



Universidad Pública de Navarra
Nafarroako Unibertsitate Publikoa

Facultad de Ciencias de la Salud

*Evaluación de la respuesta inmunológica funcional
desarrollada frente a Citomegalovirus, Virus
Epstein-Barr, Adenovirus así como de sus elementos
reguladores en pacientes que reciben un TPH
alógeno*

Miren Vallejo Ruiz

2020

<https://doi.org/10.48035/Tesis/2454/41110>

upna

Universidad Pública de Navarra
Nafarroako Unibertsitate Publikoa

Facultad de Ciencias de la Salud

*Evaluación de la respuesta inmunológica funcional
desarrollada frente a Citomegalovirus, Virus Epstein-
Barr, Adenovirus así como de sus elementos reguladores
en pacientes que reciben un TPH alogénico*

Memoria presentada por D^a Miren Vallejo Ruiz para aspirar al grado de Doctor por la Universidad Pública de Navarra.

El presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección en el Grupo de Investigación en Oncohematología de Navarrabiomed y autorizo su presentación ante el Tribunal que lo ha de juzgar.

Pamplona, a 13 de Julio de 2020



Dra. Natalia Ramírez Huerto

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a la Universidad Pública de Navarra por concederme la posibilidad de formarme como investigadora y a Navarrabiomed por haberme permitido llevar a cabo este proyecto de investigación en su centro. Del mismo modo, me gustaría agradecer al Departamento de Industria del Gobierno de Navarra por haberme concedido la “Ayuda 2016 para la contratación de doctorandos y doctorandas por empresas y organismos de investigación y difusión de conocimientos: Doctorandos industriales 2017-2019”, con la cual he podido llevar a cabo este proyecto.

Quisiera dar las gracias a mi directora de tesis, la Dra. Natalia Ramírez, sin la cual no habría sido capaz de realizar todo este trabajo. Gracias por la oportunidad, la confianza, el apoyo, los consejos y, sobre todo, el valioso tiempo que me has dedicado siempre. Del mismo modo, agradecer su excelente labor como tutor del Dr. Ignacio Encío. Gracias también a todas las personas que han formado parte del Grupo de Investigación en Oncohematología, con los que empecé y todos los que se han ido sumando después. Este agradecimiento es extensible a todos los compañeros de los diferentes grupos que conforman Navarrabiomed, en especial al grupo OncobionaTras por su gran ayuda en la recta final. Agradecer también al Dr. Luis Sáenz, por acercarme al mundo de la investigación, aconsejarme y, sobre todo, por su amistad.

A todo el Servicio de Análisis Clínicos del Complejo Hospitalario de Navarra (CHN), por servirme de apoyo en muchos momentos, porque siempre es como volver a mis orígenes. En especial, agradecer a todas las personas de este Servicio que donaron sangre para mis experimentos, estaré siempre agradecida a mis donantes.

También me gustaría agradecer al Servicio de Hematología y Hemoterapia del CHN, por proporcionarme muestras y apoyo clínico, en especial a la Dra. Maite Zudaire, Dra. M^a Cruz Viguria y Dra. Amaya Zabalza; así como al Laboratorio de Hematología, en especial a Maite. También mi agradecimiento al Servicio de Farmacia del CHN por la dispensación de los fármacos necesarios para la ejecución de los experimentos *in vitro*. Agradecer también a la Dra. Eva Gálvez y a Pilar Domingo, del Instituto de Carboquímica de Zaragoza, por su gran colaboración en el desarrollo de este proyecto.

Quisiera dar las gracias al Laboratorio de Genética del Servicio de Hematología del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Al Dr. Ismael Buño y la Dra. Carolina Martínez Laperche por enseñarme tanto y tan bien durante mi estancia en su centro. No me puedo olvidar del fantástico equipo de su laboratorio, en especial a Diego, María y Paula por estar ahí siempre a pesar de la distancia. A la Dra. Laura

Solán por su compromiso, sus envíos de muestras y su admirable dedicación a los pacientes. Este agradecimiento es extensible a sus compañeros del Área de Trasplante de este Servicio de Hematología.

Por último, y lo más importante, dar las gracias a todos los pacientes que han participado en este proyecto a pesar de lo extraordinariamente duro que supone someterse a un trasplante de progenitores hematopoyético. Ojalá este proyecto suponga un “granito de arena” en vuestra lucha.

A mis padres y mi hermano, por su apoyo incondicional. Y a todos mis amigos por estar siempre cuando se les necesita.

