos, D+QFneg y D-.

### **5.2.3 Determinación de los niveles de IgG anti-CMV y de la carga viral**

Los niveles de IgG anti-CMV en donantes y receptores se determinaron a partir de una muestra de plasma y se realizó como parte de la práctica clínica rutinaria por el Servicio de Microbiología de cada centro. La carga viral se analizó en plasma por PCR a tiempo real usando la técnica implementada en cada centro. Los episodios con carga viral  $< 500 \text{ UI/mL}$  fueron considerados blips.

### **5.2.4 Determinación de la IMC-CMV mediante el ensayo del QF-CMV**

El ensayo del QF-CMV se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante siguiendo el mismo protocolo explicado en la página 52. Tanto los 81 pacientes, cuya IMC-CMV fue monitorizada, como sus donantes tenían alelos HLA compatibles con el QF-CMV.

### **5.2.5 Tecnología de los dextrámeros para la cuantificación de la subpoblación de los linfocitos T CD8+ CMV-específicos**

El número de linfocitos T CD8+ CMV-específicos se cuantificó mediante la tecnología de los dextrámeros-HLA (Immudex, Virum, Denmark) y el protocolo se llevó a cabo de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los 4 multímeros usados en este estudio fueron: HLA-A\*0201/NLVPMVATV (pp65), HLA-A\*0101/VTEHDTLLY (pp50), HLA-B\*0702/TPRVTGGGAM (pp65), y HLA-B\*3501/IPSINVHHY (pp65). Todos ellos unidos al fluorocromo ficoeritrina (PE) para identificar las poblaciones por citometría de flujo. Aproximadamente  $0.5 \times 10^6$  PBMCs se incubaron con los dextrámeros (5  $\mu$ L), durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se tiñeron con anti-CD3 AF700 (BD Biosciences, San Jose, CA), TCR  $\alpha\beta$  (APC), TCR  $\gamma\delta$  (APCVio700), y anti-CD8 (PE-770) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) y se incubaron durante 15 minutos a 4°C en oscuridad. Después de 2 lavados con PBS suplementado con albúmina sérica bovina (PBSA), las células se tiñeron con la tinción de viabilidad 7AAD (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) y fueron adquiridas por un citómetro de flujo LSR Fortessa (BD Biosciences). Se realizó un análisis posterior a la adquisición y se generaron los dot plots de las poblaciones celulares de interés utilizando FlowJo vX.0.6 (FlowJo, Ashland, OR). Los datos de la subpoblación de linfocitos T CD8+ CMV-específica se presentan como el porcentaje con respecto a las células T CD8+ totales.

### **5.2.6 Análisis estadístico del bloque II**

Los diferentes análisis estadísticos se realizaron usando el software estadístico SPSS 24.0 (IBM, Armonk, NY). Las variables categóricas se compararon con el test Chi-cuadrado o el test de Fisher. Las variables cuantitativas fueron comparadas con la prueba

U de Mann Whitney. Los análisis de “Tiempo transcurrido hasta el evento” se realizaron utilizando el método de Kaplan-Meier. Además, se llevó a cabo un análisis de regresión de Cox multivariante para evaluar el impacto del tipo de donante (D+QFpos, D+QFneg y D-) sobre el riesgo de reconstitución de la IMC-CMV tras ser ajustado por otras variables relevantes. Algunos parámetros significativos de carácter clínico o biológico también se incluyeron en el análisis multivariante a pesar de no ser estadísticamente significativos en el análisis univariante. El modelo incluía pruebas de colinealidad, interacciones y supuestos de riesgos proporcionales. El modelo multivariante se limitó a siete factores debido al pequeño número de pacientes de la cohorte. Se utilizaron la prueba de residuos de Cox-Snell y  $-2 \cdot \log$ -verosimilitud para evaluar la bondad de ajuste. Los valores se consideraron estadísticamente significativos cuando el p-valor  $< 0.05$ . Las gráficas se realizaron mediante software estadístico SPSS 24.0 (IBM).

## **RESULTADOS**





# **RESULTADOS**

## **BLOQUE I**

---

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Bloque I

#### 6.1.1 Características demográficas de los sujetos de estudio

Un total de 93 voluntarios sanos fueron incluidos en el estudio. En la Tabla 1 se incluyen algunas características demográficas. Setenta y un participantes (76.3%) fueron CMV-seropositivos.

**Tabla 1.** Características demográficas de la población de estudio

CARACTERÍSTICAS	Total (n=93)
Edad, media (DE)	42.8 (12.0)
<b>Sexo, n (%)</b>	
Femenino	26 (28.0)
Masculino	67 (72.0)
<b>Serología CMV, n (%)</b>	
V-	22 (23.7)
V+	71 (76.3)

DE, Desviación Estándar

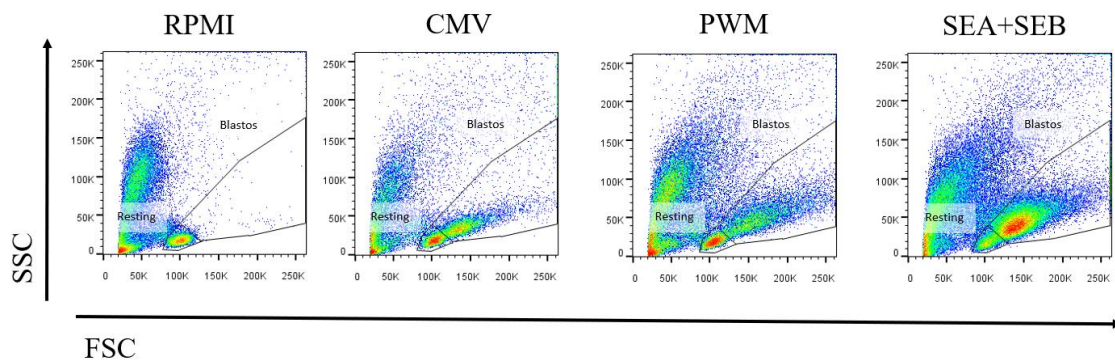
#### 6.1.2 Análisis de la discordancia humoral/celular

Primero analizamos la IMC-CMV en todos los sujetos mediante el ensayo del QF-CMV. Treinta individuos (32.3%) fueron QFneg y 63 (67.7%) fueron QFpos. Ningún participante tuvo un resultado QFind.

Con el objetivo de obtener la frecuencia de individuos discordantes, procedimos a determinar la asociación entre serología CMV e IMC-CMV. Encontramos que 17 de los 22 individuos CMV-seronegativos (77.3%) fueron QFneg. De los voluntarios CMV-seropositivos, 58 de los 71 (81.7%) fueron QFpos. Por tanto, 18 sujetos sanos (19.3%) mostraban discordancia humoral/celular (5 individuos V- y 13 individuos V+).

### 6.1.3 Diferencias en la respuesta proliferativa entre voluntarios discordantes y no discordantes

Para analizar si los voluntarios discordantes y no discordantes mostraban diferente capacidad proliferativa, comparamos la proliferación de los linfocitos T CD4+ y T CD8+ entre los dos subgrupos de sujetos CMV-seropositivos (V+QFpos vs. V+QFneg) y también en los CMV-seronegativos (V-QFneg vs. V-QFpos). En la Figura 1 se muestran una serie de plots de la respuesta proliferativa de un sujeto representativo frente a los diferentes estímulos antígenicos.



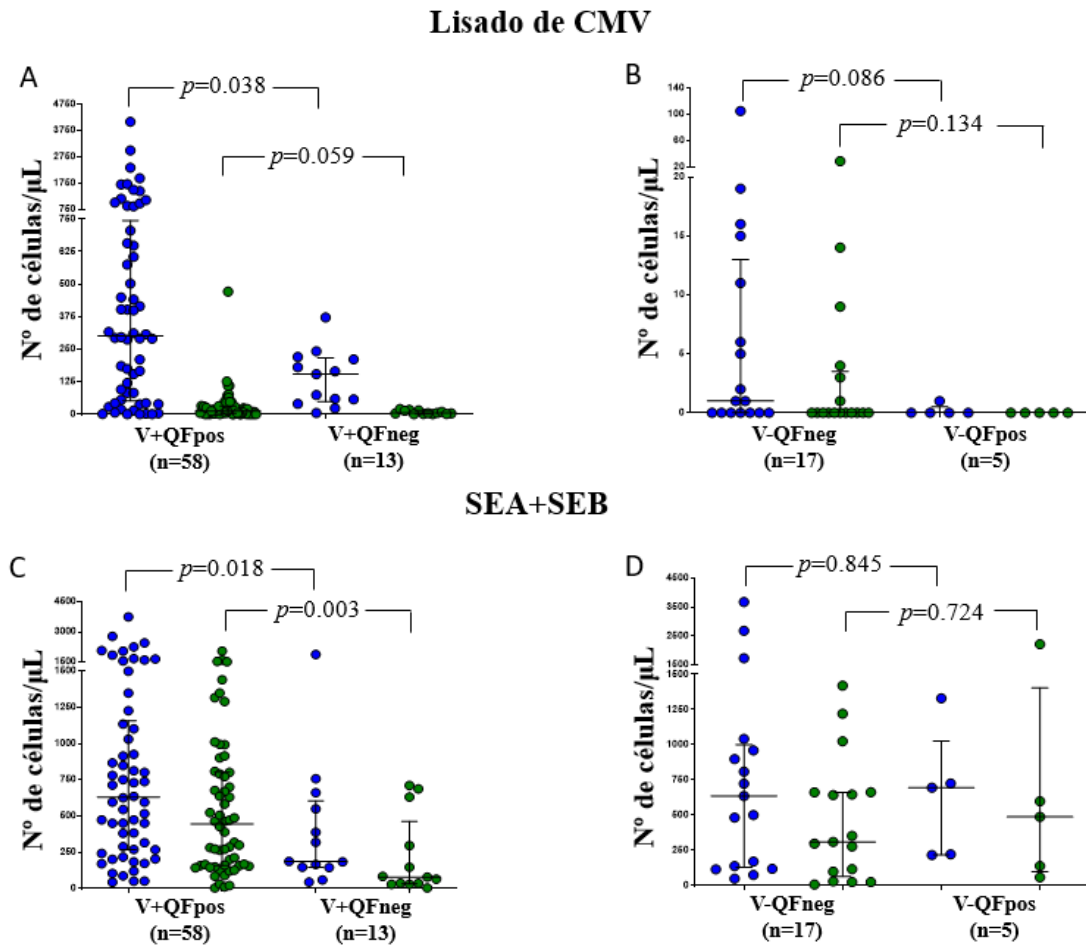
**Figura 1. Estrategia de análisis para la evaluación de las respuestas proliferativas de los linfocitos en el ensayo FASCIA por citometría de flujo.** Se muestran las respuestas proliferativas frente al lisado de CMV, PWM, SEA+SEB y medio RPMI. Los linfocitos no activados (resting) y en proliferación (blastos) están representados en un gráfico de dispersión de puntos que indica el tamaño mediante el eje del Forward Scatter (FSC) y la complejidad en el eje Side Scatter (SSC).

Observamos diferencias significativas entre los dos subgrupos de individuos V+ tras la estimulación con el lisado de CMV (Figura 2A). Específicamente, la proliferación de linfocitos T CD4+ fue menor en los voluntarios V+QFneg que en V+QFpos (154.0 células/ $\mu$ L vs. 301.5 células/ $\mu$ L;  $p=0.038$ ). En cuanto a los linfocitos T CD8+, también se observó una tendencia estadística hacia una menor proliferación en los sujetos discordantes V+QFneg (4.0 células/ $\mu$ L vs. 12.5 células/ $\mu$ L;  $p=0.059$ ). Entre los 2 subgrupos de individuos CMV-seronegativos no se observaron diferencias significativas (Figura 2B).

En cuanto a la estimulación con el superantígeno (SEA+SEB), también encontramos diferencias significativas en la formación de blastos dentro de los sujetos CMV-seropositivos (Figura 2C). La proliferación de ambas poblaciones linfocitarias, T CD4+ (mediana de 188.0 células/ $\mu$ L vs. 631.5 células/ $\mu$ L;  $p=0.018$ ) y T CD8+ (mediana de 80.0 células/ $\mu$ L vs. 446.0 células/ $\mu$ L;  $p=0.003$ ) fue menor en los sujetos V+QFneg que en los sujetos V+QFpos. No hubo diferencias estadísticamente significativas en individuos V- (Figura 2D).

También llevamos a cabo el mismo análisis comparativo con la proliferación de linfocitos B después de la estimulación con PWM. En este caso, no observamos diferencias significativas en los sujetos CMV-seropositivos ni en los CMV-seronegativos.

Luego realizamos un análisis ROC para determinar la capacidad discriminatoria de la proliferación de linfocitos T CD4+ y T CD8+ para identificar individuos V+QFpos frente a V+QFneg. El área bajo la curva (AUC) mostró resultados deficientes tanto para las células T CD4+ (AUC: 0.68, IC 95 %: 0.56–0.80;  $p=0.038$ ) como para las células T CD8+ (AUC: 0.67, IC 95 % 0.54-0.80;  $p=0.060$ ). Estas observaciones mostraron que, a pesar de ser estadísticamente significativa, el AUC por debajo de 0.70 para las células T CD4+ tenía un poder discriminatorio pobre.



**Figura 2. Análisis comparativo de la proliferación de los linfocitos en voluntarios sanos CMV-seropositivos y CMV-seronegativos discordantes y no discordantes.** La figura muestra la proliferación de linfocitos T CD4+ y T CD8+ de los sujetos después de la estimulación con lisado de CMV (A, B) y con SEA+SEB (C, D). La línea horizontal representa la mediana de los valores. Como medida de dispersión, se muestra el rango intercuartílico. La prueba estadística usada es la U de Mann-Whitney. Los círculos azules representan los linfocitos T CD4+ mientras que los verdes representan los T CD8+. Un p-valor < 0.05 se consideró estadísticamente significativo.

#### 6.1.4 Caracterización de los individuos CMV-seropositivos discordantes y no discordantes (V+QFneg vs. V+QFpos)

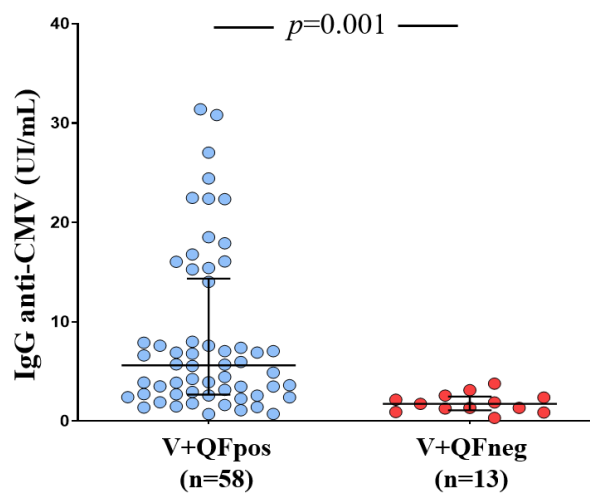
Teniendo en cuenta que las diferencias más evidentes se observaron en individuos V+ además de que constituían el grupo más numeroso, caracterizamos aún

más a estos participantes sanos comparando los sujetos V+QFpos vs. V+QFneg. De modo que se llevó a cabo un análisis de los siguientes parámetros de interés:

- Nivel de anticuerpos IgG anti-CMV en suero.
- Combinación de los marcadores: nivel de IgG anti-CMV y respuesta proliferativa.
- Otros parámetros: sexo, edad o alelos HLA.

### Anticuerpos IgG anti-CMV

Con el objetivo de investigar si los individuos V+QFpos vs. V+QFneg muestran diferencias no solo proliferativas sino también humorales, comparamos el nivel de IgG anti-CMV (UI/mL) en ambos grupos. En este sentido, encontramos que los V+QFneg tenían un nivel medio de IgG anti-CMV significativamente más bajo que los sujetos V+QFpos (1.7 UI/mL frente a 5.6 UI/mL;  $p=0.001$ ) (Figura 3).



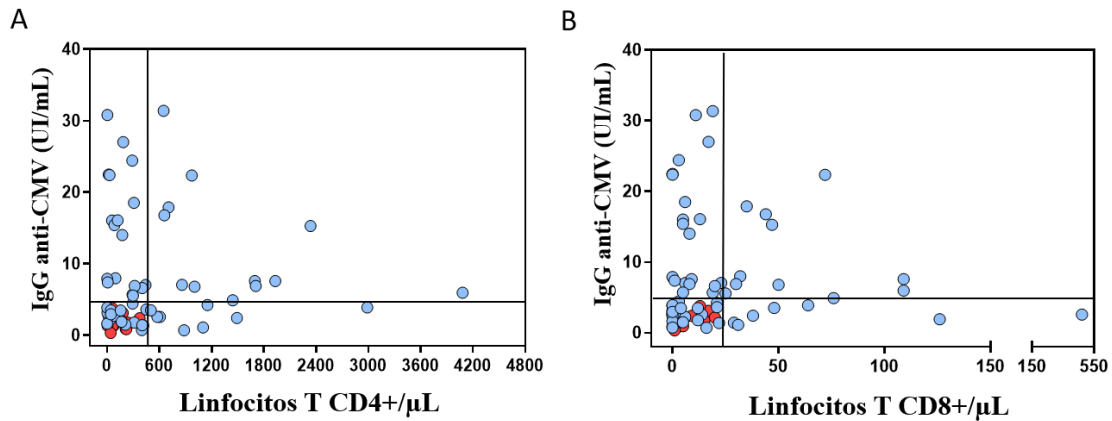
**Figura 3. Análisis comparativo de los niveles de IgG anti-CMV en suero (expresado en UI/mL) entre los individuos V+QFpos y los V+QFneg.** La línea horizontal representa la mediana de los valores y también se muestra el rango intercuartílico. La prueba estadística usada es la U de Mann-Whitney. Un p-valor < 0.05 se consideró estadísticamente significativo.

De acuerdo con estos resultados, ¿sería suficiente que un individuo V+ tuviera un nivel bajo de IgG anti-CMV para inferir una respuesta inmune CMV-específica reducida en estos pacientes? Con el objetivo de intentar responder a esta pregunta, se realizó un análisis ROC para encontrar el mejor nivel de corte de la IgG y así intentar discriminar entre individuos V+QFpos y V+QFneg. Cuando se llevó a cabo el análisis, observamos que tenía un buen poder discriminatorio (AUC: 0.87, IC 95%: 0.78-0.95;  $p < 0.001$ ). El valor con mayor sensibilidad (0.69) y especificidad (0.92) fue 3.2 UI/mL de IgG anti-CMV. Los valores predictivos positivo y negativo para este punto de corte fueron 0.97 y 0.40, respectivamente. El valor predictivo negativo indicó que solo el 40% de los voluntarios con un nivel de IgG anti-CMV inferior a 3.2 UI/mL eran V+QFneg. Por lo tanto, un nivel bajo de IgG específica no era un indicador fiable para identificar individuos discordantes.

#### Combinación de los marcadores: nivel de IgG anti-CMV y respuesta proliferativa

Posteriormente, analizamos la combinación del nivel de IgG anti-CMV (UI/mL) y la capacidad proliferativa dentro de los individuos V+QFpos y V+QFneg. Como se muestra en la Figura 4, todos los sujetos V+QFneg tenían un nivel bajo de IgG anti-CMV y una baja proliferación de linfocitos T, mientras que los individuos V+QFpos presentaban una alta heterogeneidad en ambos parámetros. En concreto, los individuos discordantes tenían un nivel de IgG anti-CMV inferior a 4.0 UI/mL, el número total de linfocitos T CD4+ era inferior a 400 células/ $\mu$ L y el de linfocitos T CD8+ fue inferior a 20 células/ $\mu$ L.





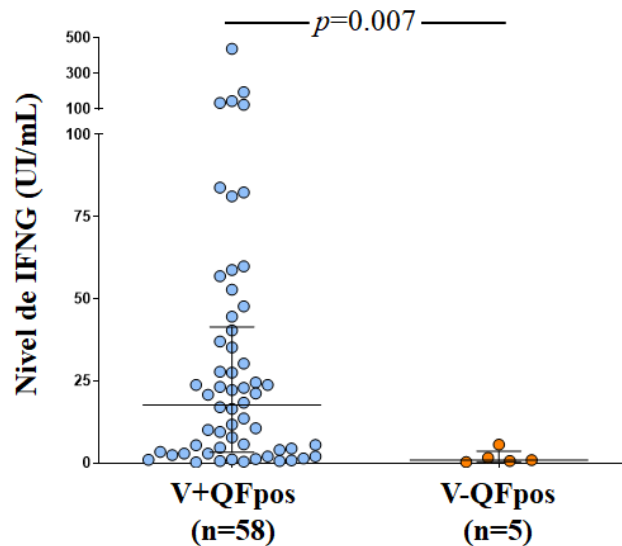
**Figura 4. Combinación de los parámetros IgG anti-CMV (UI/mL) y respuesta proliferativa de los linfocitos T CD4+ (A) y T CD8+ (B) (expresada como linfocitos/ $\mu$ L) en voluntarios CMV-seropositivos discordantes y no discordantes (V+QFneg vs. V+QFpos).** Los círculos rojos representan a los sujetos discordantes mientras que los círculos azules representan a los voluntarios no discordantes.

#### Otros parámetros

También analizamos si los voluntarios V+QFpos y V+QFneg presentaban diferencias en otros parámetros, como el sexo, la edad o los alelos HLA. Los sujetos discordantes V+QFneg mostraron una tendencia estadística a ser mayores que los individuos V+QFpos (47.9 vs. 42.7 años;  $p=0.087$ ). Con respecto al sexo, los hombres y mujeres no se distribuyeron de forma diferente entre los dos grupos, siendo la frecuencia de mujeres del 31.0% (18/58) en sujetos V+QFpos y del 38.5% (5/13) en sujetos V+QFneg (Test Chi-cuadrado  $p=0.744$ ). Las frecuencias alélicas de HLA no fueron significativamente diferentes entre los individuos V+QFpos y V+QFneg.

### 6.1.5 Sujetos sanos discordantes CMV-seronegativos (V-QFpos)

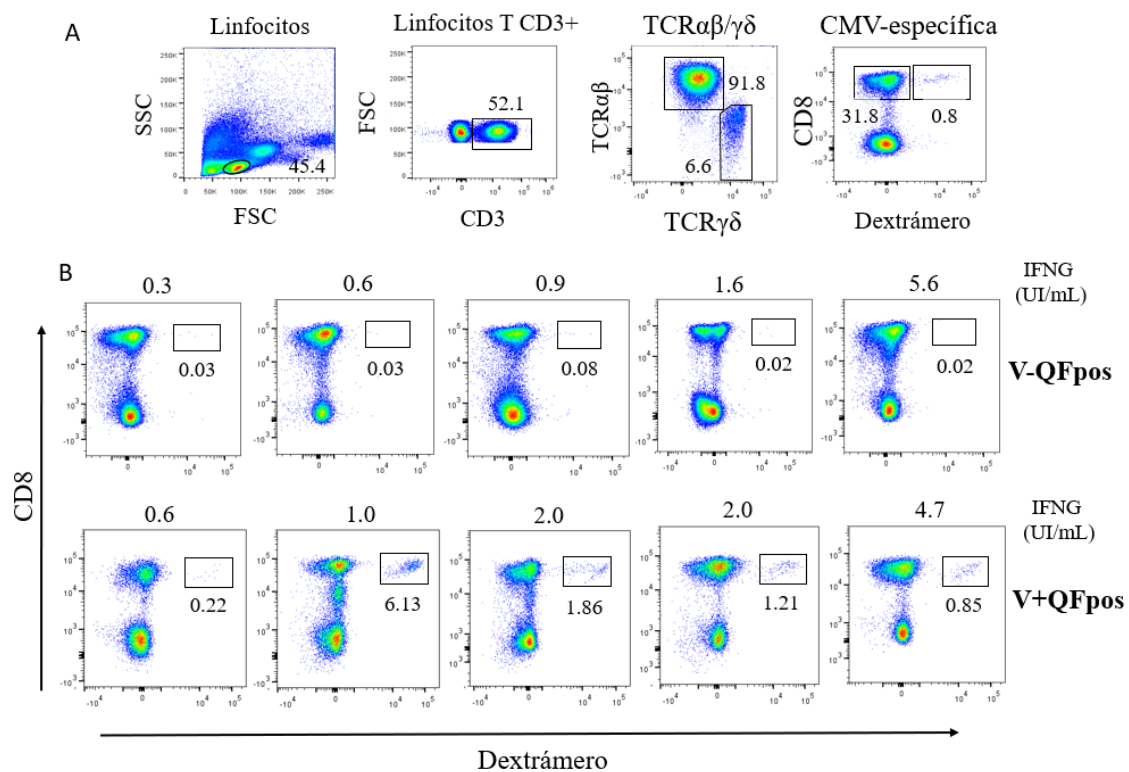
Como se indicó anteriormente, también encontramos 5 individuos discordantes dentro de los sujetos CMV-seronegativos (V-QFpos). En este grupo analizamos el nivel de IFNG (UI/mL) para determinar si estos sujetos discordantes tenían un nivel de IFNG similar al de los individuos del grupo V+QFpos. Encontramos que la mediana de IFNG liberado fue mucho menor en los individuos V-QFpos que en los individuos V+QFpos (0.9 frente a 17.7 UI/mL;  $p=0.007$ ) (Figura 5).



**Figura 5. Comparación de los niveles de IFNG liberado por los linfocitos T CD8+ CMV-específicos (medidos con el QF-CMV) entre los sujetos V+QFpos y los V-QFpos.** La línea horizontal representa la mediana. Se muestra el rango intercuartílico. La prueba estadística usada es la U de Mann-Whitney. Un  $p$ -valor  $< 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

Dado que el IFNG cuantificado por el ensayo del QF-CMV es liberado por las células T CD8+ CMV-específicas, analizamos esta subpoblación en el grupo discordante V-QFpos. Para ello, utilizamos la tecnología de los dextrámeros, que cuantifica el número de células T CD8+ específicas de CMV. Los 5 individuos discordantes V-QFpos tenían el alelo HLA-A\*02, por lo que, utilizamos el dextrámero HLA-A\*0201/NLVPMVATV.

Como grupo control, seleccionamos a 4 individuos V+QFpos también HLA-A\*02 con un nivel de IFNG similar al de los individuos V-QFpos. Además, un sujeto V+QFpos con el alelo HLA-A\*01 (usamos el dextrámero HLA-A\*0101/VTEHDTLLY) y que tenía el nivel más bajo de IFNG también se incluyó en el grupo de referencia. Sorprendentemente, ninguno de los discordantes V-QFpos tenían una subpoblación detectable de linfocitos T CD8+ CMV-específicos mientras que todos los individuos V+QFpos, incluso aquellos con un nivel de IFNG de 0.6 UI/mL, si mostraban esta población (Figura 6).



**Figura 6. Estrategia de análisis para determinar la subpoblación de linfocitos T CD8+ CMV-específicos usando la tecnología de los dextrámeros por citometría de flujo (A).** Cuantificación de la subpoblación de los cinco sujetos V-QFpos HLA-A\*02. Además, los cinco individuos V+QFpos (4 con alelo HLA-A\*02 y 1 con HLA-A\*01) fueron incluidos como grupo de referencia. Los valores numéricos dentro de los paneles representan el porcentaje de subpoblación T CD8+ CMV-específica con respecto al total de linfocitos T CD8+ y el nivel de IFNG (UI/mL) para cada individuo, medido con el QF-CMV, se muestra encima de cada panel (B).

# **RESULTADOS**

## **BLOQUE II**

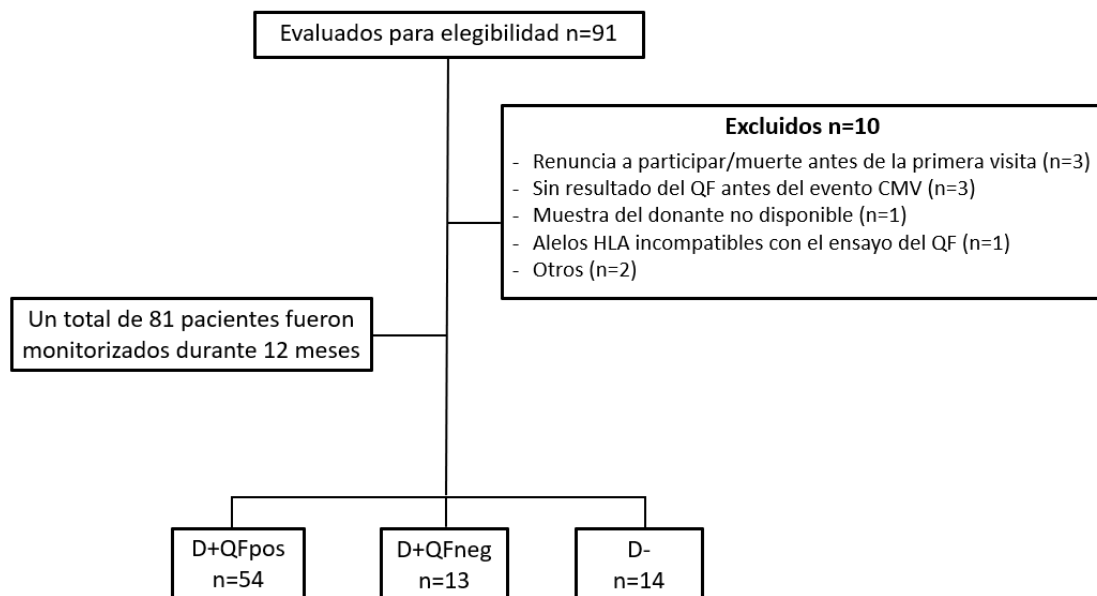
---

## 6. RESULTADOS

### 6.2 Bloque II

#### 6.2.1 Características clínicas y demográficas

La Figura 1 representa el diagrama de flujo de los pacientes. Un total de 91 receptores de alo-TPH y sus donantes fueron incluidos en este estudio multicéntrico. De estos 91 pacientes, 6 fueron excluidos por fallecimiento antes de la extracción inicial de sangre y/o por no ser posible la determinación de la IMC-CMV. Además, otros 4 pacientes fueron excluidos por otras razones. Por tanto, 81 pacientes fueron monitorizados durante 12 meses.



**Figura 1. Diagrama de flujo de los pacientes incluidos en el estudio.**

Las características más importantes de los receptores (clasificados según la serología CMV e IMC-CMV de su donante en 3 grupos) están recogidas en la Tabla 1.

Tabla 1. Características demográficas y clínicas de los pacientes

CARACTERÍSTICAS	Pacientes totales (n=81)	D+QFpos (n=54)	D+QFneg (n=13)	D- (n=14)
<b>Edad (años) mediana (rango)</b>	57 (20-75)	55 (20-75)	59 (23-72)	59 (38-70)
<b>Sexo</b>				
<b>Femenino</b>	30 (37.0)	16 (29.6)	6 (46.2)	8 (57.1)
<b>Masculino</b>	51 (63.0)	38 (70.4)	7 (53.8)	6 (42.9)
<b>Compatibilidad HLA</b>				
<b>Idéntica</b>	27 (33.3)	20 (37.0)	4 (30.8)	3 (21.4)
<b>Haploidéntica</b>	54 (66.7)	34 (63.0)	9 (69.2)	11 (78.6)
<b>Acondicionamiento</b>				
<b>No mieloablativo</b>	50 (61.7)	32 (59.3)	9 (69.2)	9 (64.3)
<b>Mieloablativo</b>	31 (38.3)	22 (40.7)	4 (30.8)	5 (35.7)
<b>Fuente de progenitores</b>				
<b>Médula ósea</b>	17 (21.0)	12 (22.2)	3 (23.1)	2 (14.3)
<b>Sangre periférica</b>	64 (79.0)	42 (77.8)	10 (76.9)	12 (85.7)
<b>Tipo de EICH</b>				
<b>EICH aguda</b>	35 (43.2)	24 (44.4)	6 (46.1)	5 (35.7)
<b>EICH crónica</b>	7 (8.6)	6 (11.1)	1 (7.7)	0
<b>Ambas</b>	20 (24.7)	12 (22.2)	2 (15.4)	6 (42.8)
<b>Enfermedad subyacente</b>				
<b>Leucemia mieloide aguda</b>	35 (43.2)	22 (40.7)	5 (38.5)	8 (57.1)
<b>Leucemia linfoblástica aguda</b>	15 (18.5)	10 (18.5)	1 (7.7)	4 (28.6)
<b>Linfoma</b>	11 (13.6)	7 (13.0)	3 (23.0)	1 (7.1)
<b>Síndrome mielodisplásico</b>	8 (9.9)	6 (11.1)	2 (15.4)	0
<b>Otras</b>	12 (14.8)	9 (16.7)	2 (15.4)	1 (7.1)
<b>Inmunosupresión</b>				
<b>Ci/Tac/MFM</b>	51 (63.0)	33 (61.1)	7 (53.8)	11 (78.6)
<b>Ci/Tac</b>	11 (13.6)	7 (13.0)	1 (7.7)	3 (21.4)
<b>Ci/MFM</b>	9 (11.1)	5 (9.2)	4 (30.8)	0
<b>Ci</b>	5 (6.2)	5 (9.2)	0	0
<b>Tac/MFM</b>	4 (4.9)	3 (5.6)	1 (7.7)	0
<b>Tac/Rap</b>	1 (1.2)	1 (1.9)	0	0
<b>Uso de esteroides</b>	40 (49.4)	24 (46.2)	6 (46.2)	10 (76.9)
<b>Tiempo desde el TPH al prendimiento mieloide, d, mediana (RIQ)</b>	20.0 (16.0-23.0)	20.0 (16.0-22.0)	21.0 (17.5-26.0)	18.0 (16.0-23.0)
<b>Mortalidad</b>				
<b>Exitus totales a los 12 meses</b>	20 (24.7)	15 (27.8)	3 (23.1)	2 (14.3)
<b>Infecciones<sup>a</sup></b>	11 (13.6)	8 (14.8)	1 (7.7)	2 (14.3)
<b>EICH</b>	3 (3.7)	3 (5.6)	0	0
<b>Recaída</b>	6 (7.4)	4 (7.4)	2 (15.4)	0
<b>MRT 100 días</b>	9 (11.1)	8 (14.8)	0	1 (7.1)
<b>MRT 365 días</b>	14 (17.3)	11 (20.4)	1 (7.7)	2 (14.3)

Datos expresados en n (%) a menos que se especifique lo contrario.

Abreviaciones: CMV, Citomegalovirus; Ci, ciclofosfamida; d, días; EICH, enfermedad de injerto contra huésped; TPH, trasplante de progenitores hematopoyéticos; RIQ, rango intercuartílico; MFM, micofenolato de mofetilo; Rap, rapamicina; Tac, tacrolimus; MRT, mortalidad relacionada con el trasplante.