A Mikel, por todo.

Muchas gracias a todos

ABREVIATURAS

AdV	Adenovirus
Alo-TPH	Trasplante de progenitores hematopoyéticos alogénico
AF	Aspergillus fumigatus
AI	Aspergilosis invasiva
ATG	Globulina antitimocítica
AUC	Área bajo la curva
BAL	Lavado broncoalveolar
BGN	Bacilo Gram negativo
bmGT	Bismetil-Gliotoxina
CEIm	Comité de Ética de la Investigación con medicamentos
CFSE	Éster de succinimidil-carboxifluoresceína
CHN	Complejo Hospitalario de Navarra
CLIA	Quimioluminiscencia
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CMN	Células mononucleadas
CMIA	Inmunoanálisis de micropartículas quimioluminiscente
CMV	Citomegalovirus
CTL ^{AdV}	Linfocitos T citotóxicos (CD8+) específicos de AdV
CTL ^{CMV}	Linfocitos T citotóxicos (CD8+) específicos de CMV
CTL ^{VEB}	Linfocitos T citotóxicos (CD8+) específicos de VEB
CPA	Célula presentadora de antígeno
CsA	Ciclosporina
CY	Ciclofosfamida
Cy-PT	Ciclofosfamida post-trasplante
DC	Célula dendrítica
DCM	Diclorometano
DNE	Donante no emparentado
dPBS	Dulbecco's PBS
EBMT	<i>European Society for Blood and Marrow Transplantation</i>
EBNA-1	Proteína nuclear 1 de VEB
EICT	Efecto injerto contra tumor
EICR	Enfermedad injerto contra receptor
ELISPOT	<i>Enzyme-linked immunosorbent spot</i>

EORTC/MSG Grupo cooperativo europeo para la investigación y tratamiento de infecciones fúngicas invasoras

G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
GM	Galactomanano
GT	Gliotoxina
HGUGM	Hospital General Universitario Gregorio Marañón
HLA	<i>Human Leukocyte Antigens</i>
HPTLC	Cromatografía de Capa Fina de Alta Resolución
ICS	<i>Intracellular cytokine staining</i>
IC 95%	Intervalos de confianza del 95%
IFI	Infección fúngica invasiva
IFN- γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IL-1R	Receptor de interleuquina 1
INDEL	<i>Insertion-deletion length polymorphism</i>
IP	Ioduro de propidio
KIR	<i>Killer Immunoglobulin-like Receptor</i>
LB	Linfocito B
LH	Linfoma Hodgkin
LAL	Leucemia aguda linfoblástica
LLC	Leucemia linfática crónica
LAM	Leucemia aguda mieloblástica
LMC	Leucemia mieloide crónica
LNH	Linfoma no Hodgkin
LT	Linfocito T
LTreg	Linfocito T regulador
mDC	Célula dendrítica mieloide
MAF	Frecuencia alélica poblacional
MM	Mieloma múltiple
MMF	Micofenolato de mofetilo
MTX	Metotrexato
MO	Médula ósea
NGS	<i>Next-generation sequencing</i>

NK	Célula Natural Killer
ONT	Organización Nacional de Trasplante
OR	Odds ratio
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PH	Progenitores hematopoyéticos
PHA	Fitohemaglutinina
REDMO	Registro de Donantes de Médula Ósea
SCU	Sangre de cordón umbilical
SEB	Enterotoxina B de <i>Staphylococcus aureus</i>
SFB	Suero Fetal Bovino
SLPT	Síndrome Linfoproliferativo Post-Trasplante
SNP	Polimorfismos de un solo nucleótido
SMD	Síndrome mielodisplásico
SP	Sangre periférica
TA	Temperatura ambiente
Tac	Tacrolimus
TCR	Receptor célula T
TBI	Irradiación corporal total
TLR	Receptor tipo Toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alpha
TNFR	Receptor del factor de necrosis tumoral
TPH	Trasplante de progenitores hematopoyéticos
VAF	Frecuencia alélica de la variante
VCA	Antígeno de la cápside del VEB
VEB	Virus Epstein Barr
VHS	Virus Herpes simple
VOD	Enfermedad venoclusiva hepática
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo
VRS	Virus respiratorio sincitial
VVZ	Virus Varicela-zóster

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	23-56
1. Trasplante de progenitores hematopoyéticos alogénico	25-35
1.1 Clasificación: fuente de PH, tipos de TPH	
1.2 Régimen de acondicionamiento	
1.3 Indicaciones clínicas	
1.4 Complicaciones post-trasplante	
1.4.1 <i>Complicaciones derivadas del régimen de acondicionamiento y de la aplasia medular</i>	
1.4.2 <i>Complicaciones derivadas de la terapia inmunosupresora</i>	
a. Infecciones bacterianas	
b. Infecciones víricas	
c. Infecciones fúngicas	
1.4.3 <i>Enfermedad injerto contra receptor: tipos, profilaxis y tratamiento</i>	
1.4.4 <i>Fallo de injerto</i>	
2. Virus objeto de estudio por su implicación en el trasplante alogénico	36-39
2.1 Citomegalovirus	
2.2 Virus Epstein-Barr	
2.3 Adenovirus	
3. Reconstitución inmunológica post-TPH.....	39-44
3.1 Factores que influyen en la reconstitución inmune después del alo-TPH	
3.2 Reconstitución inmunidad innata	
3.2.2 <i>Neutrófilos</i>	
3.2.2 <i>Células Natural Killer</i>	
3.2.2 <i>Células dendríticas</i>	
3.3 Reconstitución inmunidad adaptativa	
3.3.2 <i>LT</i>	
3.3.2 <i>LB</i>	
4. Reconstitución inmunológica específica de virus post-TPH	45-50
4.1 LT activados por CMV	
4.2 LT activados por VEB	
4.3 LT activados por AdV	
4.4 Caracterización funcional de LT tras activación viral	

5. Parámetros reguladores de la respuesta inmunológica de LT específica de virus.....	50-56
5.1 Papel de otras subpoblaciones inmunológicas: NK y DC	
5.2 Tratamiento inmunosupresor post-trasplante	
5.3 Co-infecciones fúngicas	
5.4 Polimorfismos genéticos	
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	59-61
MATERIAL Y MÉTODOS.....	63-88
1. Consideraciones éticas.....	65
2. Diseño metodológico.....	65-66
3. Bloque I.....	67-75
3.1 Sujetos de estudio	
3.2 Simulación <i>in vitro</i> del microambiente patógeno y farmacológico post-TPH	
3.3 Análisis celular mediante citometría de flujo	
3.3.1 <i>Identificación y caracterización fenotípica de subpoblaciones celulares</i>	
3.3.2 <i>Evaluación de la proliferación celular de LT mediante tinción con éster de succinimidil-carboxifluoresceína</i>	
3.3.3 <i>Estudio de la apoptosis celular inducida por Gliotoxina</i>	
3.4 Separación inmunomagnética de subpoblaciones celulares y análisis de la vía de señalización NF- κ B.	
3.5 Análisis estadístico	
4. Bloque II.....	76-82
4.1 Población de estudio	
4.2 Monitorización de infecciones víricas y fúngicas después del alo-TPH	
4.3 Diseño experimental	
4.4 Monitorización inmunológica post-trasplante	
4.4.1 <i>Procesamiento inicial de la muestra</i>	
4.4.2 <i>Cuantificación de subpoblaciones celulares</i>	
4.4.3 <i>Caracterización funcional de subpoblaciones de LT específicas de CMV/VEB/AdV</i>	

4.4.4	<i>Análisis mediante citometría de flujo</i>	
4.5	Monitorización de los niveles de GT y bmGT post-TPH	
4.6	Análisis estadístico	
5.	Bloque III	83-88
5.1	Población de estudio	
5.2	Monitorización del CMV después del alo-TPH	
5.3	Análisis de SNPs mediante secuenciación masiva	
5.3.1	<i>Diseño de panel de NGS mediante enriquecimiento por captura</i>	
5.3.2	<i>Filtrado de variantes genómicas</i>	
5.4	Análisis estadístico	
RESULTADOS		89-152
1.	Bloque I	91-110
1.1	El tratamiento profiláctico frente a EICR inhibe la subpoblación de células NK CD56 ^{dim} tras estimulación antigénica con CMV ^{pp65} o VEB ^{EBNA-1}	
1.2	La presencia de GT inhibe la respuesta inmunológica tras la estimulación antigénica con CMV ^{pp65} o VEB ^{EBNA-1}	
1.3	GT potencia el efecto inmunosupresor de CsA y MTX sobre las células NK CD56 ^{dim} y LT CD4+ y CD8+ en presencia de antígenos CMV ^{pp65} o VEB ^{EBNA-1}	
1.4	Efecto anti-proliferativo de la GT sobre los LT tras el estímulo antigénico con CMV ^{pp65} y VEB ^{EBNA-1}	
1.5	GT induce muerte celular de CMN dependiente de la dosis	
1.6	GT en combinación con farmacología profiláctica anti-EICR suprime la vía de señalización NF-kB	
2.	Bloque II	111-135
2.1	Población de estudio	
2.2	Complicaciones infecciosas víricas y fúngicas después del alo-TPH: incidencia y factores de riesgo clínicos asociados.	
2.3	Interdependencia de las subpoblaciones inmunológicas después del alo-TPH.	
2.4	La reconstitución inmunológica después del alo-TPH tiene un impacto significativo en el control de las complicaciones víricas.	