<sup>a</sup> *Citomegalovirus* (n=2; 1 D+QFpos y 1 D-), *virus JC* (n=1), *Adenovirus* (n=1), *Staphylococcus epidermis* (n=1), *virus Parainfluenza* (n=1), *Aspergillus* (n=1), *Stenotrophomonas maltophilia* (n=1), *Pseudomonas aeruginosa* (n=1), microorganismo no identificado (n=2).

Un total de 54 receptores (66.7%) tuvieron reactivación de CMV (carga viral > 500 UI/mL) y recibieron tratamiento antiviral con valganciclovir o foscarnet. De estos 54 pacientes, 17 (31.5%) experimentaron más de un episodio de replicación y, en estos casos se consideró el número total de días de replicación, como la suma de días de cada uno de los episodios. La mediana de la duración total de los episodios fue de 33 días (RIQ, 21.7-63.7 días). La mediana de la carga viral pico fue de 4845 UI/mL (RIQ, 1545-13800 UI/mL). La mediana de los días que transcurrieron desde el trasplante hasta la replicación de CMV fue de 38 días (RIQ, 29.7-43.0 días). De los 81 pacientes incluidos, 3 tuvieron enfermedad por CMV (neumonía por CMV). La mortalidad relacionada con el trasplante a los 100 días y a los 365 días fue de un 11.1% y 17.3%, respectivamente.

### 6.2.2 Serología CMV e IMC-CMV de los donantes

Primero analizamos la IMC-CMV en los donantes, una vez que comprobamos que todos ellos tenían alelos HLA clase I capaces de unirse a los péptidos de CMV que usa el ensayo del QF-CMV (Tabla Suplementaria S1). Luego determinamos la concordancia entre serología CMV e IMC-CMV para obtener la frecuencia de donantes con discordancia humoral/celular. Todos los donantes CMV-seronegativos (n=14) fueron QFneg. En cuanto a los donantes CMV-seropositivos (D+), 54/67 (80.6%) fueron QFpos (D+QFpos), mientras que 13 (19.4%) tuvieron un resultado QFneg y, por tanto, fueron

considerados donantes discordantes (D+QFneg). Según este criterio, los donantes fueron clasificados en 3 grupos: D+QFpos, D+QFneg y D-. Sólo 2 donantes discordantes (D+QFneg) tenían subpoblación de linfocitos T CD8+ CMV-específicos usando la tecnología de los dextrámeros-HLA (Tabla Suplementaria S2).

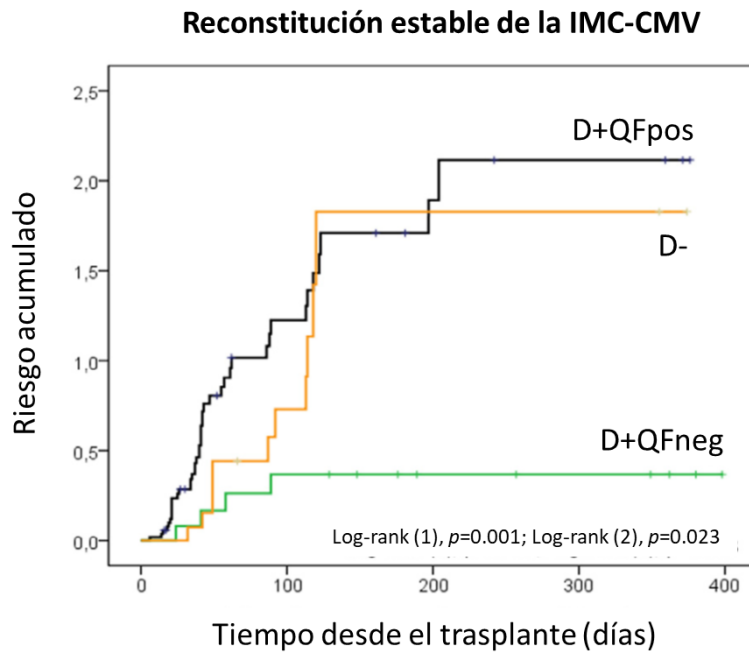
### **6.2.3 Impacto del tipo de donante sobre la reconstitución estable de la IMC-CMV de los receptores después del alo-TPH**

La cinética de la reconstitución de la IMC-CMV después del trasplante siguió un patrón similar en la mayoría de los pacientes. Hubo 67 receptores de los 81 pacientes totales (82.7%) que tuvieron un resultado indeterminado con el ensayo del QF-CMV (QFind) inmediatamente después del trasplante y este resultado se mantuvo durante una mediana de 28 días (RIQ, 23-37 días). Después, la mayoría de ellos, pasaron a ser QFpos o QFneg. El resto de pacientes (17.3%) fueron QFneg o QFpos después del TPH (Tabla Suplementaria S3). Cincuenta y siete pacientes (70.4%) experimentaron reconstitución estable de la IMC-CMV en el período post-trasplante con una mediana de 42 días (RIQ, 29-88.5 días).

Posteriormente, investigamos la relación entre el tipo de donante (D+QFpos, D+QFneg, D-) y la reconstitución de la IMC-CMV en los receptores. Encontramos que la mayoría de los pacientes con donante discordante (D+QFneg) tenían una IMC-CMV indetectable y aquellos en los que se detectaba, la reconstitución de la IMC-CMV era más débil comparada con la de pacientes con donante D+QFpos o D- (test log-rank,  $p=0.001$  y  $p=0.023$ , respectivamente) (Figura 2). Es decir, en el mes +3 post-TPH el 69.2% de los receptores con donante D+QFneg siguieron siendo QFneg en comparación con el 29.4% de los receptores con donante D+QFpos y el 56.3% de los pacientes con D-. En el mes



+6, ningún nuevo receptor con donante discordante pasó a ser QFpos y, en consecuencia, el 69.2% permaneció como QFneg mientras que el 81.4% de los receptores con donante D+QFpos y el 83.9% con donante D- habían logrado una reconstitución estable de la IMC-CMV.



**Figura 2. Curvas de riesgo acumulado de la reconstitución estable de la IMC-CMV según el tipo de donante: D+QFpos, D+QFneg y D-.** La prueba de Log-rank (1) compara el riesgo relativo (RR) entre los pacientes con donantes D+QFneg y los que tuvieron donante D+QFpos. El análisis Log-rank (2) compara el RR entre pacientes con donante D+QFneg y los receptores con donante D-. Un p-valor  $< 0.05$  se consideró estadísticamente significativo

#### 6.2.4 Impacto de la reactivación de CMV en la reconstitución de la IMC-CMV

A continuación, analizamos si la débil reconstitución de la IMC-CMV en pacientes con donante D+QFneg fue resultado de una menor incidencia de reactivación de CMV o menor recurrencia. La incidencia global de reactivación de CMV fue mayor en pacientes con donante D+QFneg comparado con aquellos que tuvieron donante

D+QFpos, a pesar de que no hubo diferencias significativas (76.9% vs. 59.3%;  $p=0.237$ ) (Tabla 2). Con respecto a los receptores con D- no se encontraron diferencias. La carga viral pico, la duración total y el inicio de replicación en los 3 grupos también están descritas en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Cinética de reactivación de CMV (n=54) según el tipo de donante.

PARÁMETROS	D+QFpos (n=54)	D+QFneg (n=13)	D- (n=14)	<sup>a</sup> p-valor	<sup>b</sup> p-valor
Reactivación de CMV, n (%)	32 (59.3)	10 (76.9)	12 (85.7)	0.237	0.648
Inicio de reactivación de CMV, días, mediana (RIQ)	38 (28.2-42.0)	42.5 (36.0-51.7)	34.5 (28.7-42.2)	0.104	0.129
Duración total de episodios CMV, días, mediana (RIQ) <sup>c</sup>	29 (21.2-46.2)	26 (17.7-49.5)	70 (42.2-107.7)	0.515	0.011
Carga viral pico, UI/mL, mediana (RIQ)	4657.5 (1670-13400)	5550 (1477.5-9092.5)	15555 (1435-36550)	0.906	0.210

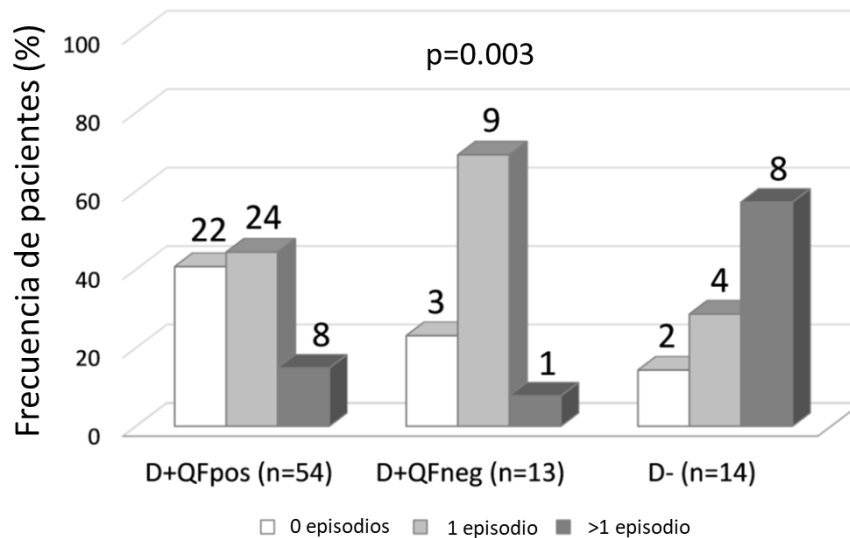
<sup>a</sup> La prueba U de Mann-Whitney fue usada para comparar los receptores con donante D+QFneg y los de donante D+QFpos. Un p-valor < 0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

<sup>b</sup> La prueba U de Mann-Whitney fue usada para comparar los receptores con donante D+QFneg y los de donante D-. Un p-valor < 0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

<sup>c</sup> En pacientes con dos o más episodios de replicación, se consideró el número total de días de replicación como la suma de los días de los diferentes episodios.

Posteriormente, clasificamos los pacientes de acuerdo con el número de episodios de replicación por CMV que habían tenido. Se crearon 3 grupos: pacientes que no habían tenido ningún episodio, los que tuvieron 1 episodio y aquellos con > 1 episodio. Como muestra la Figura 3, los receptores con donante D+QFneg tenían mayor incidencia de un único episodio de reactivación (69.2%) pero sólo un 7.7% tuvieron recurrencia comparado con el 57.1% de recurrencia en pacientes con D- y el 14.8% de aquellos con D+QFpos (test Chi-cuadrado,  $p=0.003$ ). Cuando esta comparación fue repetida sólo en

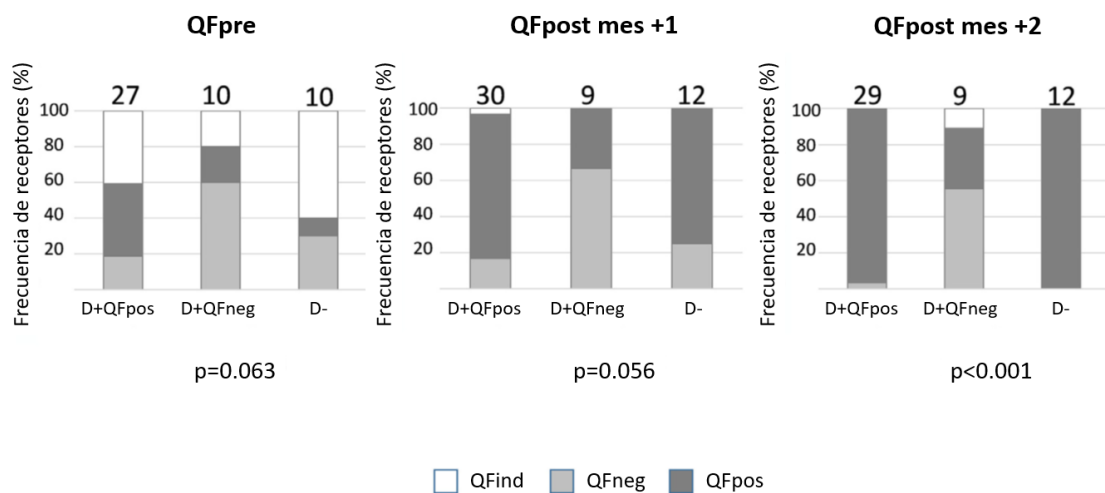
donantes CMV-seropositivos (D+QFneg vs. D+QFpos), las diferencias no fueron significativas ( $p=0.275$ ).



**Figura 3. Comparación de las frecuencias de pacientes sin ningún episodio de replicación, con 1 episodio y con > 1 episodio después del TPH según el tipo de donante: D+QFpos, D+QFneg o D-.** Se indica el número de pacientes en cada categoría. Se utilizó el test Chi-cuadrado. Un p-valor < 0.05 se consideró estadísticamente significativo.

Junto con la incidencia, investigamos si el impacto de reactivación/recurrencia de CMV en la reconstitución de la IMC-CMV diferían entre los 3 subgrupos. Para ello, seleccionamos el resultado cualitativo del QF-CMV en tres puntos diferentes en aquellos pacientes con reactivación de CMV: antes de la reactivación (QFpre; una semana inmediatamente anterior a la reactivación) y dos puntos después de la reactivación (QFpost; un mes y dos meses después de resolver el primer episodio de CMV). Algunos pacientes fueron excluidos para el punto pre-reactivación porque experimentaron reactivación de CMV dentro de las dos primeras semanas post-TPH y, por tanto, no se les

hizo la determinación de la IMC-CMV antes de la replicación del virus. Como se observa en la Figura 4, en la semana anterior a la reactivación del virus, los pacientes con donante discordante eran QFneg (60%) mientras que los pacientes con D- fueron mayoritariamente QFind (60%). Sin embargo, después de la resolución del episodio, los pacientes con donante discordante evolucionaron de forma diferente a los pacientes de los otros dos grupos: más del 90% de los pacientes con D+QFpos y D- (96% y 100%, respectivamente) pasaron a ser QFpos mientras que sólo el 33.3% de los pacientes con D+QFneg fueron QFpos en ese punto. Por tanto, el 55.6% de estos pacientes siguieron siendo QFneg a pesar de la reactivación del virus.



**Figura 4. Cinética de los resultados cualitativos del QF-CMV antes y después de la resolución del primer episodio de CMV según el tipo de donante (D+QFpos, D+QFneg o D-) en pacientes con reactivación de CMV.** Los resultados de la semana previa a la reactivación (QFpre) y al mes +1 y mes +2 después de la resolución del primer episodio de CMV (QFpost mes +1, QFpost mes +2) se muestran por tipo de donante. También se indica el número de receptores en cada categoría. Se utilizó el test Chi-cuadrado. Se consideró estadísticamente significativo un p-valor < 0.05.

¿Y qué ocurrió con los pacientes con donante discordante en el mes +6 post-TPH? En este punto, teníamos datos disponibles del QF-CMV de 10 pacientes con donante D+QFneg, de los cuáles sólo uno de ellos no tuvo reactivación de CMV. Observamos que 6 pacientes se mantuvieron QFneg en este momento e incluso un año después del TPH a pesar de que todos ellos habían experimentado reactivación de CMV (Tabla 3). Cabe destacar que uno de estos pacientes tuvo 4 episodios y se mantuvo QFneg hasta el final del periodo de seguimiento.

**Tabla 3.** Resumen de los parámetros virológicos de los receptores con donantes discordantes (D+QFneg) que presentaron reactivación de CMV. Se muestran los resultados del QF-CMV en el mes +6 y +12 después del TPH.

ID paciente	Inicio de reactivación (días)	Carga viral pico (UI/mL)	Duración total de episodios (días) <sup>a</sup>	QF mes +6 después TPH	QF mes +12 después TPH <sup>b</sup>
HEM-3	42	47045	66	Positivo	Positivo
HEM-41	37	1130	19	Positivo	Positivo
HEM-44	43	1530	32	Positivo	Negativo
HEM-4	47	9220	44	Negativo	-
HEM-13	33	9050	120	Negativo	Negativo
HEM-15	20	6540	39	Negativo	Negativo
HEM-18	48	1320	17	Negativo	Negativo
HEM-20	63	7750	17	Negativo	Negativo
HEM-85	39	4560	18	Negativo	-

<sup>a</sup> En pacientes con dos o más episodios de replicación, se consideró el número total de días de replicación como la suma de los días de los diferentes episodios.

<sup>b</sup> Los pacientes HEM-4 y HEM-85: Fuera del estudio/muerte antes de la visita del mes +12.

### **6.2.5 Factores asociados con la reconstitución estable de la IMC-CMV**

Finalmente, realizamos un análisis multivariante para evaluar el impacto del tipo de donante (D+QFpos, D+QFneg y D-) en la reconstitución estable de la IMC-CMV, teniendo en cuenta otras variables que pueden influir (Tabla 4). Para ello, se llevó a cabo un análisis de regresión de Cox multivariante, en el que se incluyó la variable “Tipo de donante” así como otras variables que pensamos que podían afectar a la reconstitución de la IMC-CMV, aunque no fuesen estadísticamente significativas en el análisis univariante (Tabla Suplementaria S4). El modelo multivariante incluyó la edad del receptor, tipo de donante, uso de esteroides, régimen de acondicionamiento, reactivación de CMV, compatibilidad HLA y la interacción “Reactivación CMV\*Compatibilidad HLA”. Como se muestra en la Tabla 4, los donantes discordantes (D+QFneg) se asociaron de forma independiente con un mayor riesgo de una reconstitución deficiente de la IMC-CMV en comparación con los D+QFpos (RR ajustado, 0.18; IC 95%, 0.06-0.52; p=0.001) y con los donantes D- (RR ajustado, 0.17; IC 95%, 0.05-0.59; p=0.005). Curiosamente, la reactivación de CMV estuvo cerca de la significancia estadística en el análisis multivariante cuando la interacción “Reactivación CMV\*Compatibilidad HLA” fue incluida. La significación estadística de la interacción indica que la reactivación de CMV se asoció con una mayor probabilidad de reconstitución de la IMC-CMV sólo en el caso de los donantes haploidénticos (RR ajustado, 2.44; IC 95%, 0.99-6.00; p=0.051). Los donantes HLA idénticos se asociaron con una mayor probabilidad de reconstitución que los haploidénticos, incluso en ausencia de reactivación de CMV (RR ajustado, 7.63; IC 95%, 2.32-25.09; p=0.001).