2.4.1	<i>La reconstitución de las células NK es dependiente de la aparición de episodios de recurrencia de CMV post-trasplante</i>	
2.4.2	<i>La infección por CMV provoca cambios dinámicos en la reconstitución de las subpoblaciones de LT CD4+ y CD8+ después del alo-TPH.</i>	
2.4.3	<i>LT CD4+ y CD8+ memoria disfuncionales están presentes en pacientes que experimentan infección por CMV después del alo-TPH.</i>	
2.5	La presencia de bmGT y la administración de profilaxis anti-EICR basada en Cy-PT condiciona la reconstitución funcional de subpoblaciones de LT específicos de virus	
3.	Bloque III.....	136-152
3.1	Incidencia de infección por CMV post-TPH y factores de riesgo asociados	
3.2	Análisis de variantes genómicas obtenidas por NGS	
3.2.1	<i>Asociación de polimorfismos en receptor y/o donante e infección por CMV post-TPH</i>	
3.2.2	<i>Asociación de variantes genómicas en receptor y/o donante y enfermedad por CMV</i>	
3.3	Elaboración de un score de riesgo genético para el manejo de la infección de CMV después del alo-TPH	
3.4	Elaboración de un score de riesgo genético para predecir múltiples episodios de infección por CMV después del alo-TPH	
	DISCUSIÓN.....	153-182
1.	Bloque I.....	155-166
2.	Bloque II	167-175
3.	Bloque III.....	176-182
	CONCLUSIONES.....	185
	BIBLIOGRAFÍA	187-203

ANEXOS 205-221

Anexo 1. Listado de los 213 polimorfismos (SNPs e INDELS) analizados en las 85 parejas receptor-donante.

Anexo 2. Pasado y presente de la respuesta funcional inmunológica desarrollada frente a Epstein-Barr y Adenovirus en el trasplante de progenitores hematopoyéticos.

INTRODUCCIÓN

1. Trasplante de progenitores hematopoyéticos alogénico

El trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH), introducido en la práctica clínica en los años 50 (1), constituye un procedimiento terapéutico ampliamente utilizado para el tratamiento de gran variedad de enfermedades congénitas y adquiridas que afectan a la médula ósea (MO). Dicho procedimiento tiene como objetivo principal regenerar el tejido hematopoyético del paciente que debido a diversos mecanismos moleculares patológicos tiene una actividad anómala. La recuperación de la función hematológica e inmunológica tras el TPH se debe a la administración al paciente de progenitores hematopoyéticos (PH) sanos. Con el objetivo de erradicar el sistema hematopoyético defectuoso y permitir que injerten los PH 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”.

Los PH que van a ser administrados al paciente deben ser previamente obtenidos bien de un donante sano (trasplante alogénico) o del propio paciente (trasplante autólogo). En este sentido, el trasplante alogénico de PH (alo-TPH), que es en el que nos vamos a centrar en este estudio, es el que se realiza entre dos individuos (donante y receptor) diferentes, que aunque pueden presentar importantes diferencias genéticas, se tiende a que compartan la mayor identidad posible entre sus antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) o también denominado sistema HLA, en inglés *Human Leukocyte Antigens*. Según datos de la Organización Nacional de Trasplante (ONT), en España en 2019 se realizaron 3.444 TPH, de los cuales 1.298 (37,6%) fueron alo-TPH. La cifra de TPH realizados en adultos > 15 años representa el 92% del total.