**Tabla 4.** Factores de riesgo para la reconstitución estable de la IMC-CMV. Análisis de regresión de Cox multivariante

CARACTERÍSTICAS	Modelo Multivariante	
	RR ajustado (IC 95%)	p-valor
<b>Edad receptor (años)</b>	0.98 (0.96-1.00)	0.076
<b>Tipo de donante<sup>a</sup></b>		0.006
<b>D+QFpos</b>	Referencia	
<b>D+QFneg</b>	0.18 (0.06-0.52)	0.001
<b>D-</b>	1.03 (0.49-2.17)	0.927
<b>Uso de esteroides</b>		
<b>No</b>	Referencia	
<b>Si</b>	0.93 (0.50-1.73)	0.822
<b>Régimen de acondicionamiento</b>		
<b>No mieloablativo</b>	Referencia	
<b>Mieloablativo</b>	1.12 (0.61-2.06)	0.715
<b>Reactivación de CMV<sup>b</sup></b>		
<b>No</b>	Referencia	
<b>Si</b>	2.44 (0.99-6.00)	0.051
<b>Compatibilidad HLA</b>		
<b>Idéntica</b>	7.63 (2.32-25.09)	0.001
<b>Haploidéntica</b>	Referencia	
<b>Reactivación CMV*Compatibilidad HLA<sup>c</sup></b>	0.11 (0.03-0.46)	0.003

<sup>a</sup> Combinación de serología CMV donante e IMC-CMV medida por el ensayo del QuantiFERON-CMV.

<sup>b</sup> Carga viral mayor que 500 UI/mL y tratamiento con terapia antiviral.

<sup>c</sup> Interacción entre reactivación CMV y compatibilidad HLA.

## TABLAS SUPLEMENTARIAS

**Tabla Suplementaria 1.** Listado de alelos HLA-A y HLA-B de los 81 donantes. En rojo, los alelos HLA compatibles con el ensayo del QF-CMV

DONANTES	Alelo A <sub>1</sub>	Alelo A <sub>2</sub>	Alelo B <sub>1</sub>	Alelo B <sub>2</sub>
1	2	3	51	15
2	23	29	35	49
3	2	26	7	44
4	30	32	18	49
5	11	30	15	18
6	23	24	8	18
7	30	2	45	51
8	1	1	37	57
9	25	29	44	51
10	24	31	14	53
11	11	26	35	39
12	2	2	40	41
13	2	3	7	53
14	2	33	14	15
15	26	30	35	49
16	30	68	35	44
17	2	30	18	37
18	1	11	18	35
19	1	2	8	57
20	1	32	14	18
21	2	30	7	44
22	1	11	35	45
23	32	32	27	44
24	3	11	35	38
25	24	29	38	41
26	1	2	44	51
27	1	2	15	57
28	24	68	27	51
29	2	2	7	41
30	2	30	14	58
31	24	26	27	38
32	1	68	40	40
33	1	29	8	8
34	23	30	51	58
35	24	24	7	44
36	1	3	8	49



37	29	2	44	50
38	3	30	18	35
39	11	68	47	35
40	2	29	51	40
41	2	32	35	35
42	2	30	7	18
43	2	29	35	44
44	29	32	50	51
45	1	68	57	57
46	1	30	18	40
47	23	68	7	18
48	1	3	8	35
49	3	11	51	51
50	29	33	14	44
51	11	23	44	52
52	2	30	7	53
53	30	68	7	42
54	2	29	15	49
55	3	11	7	15
56	24	2	52	51
57	11	32	7	53
58	11	24	35	39
59	23	1	51	8
60	2	23	44	44
61	3	33	14	18
62	2	26	38	41
63	2	68	15	44
64	1	29	15	44
65	1	1	49	51
66	1	2	8	44
67	2	24	18	38
68	2	24	35	51
69	1	2	13	18
70	1	30	7	18
71	3	11	14	51
72	1	2	35	44
73	33	34	14	44
74	2	68	49	44
75	2	33	14	44
76	1	3	51	57
77	2	3	40	51
78	3	29	7	44
79	26	30	13	27
80	2	29	35	44
81	2	66	15	35

---

**Tabla Suplementaria 2.** Cuantificación de la subpoblación de células T CD8+ CMV-específica en donantes discordantes (D+QFneg) usando los dextrámeros-HLA.

ID donante	Alelos HLA-A	Alelos HLA-B	Dextrámero usado (HLA-péptido)	Frecuencia de células T CD8+ CMV-específica (%)
<b>HEM-3</b>	A2/A24	B35/B51	HLA-A2-NLVPMVATV	1.55
<b>HEM-4</b>	A2/A30	B14/B58	HLA-A2-NLVPMVATV	0
<b>HEM-13</b>	A25/A29	B44/B51	-	-
<b>HEM-15</b>	A3/A11	B51/B51	-	-
<b>HEM-18</b>	A2/A30	B18/B37	HLA-A2-NLVPMVATV	0
<b>HEM-20</b>	A24/A31	B14/B53	-	-
<b>HEM-38</b>	A32/A32	B27/B44	-	-
<b>HEM-41</b>	A30/A68	B7/B42	HLA-B7-TPRVTGGGAM	0.90
<b>HEM-44</b>	A24/A2	B52/B51	HLA-A2-NLVPMVATV	<sup>a</sup>
<b>HEM-73</b>	A11/A24	B35/B39	HLA-B35-IPSINVHHY	0
<b>HEM-75</b>	A23/A1	B51/B8	HLA-A1-VTEHDTLLY	0
<b>HEM-83</b>	A24/A26	B27/B38	-	-
<b>HEM-85</b>	A11/A30	B15/B18	-	-

<sup>a</sup> Problemas técnicos durante la citometría de flujo.

**Tabla Suplementaria 3.** Resumen de receptores con un resultado diferente de Indeterminado (positivo o negativo) en la 1ª determinación del QF-CMV después del TPH.

ID receptor	1er QF post-TPH	IFNG (UI/mL)
HEM-4	Negativo	0
HEM-6	Positivo	0.7
HEM-11	Negativo	0
HEM-15	Negativo	0
HEM-23	Negativo	0
HEM-43	Negativo	0
HEM-56	Positivo	1.2
HEM-61	Positivo	0.7
HEM-72	Positivo	0.6
HEM-75	Negativo	0
HEM-84	Positivo	90.3
HEM-88	Positivo	133.4
HEM-90	Positivo	43.7
HEM-93	Positivo	0.7

**Tabla Suplementaria 4.** Factores de riesgo para la reconstitución estable de la IMC-CMV. Regresión Univariante de Cox

CARACTERÍSTICAS	Análisis Univariante	
	RR crudo (IC 95%)	p-valor
<b>Edad donante (años)</b>	1.00 (0.99-1.02)	0.710
<b>Edad receptor (años)</b>	0.98 (0.97-1.00)	0.060
<b>Sexo receptor</b>		
<b>Femenino</b>	Referencia	
<b>Masculino</b>	1.53 (0.87-2.69)	0.139
<b>Serología CMV donante</b>		
<b>D-</b>	0.89 (0.46-1.72)	0.729
<b>D+</b>	Referencia	
<b>Tipo de donante<sup>a</sup></b>		0.006
<b>D-</b>	0.66 (0.34-1.28)	0.219
<b>D+ QFneg</b>	0.19 (0.07-0.55)	0.002
<b>D+ QFpos</b>	Referencia	
<b>Reactivación CMV<sup>b</sup></b>		
<b>No</b>	Referencia	
<b>Si</b>	0.89 (0.50-1.60)	0.708
<b>Compatibilidad HLA</b>		
<b>Idéntica</b>	Referencia	
<b>Haploidéntica</b>	0.75 (0.43-1.31)	0.312
<b>Uso de esteroides</b>		
<b>No</b>	Referencia	
<b>Si</b>	0.99 (0.58-1.69)	0.966
<b>EICH</b>		
<b>No</b>	Referencia	
<b>Si</b>	1.40 (0.69-2.87)	0.351
<b>Régimen de acondicionamiento</b>		
<b>No mieloablativo</b>	Referencia	
<b>Mieloablativo</b>	1.63 (0.97-2.75)	0.067
<b>Fuente de progenitores</b>		
<b>Médula ósea</b>	Referencia	
<b>Sangre periférica</b>	0.91 (0.46-1.81)	0.790

<sup>a</sup> Combinación de serología CMV e IMC-CMV medida con el ensayo del QuantiFERON-CMV.

<sup>b</sup> Carga viral mayor que 500 UI/mL y tratamiento con terapia antiviral



## **DISCUSIÓN**



# DISCUSIÓN

## BLOQUE I

---



## 7. DISCUSIÓN

### **Bloque I. La falta de IMC-CMV en voluntarios sanos CMV-seropositivos medida con el ensayo del QuantiFERON-CMV: ¿artefacto o realidad?**

En este estudio se ha evaluado la discordancia inmune humoral/celular frente al CMV en un grupo de voluntarios sanos CMV-seropositivos (V+), midiendo de forma paralela, la IMC-CMV mediante dos técnicas de monitorización inmunológica diferentes, el QF-CMV que mide los niveles de IFNG liberados por linfocitos T CD8+ CMV-específicos usando como estímulo 22 péptidos de CMV y la técnica FASCIA que mide la proliferación linfocitaria usando como estímulo un lisado de CMV. El objetivo principal fue determinar si la discordancia humoral/celular en sujetos sanos CMV-seropositivos es un artefacto relacionado con el tipo de estímulo que utiliza el ensayo del QF-CMV, como sugerían algunos autores (129,130), o si realmente estos sujetos muestran una IMC-CMV deficiente cuando se mide la respuesta celular analizando la capacidad proliferativa de los linfocitos T al utilizar otro tipo de estímulo como es el lisado viral de CMV.

El resultado principal que se puede extraer de este estudio es que los voluntarios sanos discordantes V+QFneg mostraron una respuesta proliferativa de linfocitos T CD4+ y T CD8+ frente a CMV menor que los individuos no discordantes (V+QFpos). Además, en los sujetos discordantes V+QFneg también se observó una menor respuesta humoral, ya que, sus niveles de IgG anti-CMV fueron significativamente menores que en los individuos no discordantes. Todo esto indica que un resultado QFneg en individuos V+, no es un artefacto de la técnica, sino que realmente existen individuos que presenta una

IMC-CMV deficiente a pesar de tener anticuerpos IgG frente al CMV, y que, por tanto, la técnica del QF-CMV es válida para identificar a este subgrupo de individuos discordantes.

En este estudio, utilizando la técnica del QF-CMV para medir la IMC-CMV, se identificaron aproximadamente un 19% de individuos discordantes (incluyendo V+QFneg y V-QFpos) que está en la línea de lo publicado previamente por otros autores donde también miden la IMC-CMV en sujetos sanos (128,130-132). Esta discordancia entre la serología CMV y la IMC-CMV también ha sido descrita en pacientes trasplantados de órgano sólido, en los cuales se ha observado mayor riesgo de reactivación de CMV tras el trasplante (125,127,133,134).

Al medir la respuesta proliferativa, las diferencias entre el grupo de discordantes y no discordantes (V+QFneg vs. V+QFpos) fueron más pronunciadas en los linfocitos T CD4+ que en los CD8+. Además, los individuos discordantes también mostraron unos niveles de IgG anti-CMV más bajos que en los no discordantes, lo que pone de manifiesto que su baja respuesta frente al CMV no se limita sólo a la IMC-CMV sino también a la inmunidad humoral. Una posible explicación que relacionaría directamente la baja respuesta proliferativa de los linfocitos T CD4+ con los bajos niveles de IgG anti-CMV estaría relacionada precisamente con el papel fundamental de los CD4+ en el desarrollo de una respuesta inmune antiviral adecuada. Además de favorecer la proliferación de los CD8+, las células T CD4+ activan los linfocitos B y promueven la producción de inmunoglobulinas IgG de alta afinidad (135,136). De hecho, se ha descrito una correlación entre los linfocitos T CD4+ CMV-específicos y los niveles de IgG anti-CMV (137). Por lo tanto, la baja proliferación de linfocitos T CD4+ en respuesta al lisado de CMV en individuos discordantes podría estar produciendo niveles más bajos de IgG anti-CMV (138).

Cabe destacar que los voluntarios discordantes V+QFneg no sólo tuvieron una menor respuesta proliferativa frente al CMV, sino que además mostraron una baja respuesta celular frente al SEA + SEB. Las enterotoxinas A y B, que actúan como superantígenos, se unen de manera no específica al CMH de clase II, así como al receptor de antígenos de los linfocitos T CD4+, desencadenando una proliferación masiva de células T y la liberación de citoquinas proinflamatorias (139,140). Por tanto, la proliferación significativamente menor de los linfocitos T CD4+ frente al superantígeno en individuos V+QFneg respaldaría el papel de los T CD4+ en la discordancia de individuos V+.

Por otra parte, también se identificaron 5 sujetos que a pesar de ser V- tuvieron un resultado QFpos. Estos individuos fueron clasificados como discordantes V-QFpos. Hay varias posibles explicaciones para estos individuos. En primer lugar, y como ya defendió *Sester et al.* (131), no se puede descartar un falso negativo de la determinación de la IgG anti-CMV, ya que, esta prueba se realizó una única vez por individuo. Sin embargo, es curioso que ninguno de los sujetos V-QFpos tuviera respuesta proliferativa de CD4+ ni CD8+ con el lisado de CMV. Tampoco mostraron una subpoblación de linfocitos T CD8+ CMV-específicos al ser medidos con la tecnología de los dextrámeros. Por tanto, ¿de dónde procede el IFNG que cuantifica el ensayo del QF-CMV? Una posible explicación podría ser que estos individuos estuvieran, en el momento concreto de la determinación de la IgG anti-CMV, cursando una infección aguda por CMV de modo que sólo tendrían elevados niveles de IgM anti-CMV, pero no IgG (131). Sin embargo, el análisis de la IgM específica de CMV fue negativo en estos 5 individuos. Otra posibilidad podría ser que alguna población linfocitaria diferente a las T CD8+, por ejemplo, los linfocitos T CD4+ CMV-específicos, pudieran estar respondiendo a los péptidos del QF-CMV y liberar IFNG, ya que se ha descrito que, aunque de forma poco frecuente, las

células T CD4<sup>+</sup> pueden ser estimuladas por antígenos presentados en moléculas HLA clase I (141). Otras explicaciones alternativas podrían estar relacionadas con la reactividad cruzada de los linfocitos T específicos para otros herpesvirus u otros virus diferentes (142,143).

La limitación principal de este estudio se centra en el ensayo del QuantiFERON-CMV. El QF-CMV es una técnica que mide la IMC-CMV en respuesta a péptidos de CMV diseñados para ser reconocidos por linfocitos T CD8<sup>+</sup> CMV-específicos y presentados por moléculas HLA de clase I que abarcan más del 98% de la población humana. Cabría la posibilidad de que algunos de los individuos discordantes V+QFneg de este estudio pertenecieran a ese 2% con un HLA no compatible con el QF-CMV, de ahí su resultado negativo. Sin embargo, esta limitación fue solventada determinando el tipaje HLA de cada uno de los participantes y comprobando que todos presentaban HLA de clase I compatibles con la técnica del QF-CMV.



# **DISCUSIÓN**

## **BLOQUE II**

---

## 7. DISCUSIÓN

**Bloque II. Análisis del impacto de la discordancia humoral/celular frente a CMV de donantes CMV-seropositivos sobre la reconstitución de la IMC-CMV y en la reactivación del CMV en receptores CMV-seropositivos tras el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.**

En este estudio analizamos el impacto de la ausencia de la IMC-CMV en donantes CMV-seropositivos (D+QFneg) sobre la reconstitución de la IMC-CMV y en la reactivación del CMV en receptores CMV-seropositivos tras el trasplante de progenitores hematopoyéticos. La frecuencia del 20% de donantes discordantes D+QFneg observada en este trabajo está en línea con los hallazgos informados previamente en sujetos sanos, tanto por nuestro grupo como por otros investigadores (128,131,132). Al igual que describió *Yao et al.* observamos que la mayoría de los donantes discordantes D+QFneg carecen de subpoblación de linfocitos T CD8+ CMV-específicos al ser analizada con los dextrámeros (144). Sin embargo, unos pocos donantes D+QFneg mostraron una población positiva cuando se usó esta tecnología, a pesar de que estas células no liberaron IFNG tras ser estimuladas con los péptidos del QF-CMV. Una explicación podría ser que la subpoblación T CD8+ CMV-específica detectada con los dextrámeros en estos donantes D+QFneg estuviera constituida por células disfuncionales incapaces de liberar IFNG. En este sentido, *Altaf et al.* tampoco encontraron diferencias significativas en el número de células cuantificadas por los multímeros al comparar un grupo de trasplantados pulmonares CMV-seropositivos discordantes con uno de no discordantes (145).

La cinética de reconstitución de la IMC-CMV en los pacientes incluidos en el estudio fue muy heterogénea, aunque la mayoría de ellos fueron QF<sub>ind</sub> en el mes +1 post-trasplante y posteriormente pasaron a ser QF<sub>pos</sub>. Estos resultados coinciden con lo ya publicado por *Tey et al.* también en una cohorte de pacientes TPH (146). Sin embargo, en nuestro estudio se observó que la mayoría de los receptores con donante discordante D+QF<sub>neg</sub> mostraban una incapacidad para reconstituir la IMC-CMV, incluso en aquellos pacientes que presentaron reactivación de CMV. Por lo tanto, mientras que más del 90% de los pacientes con reactivación de CMV con donantes D+QF<sub>pos</sub> o D- se convirtieron en QF<sub>pos</sub> en los 2 meses posteriores a la resolución del primer episodio de replicación, los pacientes con donantes D+QF<sub>neg</sub> siguieron siendo en su mayoría QF<sub>neg</sub>. Sin embargo, lo esperable sería que estos pacientes adquiriesen la IMC-CMV después del episodio de replicación, dado que es bien sabido que la reactivación de CMV post-trasplante favorece la reconstitución de la IMC-CMV (65,147,148).

El impacto del tipo de donante y la reactivación de CMV analizados mediante un modelo multivariante reveló que ambas variables se asociaron de forma independiente con la probabilidad de reconstitución de la IMC-CMV de los pacientes. Así, los receptores con donante D+QF<sub>neg</sub> mostraron mayor riesgo de reconstitución deficiente de la IMC-CMV. Por el contrario, la reactivación de CMV aumentó la probabilidad de reconstitución de la IMC-CMV, aunque sólo en el caso de los haploidénticos.

Esta incapacidad de los pacientes con donante discordante D+QF<sub>neg</sub> para convertirse en QF<sub>pos</sub> persistió durante todo el período de seguimiento. Pero ¿por qué los receptores con donante D- logran una mayor tasa de reconstitución de la IMC-CMV que los receptores de donante D+QF<sub>neg</sub>, si ambos grupos de donantes carecen de respuesta T CD8+ CMV-específica? Una posible explicación podría estar en la elevada incidencia de recurrencia de CMV que cursaron los receptores de donante D- con aproximadamente el



60% de los pacientes con más de un episodio comparado con los receptores de donante discordante, entre los cuales sólo uno de ellos sufrió más de un episodio de reactivación. En este sentido, podríamos pensar que un único episodio de replicación no es suficiente como para desencadenar la respuesta T CD8+ CMV-específica en los pacientes con donante D+QFneg. Sin embargo, esta explicación contrasta con la publicada por *Borchers et al.* quienes encontraron que la población de células T CD8+ CMV-específicas se expandió más en pacientes que experimentaron un solo episodio de reactivación de CMV en comparación con aquellos que no tuvieron reactivación o aquellos con múltiples reactivaciones (149). En nuestro estudio, el único paciente con donante discordante que experimentó infección persistente por CMV (4 episodios de CMV) tampoco reconstituyó la IMC-CMV a pesar de los múltiples episodios de replicación que sufrió durante los 12 meses de seguimiento (150,151).

Otra opción plausible para explicar la incapacidad de los receptores de donante D+QFneg para reconstituir IMC-CMV podría estar relacionada con la disfunción de la respuesta T CMV-específica de sus propios donantes. En el trabajo del bloque I, encontramos que los linfocitos T CD4+ y CD8+ de los voluntarios sanos discordantes (V+QFneg) mostraron una menor proliferación en respuesta al lisado viral de CMV comparado con los sujetos no discordantes (V+QFpos). En esta línea, *Altaf et al.* describieron que la expresión en la superficie de los linfocitos T de CD49d, una integrina relacionada con la activación de las células T CD4+, estaba significativamente reducida en pacientes trasplantados de pulmón CMV-seropositivos discordantes comparada con los no discordantes (145,152). Por tanto, podríamos especular con que una baja expresión de CD49d en las células T de los donantes D+QFneg podría estar detrás de la menor funcionalidad de los linfocitos T CMV-específicos en los receptores después del TPH (153).

La principal limitación de este estudio es el bajo número de donantes discordantes D+QFneg y D- que se consiguieron reclutar, lo que nos impidió realizar análisis estadísticos más precisos. En este sentido, la falta de significación estadística por ejemplo en la incidencia de reactivación del CMV al comparar receptores de donantes D+QFneg con receptores de donantes D+QFpos podría estar relacionada precisamente con el bajo número de donantes D+QFneg incluidos. Se necesitan, por tanto, estudios más amplios para monitorizar la IMC-CMV y la reactivación del CMV en receptores CMV-seropositivos de donantes D+QFneg. Si los resultados se confirmasen, se debería considerar a los receptores CMV-seropositivos de donantes D+QFneg un grupo de mayor riesgo que los que tienen donantes D+QFpos.



## **CONCLUSIONES**



## 8. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se pueden extraer del trabajo realizado se enumeran a continuación:

1. Los voluntarios sanos CMV-seropositivos con discordancia humoral/celular frente al CMV (V+QFneg) muestran una IMC-CMV deficiente en comparación con los individuos CMV-seropositivos no discordantes (V+QFpos), no sólo en la liberación de IFNG sino también en la respuesta proliferativa y humoral.
2. El resultado negativo del QF-CMV en los sujetos sanos CMV-seropositivos no es debido a un artefacto de la técnica sino a una menor IMC-CMV de estos individuos.
3. Los receptores alo-TPH de donantes discordantes D+QFneg tienen menor probabilidad de reconstitución estable de la IMC-CMV durante los 12 meses del período de seguimiento que los receptores de donantes D+QFpos o D-. Esta incapacidad para desarrollar una reconstitución estable de los linfocitos T CD8+ CMV-específicos se mantiene incluso tras la reactivación del CMV.
4. El análisis de la IMC-CMV del donante, junto con la serología CMV, podría ser de utilidad para hacer una mejor clasificación de los donantes de progenitores hematopoyéticos, así como de los pacientes con mayor riesgo de reactivación de CMV tras el alo-TPH.



## **BIBLIOGRAFÍA**





## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Boeckh M, Geballe AP. Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *J Clin Invest.* 2011 May;121(5):1673-80. doi: 10.1172/JCI45449. PMID: 21659716; PMCID: PMC3083799.
2. Butcher SJ, Aitken J, Mitchell J, Gowen B, Dargan DJ. Structure of the human cytomegalovirus B capsid by electron cryomicroscopy and image reconstruction. *J Struct Biol.* 1998 Dec 1;124(1):70-6. doi: 10.1006/jsbi.1998.4055. PMID: 9931275.
3. El Chaer F, Shah DP, Chemaly RF. How I treat resistant cytomegalovirus infection in hematopoietic cell transplantation recipients. *Blood.* 2016 Dec 8;128(23):2624-2636. doi: 10.1182/blood-2016-06-688432. Epub 2016 Oct 19. PMID: 27760756; PMCID: PMC5146744.
4. Bunde T, Kirchner A, Hoffmeister B, Habedank D, Hetzer R, Cherepnev G, Proesch S, Reinke P, Volk HD, Lehmkühl H, Kern F. Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific CD8 T cells. *J Exp Med.* 2005 Apr 4;201(7):1031-6. doi: 10.1084/jem.20042384. Epub 2005 Mar 28. PMID: 15795239; PMCID: PMC2213133.
5. Theiler RN, Compton T. Characterization of the signal peptide processing and membrane association of human cytomegalovirus glycoprotein O. *J Biol Chem.* 2001 Oct 19;276(42):39226-31. doi: 10.1074/jbc.M106300200. Epub 2001 Aug 14. PMID: 11504733.
6. Isaacson MK, Juckem LK, Compton T. Virus entry and innate immune activation. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008;325:85-100. doi: 10.1007/978-3-540-77349-8\_5. PMID: 18637501.
7. Compton T. Receptors and immune sensors: the complex entry path of human cytomegalovirus. *Trends Cell Biol.* 2004 Jan;14(1):5-8. doi: 10.1016/j.tcb.2003.10.009. PMID: 14729174.

8. Britt WJ, Mach M. Human cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirology*. 1996;39(5-6):401-12. doi: 10.1159/000150510. PMID: 9130049.
9. Jean Beltran PM, Cristea IM. The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: lessons from proteomics. *Expert Rev Proteomics*. 2014 Dec;11(6):697-711. doi: 10.1586/14789450.2014.971116. Epub 2014 Oct 18. PMID: 25327590; PMCID: PMC4604749.
10. Kalejta RF. Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2008 Jun;72(2):249-65, table of contents. doi: 10.1128/MMBR.00040-07. PMID: 18535146; PMCID: PMC2415745.
11. McCormick AL, Mocarski ES. The immunological underpinnings of vaccinations to prevent cytomegalovirus disease. *Cell Mol Immunol*. 2015 Mar;12(2):170-9. doi: 10.1038/cmi.2014.120. Epub 2014 Dec 29. PMID: 25544503; PMCID: PMC4654290.
12. Sinclair J. Human cytomegalovirus: Latency and reactivation in the myeloid lineage. *J Clin Virol*. 2008 Mar;41(3):180-5. doi: 10.1016/j.jcv.2007.11.014. PMID: 18164651.
13. Gkrania-Klotsas E, Langenberg C, Sharp SJ, Luben R, Khaw KT, Wareham NJ. Seropositivity and higher immunoglobulin g antibody levels against cytomegalovirus are associated with mortality in the population-based European prospective investigation of Cancer-Norfolk cohort. *Clin Infect Dis*. 2013 May;56(10):1421-7. doi: 10.1093/cid/cit083. Epub 2013 Feb 26. PMID: 23442763; PMCID: PMC3634310.
14. Staras SA, Dollard SC, Radford KW, Flanders WD, Pass RF, Cannon MJ. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. *Clin Infect Dis*. 2006 Nov 1;43(9):1143-51. doi: 10.1086/508173. Epub 2006 Oct 2. PMID: 17029132.
15. Emery VC. Cytomegalovirus: recent progress in understanding pathogenesis and control. *QJM*. 2012 May;105(5):401-5. doi: 10.1093/qjmed/hcr262. Epub 2011 Dec 22. PMID: 22198913; PMCID: PMC3328974.

16. Boeckh M, Nichols WG. The impact of cytomegalovirus serostatus of donor and recipient before hematopoietic stem cell transplantation in the era of antiviral prophylaxis and preemptive therapy. *Blood*. 2004 Mar 15;103(6):2003-8. doi: 10.1182/blood-2003-10-3616. Epub 2003 Nov 26. PMID: 14644993.
17. Atabani SF, Smith C, Atkinson C, Aldridge RW, Rodriguez-Perálvarez M, Rolando N, Harber M, Jones G, O'Riordan A, Burroughs AK, Thorburn D, O'Beirne J, Milne RS, Emery VC, Griffiths PD. Cytomegalovirus replication kinetics in solid organ transplant recipients managed by preemptive therapy. *Am J Transplant*. 2012 Sep;12(9):2457-64. doi: 10.1111/j.1600-6143.2012.04087.x. Epub 2012 May 17. PMID: 22594993; PMCID: PMC3510308.
18. Gandhi MK, Khanna R. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *Lancet Infect Dis*. 2004 Dec;4(12):725-38. doi: 10.1016/S1473-3099(04)01202-2. PMID: 15567122.
19. Limaye AP, Boeckh M. CMV in critically ill patients: pathogen or bystander? *Rev Med Virol*. 2010 Nov;20(6):372-9. doi: 10.1002/rmv.664. PMID: 20931610; PMCID: PMC2987685.
20. McLaughlin K, Wu C, Fick G, Muirhead N, Hollomby D, Jevnikar A. Cytomegalovirus seromismatching increases the risk of acute renal allograft rejection. *Transplantation*. 2002 Sep 27;74(6):813-6. doi: 10.1097/00007890-200209270-00014. PMID: 12364861.
21. Sagedal S, Nordal KP, Hartmann A, Sund S, Scott H, Degré M, Foss A, Leivestad T, Osnes K, Fauchald P, Rollag H. The impact of cytomegalovirus infection and disease on rejection episodes in renal allograft recipients. *Am J Transplant*. 2002 Oct;2(9):850-6. doi: 10.1034/j.1600-6143.2002.20907.x. PMID: 12392291.
22. Evans PC, Soin A, Wreghitt TG, Taylor CJ, Wight DG, Alexander GJ. An association between cytomegalovirus infection and chronic rejection after liver transplantation. *Transplantation*. 2000 Jan 15;69(1):30-5. doi: 10.1097/00007890-200001150-00007. PMID: 10653376.
23. Blanco-Lobo P, Bulnes-Ramos Á, McConnell MJ, Navarro D, Pérez-Romero P. Applying lessons learned from cytomegalovirus infection in transplant patients to

- vaccine design. *Drug Discov Today*. 2016 Apr;21(4):674-81. doi: 10.1016/j.drudis.2016.03.005. Epub 2016 Mar 11. PMID: 26976691.
24. Thomas ED, Lochte HL Jr, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med*. 1957 Sep 12;257(11):491-6. doi: 10.1056/NEJM195709122571102. PMID: 13464965.
  25. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, Basak GW, Bonini C, Duarte R, Dufour C, Kröger N, Kuball J, Lankester A, Montoto S, Nagler A, Snowden JA, Styczynski J, Mohty M; European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). Is the use of unrelated donor transplantation leveling off in Europe? The 2016 European Society for Blood and Marrow Transplant activity survey report. *Bone Marrow Transplant*. 2018 Sep;53(9):1139-1148. doi: 10.1038/s41409-018-0153-1. Epub 2018 Mar 14. PMID: 29540849; PMCID: PMC6128821.
  26. Kekre N, Antin JH. Hematopoietic stem cell transplantation donor sources in the 21st century: choosing the ideal donor when a perfect match does not exist. *Blood*. 2014 Jul 17;124(3):334-43. doi: 10.1182/blood-2014-02-514760. Epub 2014 Jun 9. Erratum in: *Blood*. 2015 Feb 5;125(6):1048. PMID: 24914138.
  27. Ringdén O, Labopin M, Ciceri F, Velardi A, Bacigalupo A, Arcese W, Ghavamzadeh A, Hamladji RM, Schmid C, Nagler A, Mohty M. Is there a stronger graft-versus-leukemia effect using HLA-haploidentical donors compared with HLA-identical siblings? *Leukemia*. 2016 Feb;30(2):447-55. doi: 10.1038/leu.2015.232. Epub 2015 Aug 21. PMID: 26293645.
  28. Jethava YS, Sica S, Savani B, Socola F, Jagasia M, Mohty M, Nagler A, Bacigalupo A. Conditioning regimens for allogeneic hematopoietic stem cell transplants in acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 2017 Nov;52(11):1504-1511. doi: 10.1038/bmt.2017.83. Epub 2017 May 15. PMID: 28504666.
  29. Anasetti C, Logan BR, Lee SJ, Waller EK, Weisdorf DJ, Wingard JR, Cutler CS, Westervelt P, Woolfrey A, Couban S, Ehninger G, Johnston L, Maziarz RT, Pulsipher MA, Porter DL, Mineishi S, McCarty JM, Khan SP, Anderlini P, Bensinger WI, Leitman SF, Rowley SD, Bredeson C, Carter SL, Horowitz MM, Confer DL; Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network. Peripheral-

- blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors. *N Engl J Med*. 2012 Oct 18;367(16):1487-96. doi: 10.1056/NEJMoa1203517. PMID: 23075175; PMCID: PMC3816375.
30. Bensinger WI, Martin PJ, Storer B, Clift R, Forman SJ, Negrin R, Kashyap A, Flowers ME, Lilleby K, Chauncey TR, Storb R, Appelbaum FR. Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers. *N Engl J Med*. 2001 Jan 18;344(3):175-81. doi: 10.1056/NEJM200101183440303. PMID: 11172139.
  31. Komanduri KV, St John LS, de Lima M, McMannis J, Rosinski S, McNiece I, Bryan SG, Kaur I, Martin S, Wieder ED, Worth L, Cooper LJ, Petropoulos D, Molldrem JJ, Champlin RE, Shpall EJ. Delayed immune reconstitution after cord blood transplantation is characterized by impaired thymopoiesis and late memory T-cell skewing. *Blood*. 2007 Dec 15;110(13):4543-51. doi: 10.1182/blood-2007-05-092130. Epub 2007 Aug 1. PMID: 17671230; PMCID: PMC2234787.
  32. Granata A, Fürst S, Bramanti S, Legrand F, Sarina B, Harbi S, De Philippis C, Faucher C, Chabannon C, Lemarie C, Calmels B, Mariotti J, Maisano V, Weiller PJ, Mokart D, Vey N, Bouabdallah R, Castagna L, Blaise D, Devillier R. Peripheral blood stem cell for haploidentical transplantation with post-transplant high dose cyclophosphamide: detailed analysis of 181 consecutive patients. *Bone Marrow Transplant*. 2019 Nov;54(11):1730-1737. doi: 10.1038/s41409-019-0500-x. Epub 2019 Mar 19. PMID: 30890770.
  33. Ogonek J, Kralj Juric M, Ghimire S, Varanasi PR, Holler E, Greinix H, Weissinger E. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*. 2016 Nov 17;7:507. doi: 10.3389/fimmu.2016.00507. PMID: 27909435; PMCID: PMC5112259.
  34. Elfeky R, Lazareva A, Qasim W, Veys P. Immune reconstitution following hematopoietic stem cell transplantation using different stem cell sources. *Expert Rev Clin Immunol*. 2019 Jul;15(7):735-751. doi: 10.1080/1744666X.2019.1612746. Epub 2019 May 9. PMID: 31070946.