1.1 Clasificación: fuente de PH y tipos de TPH

Actualmente existe la posibilidad de utilizar PH procedentes de distintos tipos de donantes y de etiologías diferentes. Este hecho ha llevado a que los alo-TPH se puedan clasificar según el tipo de donante seleccionado y la fuente de PH empleada. En cuanto a ésta, los PH pueden ser obtenidos bien: directamente de la MO mediante punción en la cresta iliaca del donante; de sangre de cordón umbilical (SCU); o de la propia sangre periférica (SP) del donante, previa administración a éste de fármacos movilizadores, como es el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). Este fármaco permite la liberación de PH de la MO al sistema circulatorio periférico, pudiéndolos así obtener del donante mediante un procedimiento de leucoaféresis. Hoy en día, el uso de

SP como fuente de PH se ha extendido debido a: que crea un menor disconfort en el donante, es más fácil su obtención, y permite una recuperación más rápida del sistema inmunológico tras el alo-TPH. Según la “*European Society for Blood and Marrow Transplantation*” (EBMT), en 2017 el 78% de los alo-TPH realizados en Europa utilizaron SP como fuente de PH (2). Por el contrario, el uso de MO como fuente de PH ha quedado limitado al tratamiento de patologías concretas como la aplasia medular. Debido a las limitaciones derivadas del escaso número de PH que proporciona el empleo de SCU, esta fuente se usa principalmente en pacientes pediátricos ya que su utilización en pacientes adultos disminuye la garantía de prendimiento del injerto.

Respecto al tipo de donante empleado en este procedimiento terapéutico, los mejores resultados se han obtenido cuando se emplean PH procedentes de un hermano con total identidad en el sistema HLA de clase I y clase II (trasplante HLA idéntico) (3). Sin embargo, sólo un 25-30% de los pacientes tienen acceso a esta posibilidad. Por ello, en los últimos años se ha instaurado otras alternativas. Una de ellas es el trasplante haploidéntico, en el cual, el donante comparte únicamente uno de los haplotipos HLA con el paciente (4). En España, en 2019 se realizaron 419 trasplantes de este tipo, representando un 50,7% del total de los realizados en donantes emparentados. La ventaja de este tipo de alo-TPH reside en que la disparidad de uno de los haplotipos HLA entre el donante y el receptor conlleva un efecto alogénico antitumoral, denominado Efecto Injerto Contra Tumor (EICT). Este mecanismo se traduce en que los linfocitos del donante ejercen una acción citotóxica contra las células neoplásicas del paciente al ser reconocidas por éstos como “extrañas” (5). Una de las herramientas más importantes que hay para seleccionar un donante compatible es el Registro Español de Donantes de Médula Ósea (REDMO). Existen en el mundo más de 33 millones de donantes, lo que hace que la probabilidad de localizar en 3 meses un donante no emparentado (DNE) sea del 79%. En España en 2019 se realizaron 471 trasplantes empleando un DNE.

1.2 Régimen de acondicionamiento

Según su intensidad y finalidad, el régimen de acondicionamiento previo al alo-TPH puede ser de dos tipos (6):

- Régimen de acondicionamiento mieloablativo. Al paciente le es administrado altas dosis de quimioterapia, consiguiendo una mayor citotoxicidad contra los

clones tumorales pero generando una mayor toxicidad. Por ello, este tipo de acondicionamiento debe ser administrado a pacientes que presenten un buen estado clínico basal.

- Régimen de acondicionamiento no mieloablativo (también denominado de intensidad reducida). A pesar de tener menor capacidad *a priori* de controlar la enfermedad, este tipo de regímenes basan su eficacia en la EICT (7), ya que provoca la eliminación de las células tumorales residuales. Además, es menos tóxico para el paciente por lo que es posible su administración a personas de mayor edad o con contraindicación de régimen mieloablativo.

1.3 Indicaciones clínicas

Las indicaciones en las que el alo-TPH es utilizado como tratamiento terapéutico se han ido ampliando con los años y en la actualidad comprenden una larga lista de patologías hematológicas neoplásicas, insuficiencias medulares y patologías congénitas (2). Las indicaciones más frecuentes son la Leucemia Aguda Mieloblástica (LAM) y Linfoblástica (LAL), las cuales, justifican más del 71% de los alo-TPH realizados en España en 2019. Es destacado también su uso en el Síndrome Mielodisplásico (SMD) y en la Leucemia Mieloide Crónica (LMC). Respecto a los síndromes linfoproliferativos, el alo-TPH es principalmente utilizado en el tratamiento de la Leucemia Linfática Crónica (LLC) y Linfoma de Hodgkin (LH). Para el tratamiento de otras patologías hematológicas frecuentes como el Linfoma no Hodgkin (LNH) y el Mieloma Múltiple (MM) se emplea principalmente el trasplante autólogo. Es importante resaltar que los alo-TPH también se emplean en enfermedades no malignas como insuficiencias medulares y errores congénitos como talasemias y otras hemoglobinopatías (8). Estas indicaciones han permanecido estables en estos últimos años.