35. Charrier E, Cordeiro P, Brito RM, Mezziani S, Herblot S, Le Deist F, Duval M. Reconstitution of maturing and regulatory lymphocyte subsets after cord blood and BMT in children. *Bone Marrow Transplant.* 2013 Mar;48(3):376-82. doi: 10.1038/bmt.2012.176. Epub 2012 Oct 15. PMID: 23064038.
36. Weinberg K, Blazar BR, Wagner JE, Agura E, Hill BJ, Smogorzewska M, Koup RA, Betts MR, Collins RH, Douek DC. Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2001 Mar 1;97(5):1458-66. doi: 10.1182/blood.v97.5.1458. PMID: 11222394.
37. Storek J, Dawson MA, Storer B, Stevens-Ayers T, Maloney DG, Marr KA, Witherspoon RP, Bensinger W, Flowers ME, Martin P, Storb R, Appelbaum FR, Boeckh M. Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood.* 2001 Jun 1;97(11):3380-9. doi: 10.1182/blood.v97.11.3380. PMID: 11369627.
38. Jacobson CA, Turki AT, McDonough SM, Stevenson KE, Kim HT, Kao G, Herrera MI, Reynolds CG, Alyea EP, Ho VT, Koreth J, Armand P, Chen YB, Ballen K, Soiffer RJ, Antin JH, Cutler CS, Ritz J. Immune reconstitution after double umbilical cord blood stem cell transplantation: comparison with unrelated peripheral blood stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012 Apr;18(4):565-74. doi: 10.1016/j.bbmt.2011.08.018. Epub 2011 Aug 26. PMID: 21875503; PMCID: PMC3288552.
39. Hauri-Hohl MM, Keller MP, Gill J, Hafen K, Pachlatko E, Boulay T, Peter A, Holländer GA, Krenger W. Donor T-cell alloreactivity against host thymic epithelium limits T-cell development after bone marrow transplantation. *Blood.* 2007 May 1;109(9):4080-8. doi: 10.1182/blood-2006-07-034157. Epub 2007 Jan 9. PMID: 17213290; PMCID: PMC1874583.
40. Danby R, Rocha V. Improving engraftment and immune reconstitution in umbilical cord blood transplantation. *Front Immunol.* 2014 Feb 24;5:68. doi: 10.3389/fimmu.2014.00068. PMID: 24605111; PMCID: PMC3932655.
41. Seggewiss R, Einsele H. Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood.* 2010 May

- 13;115(19):3861-8. doi: 10.1182/blood-2009-12-234096. Epub 2010 Mar 9. PMID: 20215642.
42. Storek J. Immunological reconstitution after hematopoietic cell transplantation - its relation to the contents of the graft. *Expert Opin Biol Ther*. 2008 May;8(5):583-97. doi: 10.1517/14712598.8.5.583. PMID: 18407763.
43. Cornelissen J (2004) Hematopoietic reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. In: Atkinson KA, Champlin R, Ritz J, Fibbe WE, Ljungman P, Brenner MK (eds) *Clinical bone marrow and blood stem cell transplantation*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 160–19.
44. Nakata K, Gotoh H, Watanabe J, Uetake T, Komuro I, Yuasa K, Watanabe S, Ieki R, Sakamaki H, Akiyama H, Kudoh S, Naitoh M, Satoh H, Shimada K. Augmented proliferation of human alveolar macrophages after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 1999 Jan 15;93(2):667-73. PMID: 9885229.
45. Schoemans H, Theunissen K, Maertens J, Boogaerts M, Verfaillie C, Wagner J. Adult umbilical cord blood transplantation: a comprehensive review. *Bone Marrow Transplant*. 2006 Jul;38(2):83-93. doi: 10.1038/sj.bmt.1705403. Epub 2006 Jun 5. PMID: 16751788.
46. Bensinger WI, Clift R, Martin P, Appelbaum FR, Demirer T, Gooley T, Lilleby K, Rowley S, Sanders J, Storb R, Buckner CD. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation in patients with advanced hematologic malignancies: a retrospective comparison with marrow transplantation. *Blood*. 1996 Oct 1;88(7):2794-800. PMID: 8839878.
47. Terakura S, Azuma E, Murata M, Kumamoto T, Hirayama M, Atsuta Y, Kodera Y, Yazaki M, Naoe T, Kato K. Hematopoietic engraftment in recipients of unrelated donor umbilical cord blood is affected by the CD34+ and CD8+ cell doses. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007 Jul;13(7):822-30. doi: 10.1016/j.bbmt.2007.03.006. Epub 2007 Apr 30. PMID: 17580260.
48. Keever-Taylor CA, Klein JP, Eastwood D, Bredeson C, Margolis DA, Burns WH, Vesole DH. Factors affecting neutrophil and platelet reconstitution following T cell-depleted bone marrow transplantation: differential effects of growth factor type



- and role of CD34(+) cell dose. *Bone Marrow Transplant.* 2001 Apr;27(8):791-800. doi: 10.1038/sj.bmt.1702872. PMID: 11477435.
49. Auffermann-Gretzinger S, Lossos IS, Vayntrub TA, Leong W, Grumet FC, Blume KG, Stockerl-Goldstein KE, Levy R, Shizuru JA. Rapid establishment of dendritic cell chimerism in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Blood.* 2002 Feb 15;99(4):1442-8. doi: 10.1182/blood.v99.4.1442. PMID: 11830498.
  50. Klanginsirikul P, Carter GI, Byrne JL, Hale G, Russell NH. Campath-1G causes rapid depletion of circulating host dendritic cells (DCs) before allogeneic transplantation but does not delay donor DC reconstitution. *Blood.* 2002 Apr 1;99(7):2586-91. doi: 10.1182/blood.v99.7.2586. PMID: 11895797.
  51. Chklovskaja E, Nowbakht P, Nissen C, Gratwohl A, Bargetzi M, Wodnar-Filipowicz A. Reconstitution of dendritic and natural killer-cell subsets after allogeneic stem cell transplantation: effects of endogenous flt3 ligand. *Blood.* 2004 May 15;103(10):3860-8. doi: 10.1182/blood-2003-04-1200. Epub 2004 Feb 5. PMID: 14764540.
  52. Kim DH, Sohn SK, Lee NY, Baek JH, Kim JG, Won DI, Suh JS, Lee KB, Shin IH. Transplantation with higher dose of natural killer cells associated with better outcomes in terms of non-relapse mortality and infectious events after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation from HLA-matched sibling donors. *Eur J Haematol.* 2005 Oct;75(4):299-308. doi: 10.1111/j.1600-0609.2005.00514.x. PMID: 16146536.
  53. Hebart H, Daginek S, Stevanovic S, Grigoleit U, Dobler A, Baur M, Rauser G, Sinzger C, Jahn G, Loeffler J, Kanz L, Rammensee HG, Einsele H. Sensitive detection of human cytomegalovirus peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by interferon-gamma-enzyme-linked immunospot assay and flow cytometry in healthy individuals and in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Blood.* 2002 May 15;99(10):3830-7. doi: 10.1182/blood.v99.10.3830. PMID: 11986243.
  54. Marshall NA, Howe JG, Formica R, Krause D, Wagner JE, Berliner N, Crouch J, Pilip I, Cooper D, Blazar BR, Seropian S, Pamer EG. Rapid reconstitution of

- Epstein-Barr virus-specific T lymphocytes following allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2000 Oct 15;96(8):2814-21. PMID: 11023516.
55. Cwynarski K, Ainsworth J, Cobbold M, Wagner S, Mahendra P, Apperley J, Goldman J, Craddock C, Moss PA. Direct visualization of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2001 Mar 1;97(5):1232-40. doi: 10.1182/blood.v97.5.1232. PMID: 11222365.
56. Heining C, Spyridonidis A, Bernhardt E, Schulte-Mönting J, Behringer D, Grüllich C, Jakob A, Bertz H, Finke J. Lymphocyte reconstitution following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective study including 148 patients. *Bone Marrow Transplant*. 2007 May;39(10):613-22. doi: 10.1038/sj.bmt.1705648. Epub 2007 Mar 26. PMID: 17384658.
57. Avanzini MA, Locatelli F, Dos Santos C, Maccario R, Lenta E, Oliveri M, Giebel S, De Stefano P, Rossi F, Giorgiani G, Amendola G, Telli S, Marconi M. B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation: functional immaturity and slow recovery of memory CD27+ B cells. *Exp Hematol*. 2005 Apr;33(4):480-6. doi: 10.1016/j.exphem.2005.01.005. PMID: 15781339.
58. Boeckh M, Leisenring W, Riddell SR, Bowden RA, Huang ML, Myerson D, Stevens-Ayers T, Flowers ME, Cunningham T, Corey L. Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity. *Blood*. 2003 Jan 15;101(2):407-14. doi: 10.1182/blood-2002-03-0993. Epub 2002 Sep 12. PMID: 12393659.
59. Camargo JF, Komanduri KV. Emerging concepts in cytomegalovirus infection following hematopoietic stem cell transplantation. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2017 Dec;10(4):233-238. doi: 10.1016/j.hemonc.2017.05.001. Epub 2017 Jun 14. PMID: 28641094.
60. Ozdemir E, St John LS, Gillespie G, Rowland-Jones S, Champlin RE, Molldrem JJ, Komanduri KV. Cytomegalovirus reactivation following allogeneic stem cell transplantation is associated with the presence of dysfunctional antigen-specific

- CD8+ T cells. *Blood*. 2002 Nov 15;100(10):3690-7. doi: 10.1182/blood-2002-05-1387. Epub 2002 Jul 5. PMID: 12393402.
61. Kim TK, St John LS, Wieder ED, Khalili J, Ma Q, Komanduri KV. Human late memory CD8+ T cells have a distinct cytokine signature characterized by CC chemokine production without IL-2 production. *J Immunol*. 2009 Nov 15;183(10):6167-74. doi: 10.4049/jimmunol.0902068. Epub 2009 Oct 19. PMID: 19841187.
  62. Muñoz-Cobo B, Giménez E, Solano C, de la Cámara R, Nieto J, López J, Amat P, Garcia-Noblejas A, Navarro D. An evaluation of the role of NKG2C+ natural killer cells in protection from cytomegalovirus DNAemia early following allogeneic stem cell transplantation. *J Med Virol*. 2014 May;86(5):806-11. doi: 10.1002/jmv.23742. Epub 2013 Sep 16. PMID: 24105728.
  63. Eid AJ, Brown RA, Hogan WJ, Lahr BD, Eckel-Passow JE, Litzow MR, Razonable RR. Kinetics of interferon-gamma producing cytomegalovirus (CMV)-specific CD4+ and CD8+ T lymphocytes and the risk of subsequent CMV viremia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis*. 2009 Dec;11(6):519-28. doi: 10.1111/j.1399-3062.2009.00446.x. Epub 2009 Sep 9. PMID: 19744286.
  64. Zamora D, Duke ER, Xie H, Edmison BC, Akoto B, Kiener R, Stevens-Ayers T, Wagner R, Mielcarek M, Leisenring WM, Jerome KR, Schiffer JT, Finak G, De Rosa SC, Boeckh M. Cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution following letermovir prophylaxis after hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2021 Jul 8;138(1):34-43. doi: 10.1182/blood.2020009396. PMID: 33657225; PMCID: PMC8493975.
  65. Hakki M, Riddell SR, Storek J, Carter RA, Stevens-Ayers T, Sudour P, White K, Corey L, Boeckh M. Immune reconstitution to cytomegalovirus after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: impact of host factors, drug therapy, and subclinical reactivation. *Blood*. 2003 Oct 15;102(8):3060-7. doi: 10.1182/blood-2002-11-3472. Epub 2003 Jul 3. PMID: 12843000.

66. Lilleri D, Fornara C, Chiesa A, Caldera D, Alessandrino EP, Gerna G. Human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T-cell reconstitution in adult allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients and immune control of viral infection. *Haematologica*. 2008 Feb;93(2):248-56. doi: 10.3324/haematol.11912. PMID: 18245650.
67. Tormo N, Solano C, Benet I, Clari MA, Nieto J, de la Cámara R, López J, López-Aldeguer N, Hernández-Boluda JC, Remigia MJ, Garcia-Noblejas A, Gimeno C, Navarro D. Lack of prompt expansion of cytomegalovirus pp65 and IE-1-specific IFN $\gamma$  CD8+ and CD4+ T cells is associated with rising levels of pp65 antigenemia and DNAemia during pre-emptive therapy in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2010 Mar;45(3):543-9. doi: 10.1038/bmt.2009.172. Epub 2009 Jul 20. PMID: 19617905.
68. Ljungman P, Hakki M, Boeckh M. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2011 Feb;25(1):151-69. doi: 10.1016/j.hoc.2010.11.011. PMID: 21236396; PMCID: PMC3340426.
69. Pourgheysari B, Piper KP, McLarnon A, Arrazi J, Bruton R, Clark F, Cook M, Mahendra P, Craddock C, Moss PA. Early reconstitution of effector memory CD4+ CMV-specific T cells protects against CMV reactivation following allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2009 Jun;43(11):853-61. doi: 10.1038/bmt.2008.403. Epub 2008 Dec 22. PMID: 19104497.
70. Mehta RS, Rezvani K. Immune reconstitution post allogeneic transplant and the impact of immune recovery on the risk of infection. *Virulence*. 2016 Nov 16;7(8):901-916. doi: 10.1080/21505594.2016.1208866. Epub 2016 Jul 6. PMID: 27385018; PMCID: PMC5160395.
71. Young JH, Logan BR, Wu J, Wingard JR, Weisdorf DJ, Mudrick C, Knust K, Horowitz MM, Confer DL, Dubberke ER, Pergam SA, Marty FM, Strasfeld LM, Brown JWM, Langston AA, Schuster MG, Kaul DR, Martin SI, Anasetti C; Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network Trial 0201. Infections after Transplantation of Bone Marrow or Peripheral Blood Stem Cells from Unrelated Donors. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 Feb;22(2):359-370. doi:

- 10.1016/j.bbmt.2015.09.013. Epub 2015 Sep 25. PMID: 26409243; PMCID: PMC4716871.
72. Boeckh M, Ljungman P. How we treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood*. 2009 Jun 4;113(23):5711-9. doi: 10.1182/blood-2008-10-143560. Epub 2009 Mar 18. PMID: 19299333; PMCID: PMC2700312.
73. Buyck HC, Griffiths PD, Emery VC. Human cytomegalovirus (HCMV) replication kinetics in stem cell transplant recipients following anti-HCMV therapy. *J Clin Virol*. 2010 Sep;49(1):32-6. doi: 10.1016/j.jcv.2010.06.018. Epub 2010 Jul 27. PMID: 20667769.
74. Zaia JA, Gallez-Hawkins GM, Tegtmeier BR, ter Veer A, Li X, Niland JC, Forman SJ. Late cytomegalovirus disease in marrow transplantation is predicted by virus load in plasma. *J Infect Dis*. 1997 Sep;176(3):782-5. doi: 10.1086/517301. PMID: 9291333.
75. Nguyen Q, Champlin R, Giralt S, Rolston K, Raad I, Jacobson K, Ippoliti C, Hecht D, Tarrand J, Luna M, Whimbey E. Late cytomegalovirus pneumonia in adult allogeneic blood and marrow transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 1999 Mar;28(3):618-23. doi: 10.1086/515146. PMID: 10194088.
76. Ljungman P, Perez-Bercoff L, Jonsson J, Avetisyan G, Sparrelid E, Aschan J, Barkholt L, Larsson K, Winiarski J, Yun Z, Ringdén O. Risk factors for the development of cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2006 Jan;91(1):78-83. PMID: 16434374.
77. George B, Pati N, Gilroy N, Ratnamohan M, Huang G, Kerridge I, Hertzberg M, Gottlieb D, Bradstock K. Pre-transplant cytomegalovirus (CMV) serostatus remains the most important determinant of CMV reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the era of surveillance and preemptive therapy. *Transpl Infect Dis*. 2010 Aug 1;12(4):322-9. doi: 10.1111/j.1399-3062.2010.00504.x. Epub 2010 May 11. PMID: 20487414.
78. Ljungman P, Brand R, Hoek J, de la Camara R, Cordonnier C, Einsele H, Styczynski J, Ward KN, Cesaro S; Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Donor cytomegalovirus

- status influences the outcome of allogeneic stem cell transplant: a study by the European group for blood and marrow transplantation. *Clin Infect Dis*. 2014 Aug 15;59(4):473-81. doi: 10.1093/cid/ciu364. Epub 2014 May 20. PMID: 24850801.
79. Pietersma FL, van Dorp S, Minnema MC, Kuball J, Meijer E, Schuurman R, van Baarle D. Influence of donor cytomegalovirus (CMV) status on severity of viral reactivation after allogeneic stem cell transplantation in CMV-seropositive recipients. *Clin Infect Dis*. 2011 Apr 1;52(7):e144-8. doi: 10.1093/cid/cir002. PMID: 21427386.
80. Moss P, Khan N. CD8(+) T-cell immunity to cytomegalovirus. *Hum Immunol*. 2004 May;65(5):456-64. doi: 10.1016/j.humimm.2004.02.014. PMID: 15172445.
81. Jaskula E, Bochenska J, Kocwin E, Tarnowska A, Lange A. CMV Serostatus of Donor-Recipient Pairs Influences the Risk of CMV Infection/Reactivation in HSCT Patients. *Bone Marrow Res*. 2012;2012:375075. doi: 10.1155/2012/375075. Epub 2012 Nov 22. PMID: 23227343; PMCID: PMC3512215.
82. Ljungman P. CMV infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2008 Aug;42 Suppl 1:S70-S72. doi: 10.1038/bmt.2008.120. PMID: 18724309.
83. Bate SL, Dollard SC, Cannon MJ. Cytomegalovirus seroprevalence in the United States: the national health and nutrition examination surveys, 1988-2004. *Clin Infect Dis*. 2010 Jun 1;50(11):1439-47. doi: 10.1086/652438. PMID: 20426575.
84. Hyde TB, Schmid DS, Cannon MJ. Cytomegalovirus seroconversion rates and risk factors: implications for congenital CMV. *Rev Med Virol*. 2010 Sep;20(5):311-26. doi: 10.1002/rmv.659. PMID: 20645278.
85. Ljungman P, Boeckh M, Hirsch HH, Josephson F, Lundgren J, Nichols G, Piskis A, Razonable RR, Miller V, Griffiths PD; Disease Definitions Working Group of the Cytomegalovirus Drug Development Forum. Definitions of Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Patients for Use in Clinical Trials. *Clin Infect Dis*. 2017 Jan 1;64(1):87-91. doi: 10.1093/cid/ciw668. Epub 2016 Sep 28. PMID: 27682069.

86. Ljungman P, de la Camara R, Robin C, Crocchiolo R, Einsele H, Hill JA, Hubacek P, Navarro D, Cordonnier C, Ward KN; 2017 European Conference on Infections in Leukaemia group. Guidelines for the management of cytomegalovirus infection in patients with haematological malignancies and after stem cell transplantation from the 2017 European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL 7). *Lancet Infect Dis.* 2019 Aug;19(8):e260-e272. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30107-0. Epub 2019 May 29. PMID: 31153807.
87. Green ML, Leisenring W, Xie H, Mast TC, Cui Y, Sandmaier BM, Sorrow ML, Goyal S, Özkök S, Yi J, Sahoo F, Kimball LE, Jerome KR, Marks MA, Boeckh M. Cytomegalovirus viral load and mortality after haemopoietic stem cell transplantation in the era of pre-emptive therapy: a retrospective cohort study. *Lancet Haematol.* 2016 Mar;3(3):e119-27. doi: 10.1016/S2352-3026(15)00289-6. Epub 2016 Feb 20. PMID: 26947200; PMCID: PMC4914379.
88. Boeckh M, Nichols WG, Papanicolaou G, Rubin R, Wingard JR, Zaia J. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: Current status, known challenges, and future strategies. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2003 Sep;9(9):543-58. doi: 10.1016/s1083-8791(03)00287-8. PMID: 14506657.
89. Ljungman P, Reusser P, de la Camara R, Einsele H, Engelhard D, Ribaud P, Ward K; European Group for Blood and Marrow Transplantation. Management of CMV infections: recommendations from the infectious diseases working party of the EBMT. *Bone Marrow Transplant.* 2004 Jun;33(11):1075-81. doi: 10.1038/sj.bmt.1704505. PMID: 15077131.
90. Marty FM, Ljungman P, Chemaly RF, Maertens J, Dadwal SS, Duarte RF, Haider S, Ullmann AJ, Katayama Y, Brown J, Mullane KM, Boeckh M, Blumberg EA, Einsele H, Snyderman DR, Kanda Y, DiNubile MJ, Teal VL, Wan H, Murata Y, Kartsonis NA, Leavitt RY, Badshah C. Letermovir Prophylaxis for Cytomegalovirus in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med.* 2017 Dec 21;377(25):2433-2444. doi: 10.1056/NEJMoa1706640. Epub 2017 Dec 6. PMID: 29211658.
91. Winston DJ, Yeager AM, Chandrasekar PH, Snyderman DR, Petersen FB, Territo MC; Valacyclovir Cytomegalovirus Study Group. Randomized comparison of oral

- valacyclovir and intravenous ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Clin Infect Dis*. 2003 Mar 15;36(6):749-58. doi: 10.1086/367836. Epub 2003 Mar 3. PMID: 12627359.
92. Ljungman P, de La Camara R, Milpied N, Volin L, Russell CA, Crisp A, Webster A; Valacyclovir International Bone Marrow Transplant Study Group. Randomized study of valacyclovir as prophylaxis against cytomegalovirus reactivation in recipients of allogeneic bone marrow transplants. *Blood*. 2002 Apr 15;99(8):3050-6. doi: 10.1182/blood.v99.8.3050. PMID: 11929799.
93. Ordemann R, Naumann R, Geissler G, Kroschinsky F, Bornhäuser M, Schwerdtfeger R, Ehninger G. Foscarnet--an alternative for cytomegalovirus prophylaxis after allogeneic stem cell transplantation? *Ann Hematol*. 2000 Aug;79(8):432-6. doi: 10.1007/s002770000189. PMID: 10985362.
94. Bregante S, Bertilson S, Tedone E, Van Lint MT, Trespi G, Mordini N, Berisso G, Gualandi F, Lamparelli T, Figari O, Benvenuto F, Raiola AM, Bacigalupo A. Foscarnet prophylaxis of cytomegalovirus infections in patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation (BMT): a dose-finding study. *Bone Marrow Transplant*. 2000 Jul;26(1):23-9. doi: 10.1038/sj.bmt.1702450. PMID: 10918402.
95. de la Torre-Cisneros J, Fariñas MC, Castón JJ, Aguado JM, Cantisán S, Carratalá J, Cervera C, Cisneros JM, Cordero E, Crespo-Leiro MG, Fortún J, Frauca E, Gavaldá J, Gil-Vernet S, Gurguá M, Len O, Lumbreras C, Marcos MÁ, Martín-Dávila P, Monforte V, Montejo M, Moreno A, Muñoz P, Navarro D, Pahissa A, Pérez JL, Rodriguez-Bernot A, Rumbao J, San Juan R, Santos F, Varo E, Zurbano F; GESITRA-SEIMC/REIPI. GESITRA-SEIMC/REIPI recommendations for the management of cytomegalovirus infection in solid-organ transplant patients. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011 Dec;29(10):735-58. doi: 10.1016/j.eimc.2011.05.022. Epub 2011 Sep 17. PMID: 21925772.
96. Hodson EM, Ladhani M, Webster AC, Strippoli GF, Craig JC. Antiviral medications for preventing cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013 Feb 28;(2):CD003774. doi: 10.1002/14651858.CD003774.pub4. PMID: 23450543.



97. Meijer E, Boland GJ, Verdonck LF. Prevention of cytomegalovirus disease in recipients of allogeneic stem cell transplants. *Clin Microbiol Rev.* 2003 Oct;16(4):647-57. doi: 10.1128/CMR.16.4.647-657.2003. PMID: 14557291; PMCID: PMC207116.
98. Solano C, Benet I, Remigia MJ, de la Cámara R, Muñoz-Cobo B, Costa E, Clari MÁ, Bravo D, Amat P, Navarro D. Immunological monitoring for guidance of preemptive antiviral therapy for active cytomegalovirus infection in allogeneic stem-cell transplant recipients: a pilot experience. *Transplantation.* 2011 Aug 27;92(4):e17-20. doi: 10.1097/TP.0b013e318224f263. PMID: 21814124.
99. Navarro D, Amat P, de la Cámara R, López J, Vázquez L, Serrano D, Nieto J, Rovira M, Piñana JL, Giménez E, Solano C. Efficacy and Safety of a Preemptive Antiviral Therapy Strategy Based on Combined Virological and Immunological Monitoring for Active Cytomegalovirus Infection in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients. *Open Forum Infect Dis.* 2016 May 18;3(2):ofw107. doi: 10.1093/ofid/ofw107. PMID: 27419179; PMCID: PMC4943548.
100. Montesinos P, Sanz J, Cantero S, Lorenzo I, Martín G, Saavedra S, Palau J, Romero M, Montava A, Senent L, Martínez J, Jarque I, Salavert M, Córdoba J, Gómez L, Weiss S, Moscardó F, de la Rubia J, Larrea L, Sanz MA, Sanz GF. Incidence, risk factors, and outcome of cytomegalovirus infection and disease in patients receiving prophylaxis with oral valganciclovir or intravenous ganciclovir after umbilical cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009 Jun;15(6):730-40. doi: 10.1016/j.bbmt.2009.03.002. Epub 2009 Apr 11. PMID: 19450758.
101. Gagelmann N, Ljungman P, Styczynski J, Kröger N. Comparative Efficacy and Safety of Different Antiviral Agents for Cytomegalovirus Prophylaxis in Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2018 Oct;24(10):2101-2109. doi: 10.1016/j.bbmt.2018.05.017. Epub 2018 May 16. PMID: 29777868.
102. Boeckh M, Nichols WG, Chemaly RF, Papanicolaou GA, Wingard JR, Xie H, Syrjala KL, Flowers ME, Stevens-Ayers T, Jerome KR, Leisenring W. Valganciclovir for the prevention of complications of late cytomegalovirus infection after allogeneic hematopoietic cell transplantation: a randomized trial.

- Ann Intern Med. 2015 Jan 6;162(1):1-10. doi: 10.7326/M13-2729. PMID: 25560711; PMCID: PMC4465336.
103. Goodrich JM, Bowden RA, Fisher L, Keller C, Schoch G, Meyers JD. Ganciclovir prophylaxis to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic marrow transplant. *Ann Intern Med.* 1993 Feb 1;118(3):173-8. doi: 10.7326/0003-4819-118-3-199302010-00003. PMID: 8380242.
104. Wilkinson GW, Tomasec P, Stanton RJ, Armstrong M, Prod'homme V, Aicheler R, McSharry BP, Rickards CR, Cochrane D, Llewellyn-Lacey S, Wang EC, Griffin CA, Davison AJ. Modulation of natural killer cells by human cytomegalovirus. *J Clin Virol.* 2008 Mar;41(3):206-12. doi: 10.1016/j.jcv.2007.10.027. PMID: 18069056; PMCID: PMC2843162.
105. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol.* 2001 Aug;2(8):675-80. doi: 10.1038/90609. PMID: 11477402.
106. Kijpittayarit S, Eid AJ, Brown RA, Paya CV, Razonable RR. Relationship between Toll-like receptor 2 polymorphism and cytomegalovirus disease after liver transplantation. *Clin Infect Dis.* 2007 May 15;44(10):1315-20. doi: 10.1086/514339. Epub 2007 Apr 11. PMID: 17443468.
107. Biron CA, Brossay L. NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. *Curr Opin Immunol.* 2001 Aug;13(4):458-64. doi: 10.1016/s0952-7915(00)00241-7. PMID: 11498302.
108. Fietze E, Prösch S, Reinke P, Stein J, Döcke WD, Staffa G, Löning S, Devaux S, Emmrich F, von Baehr R, et al. Cytomegalovirus infection in transplant recipients. The role of tumor necrosis factor. *Transplantation.* 1994 Sep 27;58(6):675-80. PMID: 7940686.
109. Alberola J, Tamarit A, Igual R, Navarro D. Early neutralizing and glycoprotein B (gB)-specific antibody responses to human cytomegalovirus (HCMV) in immunocompetent individuals with distinct clinical presentations of primary HCMV infection. *J Clin Virol.* 2000 Apr;16(2):113-22. doi: 10.1016/s1386-6532(00)00061-5. PMID: 10720815.

110. Sandonís V, García-Ríos E, McConnell MJ, Pérez-Romero P. Role of Neutralizing Antibodies in CMV Infection: Implications for New Therapeutic Approaches. *Trends Microbiol.* 2020 Nov;28(11):900-912. doi: 10.1016/j.tim.2020.04.003. Epub 2020 May 21. PMID: 32448762.
111. Wills MR, Okecha G, Weekes MP, Gandhi MK, Sissons PJ, Carmichael AJ. Identification of naive or antigen-experienced human CD8(+) T cells by expression of costimulation and chemokine receptors: analysis of the human cytomegalovirus-specific CD8(+) T cell response. *J Immunol.* 2002 Jun 1;168(11):5455-64. doi: 10.4049/jimmunol.168.11.5455. PMID: 12023339.
112. Rocha B, Tanchot C. Towards a cellular definition of CD8+ T-cell memory: the role of CD4+ T-cell help in CD8+ T-cell responses. *Curr Opin Immunol.* 2004 Jun;16(3):259-63. doi: 10.1016/j.coi.2004.03.004. PMID: 15134772.
113. Gerna G, Lilleri D, Chiesa A, Zelini P, Furione M, Comolli G, Pellegrini C, Sarchi E, Migotto C, Bonora MR, Meloni F, Arbustini E. Virologic and immunologic monitoring of cytomegalovirus to guide preemptive therapy in solid-organ transplantation. *Am J Transplant.* 2011 Nov;11(11):2463-71. doi: 10.1111/j.1600-6143.2011.03636.x. Epub 2011 Aug 9. PMID: 21827612.
114. Egli A, Humar A, Kumar D. State-of-the-art monitoring of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity after organ transplant: a primer for the clinician. *Clin Infect Dis.* 2012 Dec;55(12):1678-89. doi: 10.1093/cid/cis818. Epub 2012 Sep 18. PMID: 22990848.
115. Lilleri D, Fornara C, Revello MG, Gerna G. Human cytomegalovirus-specific memory CD8+ and CD4+ T cell differentiation after primary infection. *J Infect Dis.* 2008 Aug 15;198(4):536-43. doi: 10.1086/590118. PMID: 18590456.
116. Giménez E, Muñoz-Cobo B, Solano C, Amat P, de la Cámara R, Nieto J, et al. Functional patterns of cytomegalovirus (CMV) pp65 and immediate early-1-specific CD8(+) T cells that are associated with protection from and control of CMV DNAemia after allogeneic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis.* 2015;17(3):361-70.

117. Northrop JK, Shen H. CD8+ T-cell memory: only the good ones last. *Curr Opin Immunol.* 2004 Aug;16(4):451-5. doi: 10.1016/j.coi.2004.05.004. PMID: 15245738.
118. Sester U, Gärtner BC, Wilkens H, Schwaab B, Wössner R, Kindermann I, Girndt M, Meyerhans A, Mueller-Lantzsch N, Schäfers HJ, Sybrecht GW, Köhler H, Sester M. Differences in CMV-specific T-cell levels and long-term susceptibility to CMV infection after kidney, heart and lung transplantation. *Am J Transplant.* 2005 Jun;5(6):1483-9. doi: 10.1111/j.1600-6143.2005.00871.x. PMID: 15888058.
119. Castón JJ, Cantisán S, González-Gasca F, Páez-Vega A, Abdel-Hadi H, Illescas S, Alonso G, Torre-Cisneros J. Interferon- $\gamma$  production by CMV-specific CD8+ T lymphocytes provides protection against cytomegalovirus reactivation in critically ill patients. *Intensive Care Med.* 2016 Jan;42(1):46-53. doi: 10.1007/s00134-015-4077-6. Epub 2015 Nov 4. PMID: 26537489.
120. Marits P, Wikström AC, Popadic D, Winqvist O, Thunberg S. Evaluation of T and B lymphocyte function in clinical practice using a flow cytometry based proliferation assay. *Clin Immunol.* 2014 Aug;153(2):332-42. doi: 10.1016/j.clim.2014.05.010. Epub 2014 Jun 6. PMID: 24909732.
121. Einsele H, Roosnek E, Rufer N, Sinzger C, Riegler S, Löffler J, Grigoleit U, Moris A, Rammensee HG, Kanz L, Kleihauer A, Frank F, Jahn G, Hebart H. Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood.* 2002 Jun 1;99(11):3916-22. doi: 10.1182/blood.v99.11.3916. PMID: 12010789.
122. El Haddad L, Ariza-Heredia E, Shah DP, Jiang Y, Blanchard T, Ghantaji SS, El Chaer F, El-Haddad D, Prayag A, Neshar L, Rezvani K, Shpall E, Chemaly RF. The Ability of a Cytomegalovirus ELISPOT Assay to Predict Outcome of Low-Level CMV Reactivation in Hematopoietic Cell Transplant Recipients. *J Infect Dis.* 2019 Feb 23;219(6):898-907. doi: 10.1093/infdis/jiy592. PMID: 30295846; PMCID: PMC6386808.
123. Yong MK, Cameron PU, Slavin M, Morrissey CO, Bergin K, Spencer A, Ritchie D, Cheng AC, Samri A, Carcelain G, Autran B, Lewin SR. Identifying

- Cytomegalovirus Complications Using the Quantiferon-CMV Assay After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *J Infect Dis.* 2017 Jun 1;215(11):1684-1694. doi: 10.1093/infdis/jix192. PMID: 28431019.
124. Girmenia C, Lazzarotto T, Bonifazi F, Patriarca F, Irrera G, Ciceri F, Aversa F, Citterio F, Cillo U, Cozzi E, Gringeri E, Baldanti F, Cavallo R, Clerici P, Barosi G, Grossi P. Assessment and prevention of cytomegalovirus infection in allogeneic hematopoietic stem cell transplant and in solid organ transplant: A multidisciplinary consensus conference by the Italian GITMO, SITO, and AMCLI societies. *Clin Transplant.* 2019 Oct;33(10):e13666. doi: 10.1111/ctr.13666. Epub 2019 Aug 6. PMID: 31310687.
125. Cantisán S, Lara R, Montejo M, Redel J, Rodríguez-Benot A, Gutiérrez-Aroca J, González-Padilla M, Bueno L, Rivero A, Solana R, Torre-Cisneros J. Pretransplant interferon- $\gamma$  secretion by CMV-specific CD8<sup>+</sup> T cells informs the risk of CMV replication after transplantation. *Am J Transplant.* 2013 Mar;13(3):738-45. doi: 10.1111/ajt.12049. Epub 2013 Jan 11. PMID: 23311355.
126. Cantisán S, Rodelo-Haad C, Páez-Vega A, Nieto A, Vaquero JM, Poyato A, Montejo M, Fariñas MC, Rivero A, Solana R, Martín-Malo A, Torre-Cisneros J. Factors related to the development of CMV-specific CD8<sup>+</sup> T cell response in CMV-seropositive solid organ transplant candidates. *Am J Transplant.* 2015 Mar;15(3):715-22. doi: 10.1111/ajt.13012. Epub 2015 Feb 3. PMID: 25648131.
127. Bestard O, Lucia M, Crespo E, Van Liempt B, Palacio D, Melilli E, Torras J, Llaudó I, Cerezo G, Taco O, Gil-Vernet S, Grinyó JM, Cruzado JM. Pretransplant immediately early-1-specific T cell responses provide protection for CMV infection after kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2013 Jul;13(7):1793-805. doi: 10.1111/ajt.12256. Epub 2013 May 24. PMID: 23711167.
128. Zhu J, Shearer GM, Marincola FM, Norman JE, Rott D, Zou JP, Epstein SE. Discordant cellular and humoral immune responses to cytomegalovirus infection in healthy blood donors: existence of a Th1-type dominant response. *Int Immunol.* 2001 Jun;13(6):785-90. doi: 10.1093/intimm/13.6.785. PMID: 11369706.

129. Snyder LD, Chan C, Kwon D, Yi JS, Martissa JA, Copeland CA, Osborne RJ, Sparks SD, Palmer SM, Weinhold KJ. Polyfunctional T-Cell Signatures to Predict Protection from Cytomegalovirus after Lung Transplantation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016 Jan 1;193(1):78-85. doi: 10.1164/rccm.201504-0733OC. PMID: 26372850; PMCID: PMC4731614.
130. Abate D, Saldan A, Mengoli C, Fiscon M, Silvestre C, Fallico L, Peracchi M, Furian L, Cusinato R, Bonfante L, Rossi B, Marchini F, Sgarabotto D, Rigotti P, Palù G. Comparison of cytomegalovirus (CMV) enzyme-linked immunosorbent spot and CMV quantiferon gamma interferon-releasing assays in assessing risk of CMV infection in kidney transplant recipients. *J Clin Microbiol.* 2013 Aug;51(8):2501-7. doi: 10.1128/JCM.00563-13. Epub 2013 May 15. Erratum in: *J Clin Microbiol.* 2014 Mar;52(3):1025. PMID: 23678073; PMCID: PMC3719636.
131. Sester M, Gärtner BC, Sester U, Girndt M, Mueller-Lantzsch N, Köhler H. Is the cytomegalovirus serologic status always accurate? A comparative analysis of humoral and cellular immunity. *Transplantation.* 2003 Oct 27;76(8):1229-30. doi: 10.1097/01.TP.0000083894.61333.56. PMID: 14578758.
132. Loeth N, Assing K, Madsen HO, Vindeløv L, Buus S, Stryhn A. Humoral and cellular CMV responses in healthy donors; identification of a frequent population of CMV-specific, CD4+ T cells in seronegative donors. *PLoS One.* 2012;7(2):e31420. doi: 10.1371/journal.pone.0031420. Epub 2012 Feb 7. PMID: 22347475; PMCID: PMC3274531.
133. Litjens NHR, Huang L, Dedeoglu B, Meijers RWJ, Kwekkeboom J, Betjes MGH. Protective Cytomegalovirus (CMV)-Specific T-Cell Immunity Is Frequent in Kidney Transplant Patients without Serum Anti-CMV Antibodies. *Front Immunol.* 2017 Sep 12;8:1137. doi: 10.3389/fimmu.2017.01137. PMID: 28955345; PMCID: PMC5600906.
134. Carbone J, Lanio N, Gallego A, Kern F, Navarro J, Muñoz P, Alonso R, Catalán P, Fernández-Yáñez J, Palomo J, Ruiz M, Fernández-Cruz E, Sarmiento E. Simultaneous monitoring of cytomegalovirus-specific antibody and T-cell levels in seropositive heart transplant recipients. *J Clin Immunol.* 2012 Aug;32(4):809-19. doi: 10.1007/s10875-012-9670-7. Epub 2012 Feb 29. PMID: 22371292.

135. Gamadia LE, Rentenaar RJ, van Lier RA, ten Berge IJ. Properties of CD4(+) T cells in human cytomegalovirus infection. *Hum Immunol.* 2004 May;65(5):486-92. doi: 10.1016/j.humimm.2004.02.020. PMID: 15172448.
136. Castellino F, Germain RN. Cooperation between CD4+ and CD8+ T cells: when, where, and how. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:519-40. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115825. PMID: 16551258.
137. Litjens NH, Huisman M, Hijdra D, Lambrecht BM, Stittelaar KJ, Betjes MG. IL-2 producing memory CD4+ T lymphocytes are closely associated with the generation of IgG-secreting plasma cells. *J Immunol.* 2008 Sep 1;181(5):3665-73. doi: 10.4049/jimmunol.181.5.3665. PMID: 18714042.
138. Welten SPM, Redeker A, Toes REM, Arens R. Viral Persistence Induces Antibody Inflation without Altering Antibody Avidity. *J Virol.* 2016 Apr 14;90(9):4402-4411. doi: 10.1128/JVI.03177-15. PMID: 26889035; PMCID: PMC4836336.
139. Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. Staphylococcal enterotoxins. *Toxins (Basel).* 2010 Aug;2(8):2177-97. doi: 10.3390/toxins2082177. Epub 2010 Aug 18. PMID: 22069679; PMCID: PMC3153290.
140. Whitfield SJC, Taylor C, Risdall JE, Griffiths GD, Jones JTA, Williamson ED, Rijpkema S, Saraiva L, Vessillier S, Green AC, Carter AJ. Interference of the T Cell and Antigen-Presenting Cell Costimulatory Pathway Using CTLA4-Ig (Abatacept) Prevents Staphylococcal Enterotoxin B Pathology. *J Immunol.* 2017 May 15;198(10):3989-3998. doi: 10.4049/jimmunol.1601525. Epub 2017 Mar 20. PMID: 28320831; PMCID: PMC5421302.
141. Fuchs YF, Jainta GW, Kühn D, Wilhelm C, Weigelt M, Karasinsky A, Upadhyaya B, Ziegler AG, Bonifacio E. Vagaries of the ELISpot assay: specific detection of antigen responsive cells requires purified CD8(+) T cells and MHC class I expressing antigen presenting cell lines. *Clin Immunol.* 2015 Apr;157(2):216-25. doi: 10.1016/j.clim.2015.02.012. Epub 2015 Feb 27. PMID: 25728493.
142. Selin LK, Brehm MA, Naumov YN, Cornberg M, Kim SK, Clute SC, Welsh RM. Memory of mice and men: CD8+ T-cell cross-reactivity and heterologous

- immunity. *Immunol Rev.* 2006 Jun;211(1):164-81. doi: 10.1111/j.0105-2896.2006.00394.x. PMID: 16824126; PMCID: PMC7165519.
143. Van den Heuvel H, Heutinck KM, van der Meer-Prins EMW, Yong SL, van Miert PPMC, Anholts JDH, Franke-van Dijk MEI, Zhang XQ, Roelen DL, Ten Berge RJM, Claas FHJ. Allo-HLA Cross-Reactivities of Cytomegalovirus-, Influenza-, and Varicella Zoster Virus-Specific Memory T Cells Are Shared by Different Healthy Individuals. *Am J Transplant.* 2017 Aug;17(8):2033-2044. doi: 10.1111/ajt.14279. Epub 2017 May 19. PMID: 28332333.
144. Yao J, Bechter C, Wiesneth M, Härter G, Götz M, Germeroth L, Guillaume P, Hasan F, von Harsdorf S, Mertens T, Michel D, Döhner H, Bunjes D, Schmitt M, Schmitt A. Multimer staining of cytomegalovirus phosphoprotein 65-specific T cells for diagnosis and therapeutic purposes: a comparative study. *Clin Infect Dis.* 2008 May 15;46(10):e96-105. doi: 10.1086/587749. PMID: 18419478.
145. Altaf M, Lineburg KE, Crooks P, Rehan S, Matthews KK, Neller MA, Ambalathingal GR, Sinha D, Grant M, Hopkins PMA, Chambers D, Khanna R, Smith C. Pretransplant Cytomegalovirus-Specific Cellular Immunity and Risk of Viral Reactivation Following Lung Transplantation: A Prospective Cohort Study. *J Infect Dis.* 2021 Jul 15;224(2):312-317. doi: 10.1093/infdis/jiaa750. PMID: 33274385.
146. Tey SK, Kennedy GA, Cromer D, Davenport MP, Walker S, Jones LI, Crough T, Durrant ST, Morton JA, Butler JP, Misra AK, Hill GR, Khanna R. Clinical assessment of anti-viral CD8+ T cell immune monitoring using QuantiFERON-CMV® assay to identify high risk allogeneic hematopoietic stem cell transplant patients with CMV infection complications. *PLoS One.* 2013 Oct 11;8(10):e74744. doi: 10.1371/journal.pone.0074744. PMID: 24146744; PMCID: PMC3795724.
147. Battiwalla M, Wu Y, Bajwa RP, Radovic M, Almyroudis NG, Segal BH, Wallace PK, Nakamura R, Padmanabhan S, Hahn T, McCarthy PL Jr. Ganciclovir inhibits lymphocyte proliferation by impairing DNA synthesis. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007 Jul;13(7):765-70. doi: 10.1016/j.bbmt.2007.03.009. Epub 2007 May 7. PMID: 17580254.



148. Suessmuth Y, Mukherjee R, Watkins B, Koura DT, Finstermeier K, Desmarais C, Stempora L, Horan JT, Langston A, Qayed M, Khoury HJ, Grizzle A, Cheeseman JA, Conger JA, Robertson J, Garrett A, Kirk AD, Waller EK, Blazar BR, Mehta AK, Robins HS, Kean LS. CMV reactivation drives posttransplant T-cell reconstitution and results in defects in the underlying TCR $\beta$  repertoire. *Blood*. 2015 Jun 18;125(25):3835-50. doi: 10.1182/blood-2015-03-631853. Epub 2015 Apr 7. PMID: 25852054; PMCID: PMC4473113.
149. Borchers S, Bremm M, Lehrnbecher T, Dammann E, Pabst B, Wölk B, Esser R, Yildiz M, Eder M, Stadler M, Bader P, Martin H, Jarisch A, Schneider G, Klingebiel T, Ganser A, Weissinger EM, Koehl U. Sequential anti-cytomegalovirus response monitoring may allow prediction of cytomegalovirus reactivation after allogeneic stem cell transplantation. *PLoS One*. 2012;7(12):e50248. doi: 10.1371/journal.pone.0050248. Epub 2012 Dec 13. Erratum in: *PLoS One*. 2013;8(4). doi: 10.1371/annotation/43e9b84c-fbe3-4b39-88c8-1cde34b0afea. PMID: 23272059; PMCID: PMC3521740.
150. Hill JA, Mayer BT, Xie H, Leisenring WM, Huang ML, Stevens-Ayers T, Milano F, Delaney C, Jerome KR, Zerr DM, Nichols G, Boeckh M, Schiffer JT. Kinetics of Double-Stranded DNA Viremia After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Clin Infect Dis*. 2018 Jan 18;66(3):368-375. doi: 10.1093/cid/cix804. PMID: 29020348; PMCID: PMC5850428.
151. Einsele H, Ljungman P, Boeckh M. How I treat CMV reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2020 May 7;135(19):1619-1629. doi: 10.1182/blood.2019000956. PMID: 32202631; PMCID: PMC7484743.
152. Jian JY, Inoue SI, Bayarsaikhan G, Miyakoda M, Kimura D, Kimura K, Nozaki E, Sakurai T, Fernandez-Ruiz D, Heath WR, Yui K. CD49d marks Th1 and Tfh-like antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells during *Plasmodium chabaudi* infection. *Int Immunol*. 2021 Jul 23;33(8):409-422. doi: 10.1093/intimm/dxab020. PMID: 33914894.
153. Mittelbrunn M, Molina A, Escribese MM, Yáñez-Mó M, Escudero E, Ursa A, Tejedor R, Mampaso F, Sánchez-Madrid F. VLA-4 integrin concentrates at the peripheral supramolecular activation complex of the immune synapse and drives T helper 1 responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jul 27;101(30):11058-63. doi:

10.1073/pnas.0307927101. Epub 2004 Jul 19. PMID: 15263094; PMCID: PMC503740.



## **ANEXOS**



## 10. ANEXOS

### ANEXO 1. OTRAS PUBLICACIONES

1. Páez-Vega A, Cantisán S, Agüera ML, Suñer M, Facundo C, Yuste JR, Fernández-Ruiz M, Montejo M, Redondo-Pachón D, López-Oliva MO, Fernández-Rodríguez A, Fariñas MC, Hernández D, Len O, Muñoz P, **Valle-Arroyo J**, Rodelo-Haad C, Cordero E, Torre-Cisneros J. Pretransplant CMV-Specific T-Cell Immunity But Not Dose of Antithymocyte Globulin Is Associated With Recovery of Specific Immunity After Kidney Transplantation. *J Infect Dis.* 2021 Apr 8;223(7):1205-1213. doi: 10.1093/infdis/jiaa503. PMID: 32779713.
2. Páez-Vega A, Gutiérrez-Gutiérrez B, Agüera ML, Facundo C, Redondo-Pachón D, Suñer M, López-Oliva MO, Yuste JR, Montejo M, Galeano-Álvarez C, Ruiz-San Millan JC, Los-Arcos I, Hernández D, Fernández-Ruiz M, Muñoz P, **Valle-Arroyo J**, Cano A, Rodríguez-Benot A, Crespo M, Rodelo-Haad C, Lobo-Acosta MA, Garrido-Gracia JC, Vidal E, Guirado L, Cantisán S, Torre-Cisneros J; TIMOVAL Study Group. Immunoguided Discontinuation of Prophylaxis for Cytomegalovirus Disease in Kidney Transplant Recipients Treated With Antithymocyte Globulin: A Randomized Clinical Trial. *Clin Infect Dis.* 2022 Mar 9;74(5):757-765. doi: 10.1093/cid/ciab574. PMID: 34228099.
3. Fernández-Moreno R, **Valle-Arroyo J**, Páez-Vega A, Salinas A, Cano A, Pérez AB, Torre-Cisneros J, Cantisán S. Memory SARS-CoV-2 T-cell response in convalescent COVID-19 patients with undetectable specific IgG antibodies: a comparative study. *Front Immunol.* 2023 Apr 26;14:1142918. doi: 10.3389/fimmu.2023.1142918. PMID: 37180143; PMCID: PMC10169638.

---

## ANEXO 2. COMUNICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES

### A. Congresos Nacionales

1. Discordancia humoral/celular frente al Citomegalovirus en individuos CMV-seropositivos ¿artefacto o realidad? XXI Congreso de la Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas (SAEI). 21/11/2019-23/11/2019. **J. Valle Arroyo**, R. Aguado Álvarez, A. Páez Vega, A.B. Pérez Jiménez, R. González Fernández, G. Fornés Torres, J. De La Torre Cisneros, S. Cantisán.
2. Impacto de la ausencia de respuesta T CMV-específica en donantes CMV-seropositivos sobre la reactivación de CMV tras el trasplante hematopoyético en receptores CMV-seropositivos: Resultados preliminares. Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Modalidad virtual 2020. **J. Valle Arroyo**, C. Martín Calvo, E. García Torres, C. González Rico, C. Fariñas Álvarez, M. Fernández Alonso, J. Rifón Roca, N. Gómez Lozano, R. Duarte Palomino, J. López Jiménez, A. Páez Vega, J. De La Torre Cisneros, S. Cantisán.
3. Discordancia humoral/celular frente al CMV en individuos CMV-seropositivos ¿artefacto o realidad? XXIV Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Modalidad virtual 06/06/2021-11/06/2021. **J. Valle Arroyo**, R. Aguado Álvarez, A. Páez Vega, A.B. Pérez Jiménez, R. González Fdez, G. Fornés Torres, J. De La Torre Cisneros, S. Cantisán.

4. Deficiente reconstitución de la respuesta T CMV-específica después del trasplante de progenitores hematopoyéticos relacionada con la discordancia inmune humoral/celular de los donantes. XXV Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 02/06/2022-04/06/2022. **J. Valle Arroyo**, A. Páez Vega, R. Fernández Moreno, J. López Jiménez, A. Luna, R. Duarte, F. Serrano Martínez, S. Villar Fernández, G. Reina, M. Fernández Alonso, C. González Rico, M.C. Fariñas, R. Rojas, C. Herrera, C. Martín, E. García Torres, J. De La Torre Cisneros, S. Cantisán.

## **B. Congresos Internacionales**

1. Lack of cytomegalovirus (CMV)-specific cell-mediated immune response using QuantiFERON-CMV assay in CMV-seropositive healthy volunteers: fact not artifact. 6th European Congress of Immunology (ECI 2021). 01/09/2021-04/09/2021. **J. Valle Arroyo**, R. Aguado Álvarez, A. Páez Vega, A.B. Pérez Jiménez, R. González Fernández, G. Fornés Torres, J. De La Torre Cisneros, S. Cantisán.













UNIVERSIDAD  
E  
CÓRDOBA