1.4 Complicaciones post-trasplante

La mayor parte de las complicaciones que se desarrollan después de un alo-TPH se relacionan con la lesión tisular producida por los tratamientos farmacológicos empleados durante el procedimiento y con los problemas inmunológicos derivados del aloinjerto. La aparición de complicaciones depende de múltiples factores entre los que se encuentran principalmente: el tipo de alo-TPH, la patología hematológica de base y el régimen de acondicionamiento empleado. Sin embargo, es la edad del paciente la que

tiene un peso importante en este procedimiento terapéutico y en sus complicaciones asociadas. En la actualidad, existe una tendencia al alza de las neoplasias hematológicas en pacientes de mayor edad, siendo por lo tanto la subpoblación que *per se* es más susceptible de desarrollar todo tipo de complicaciones tras someterse a un alo-TPH (9).

1.4.1 Complicaciones derivadas del régimen de acondicionamiento y de la aplasia medular

Cuando se utiliza SP como fuente de PH, estas complicaciones ocurren en los primeros 14 días después del alo-TPH, tiempo que tarda habitualmente en producirse el prendimiento de los neutrófilos. La complicación más común en esta fase es la afectación gastrointestinal: mucositis, náuseas y vómitos. El síndrome de obstrucción sinusoidal (clásicamente llamado enfermedad venoclusiva hepática-VOD) caracterizado por hepatomegalia e ictericia ocurre habitualmente también en este periodo y está directamente relacionado con el régimen de acondicionamiento empleado (10). Otras complicaciones habituales son las derivadas de la aplasia medular que causan en el paciente neutropenia (definida como la reducción del recuento de neutrófilos sanguíneos), anemia y hemorragias secundarias a la plaquetopenia.

1.4.2 Complicaciones derivadas de la terapia inmunosupresora

La terapia inmunosupresora administrada durante todo el proceso del alo-TPH, que incluye tanto el uso de regímenes de acondicionamiento como agentes inmunosupresores administrados a modo de profilaxis ante el riesgo de desarrollo de Enfermedad Injerto Contra Receptor (EICR), genera en el paciente un microambiente óptimo para el desarrollo de infecciones. Por todo ello, la incidencia de complicaciones infecciosas constituye la causa más importante de fallecimiento en el alo-TPH de DNE y, en general, es la causa responsable de la muerte de un 20% de pacientes trasplantados (11, 12).

Las infecciones constituyen la complicación más importante en la primera fase post-TPH, denominada Fase I pre-prendimiento (desde el día la infusión de PH hasta el día +30), como consecuencia principalmente de: la neutropenia, el daño producido por la rotura de barreras naturales debido a la mucositis, el uso de catéteres centrales y la evidente inmunosupresión generada en el paciente (13). En esta fase pre-prendimiento después del alo-TPH, hay un claro predominio de: infecciones de origen endógeno como por ejemplo infecciones bacterianas producidas por microorganismos como

Staphylococcus spp. que causan episodios de sepsis, bacteriemia y neumonía; infecciones fúngicas causadas por *Candida spp.*; e infecciones víricas causadas por Virus Herpes simple (VHS). Cuando la neutropenia es severa en esta fase, aumenta el riesgo y la gravedad de sufrir estas infecciones, principalmente bacterianas y micóticas.

En la Fase II post-prendimiento, desde el día +30 hasta el +100 post-TPH, se producen las principales complicaciones infecciosas relacionadas directamente con la aparición de EICR aguda y con un retraso en la reconstitución inmunológica del paciente. Predominan en esta fase las infecciones víricas, causadas fundamentalmente por virus de la familia *Herpesviridae*. Tanto las infecciones fúngicas desarrolladas por la presencia de *Pneumocystis jirovecii* y *Aspergillus spp.* como las infecciones parasitarias originadas por *Toxoplasma gondii* (14), se desencadenan en menor grado en los pacientes cuando se comparan con las infecciones virales.

En la Fase III o tardía, posterior al día +100 post-TPH, tiene lugar una insuficiencia de inmunoglobulinas (Ig), lo que hace que los pacientes sean especialmente susceptibles a infecciones por bacterias encapsuladas como *Haemophilus influenzae*. El retraso en la reconstitución inmunológica después del trasplante es el principal factor que compromete la aparición de complicaciones infecciosas en esta fase.

Los principales agentes infecciosos que pueden aparecer en el paciente en cada fase post-TPH son presentados en la Figura 1.

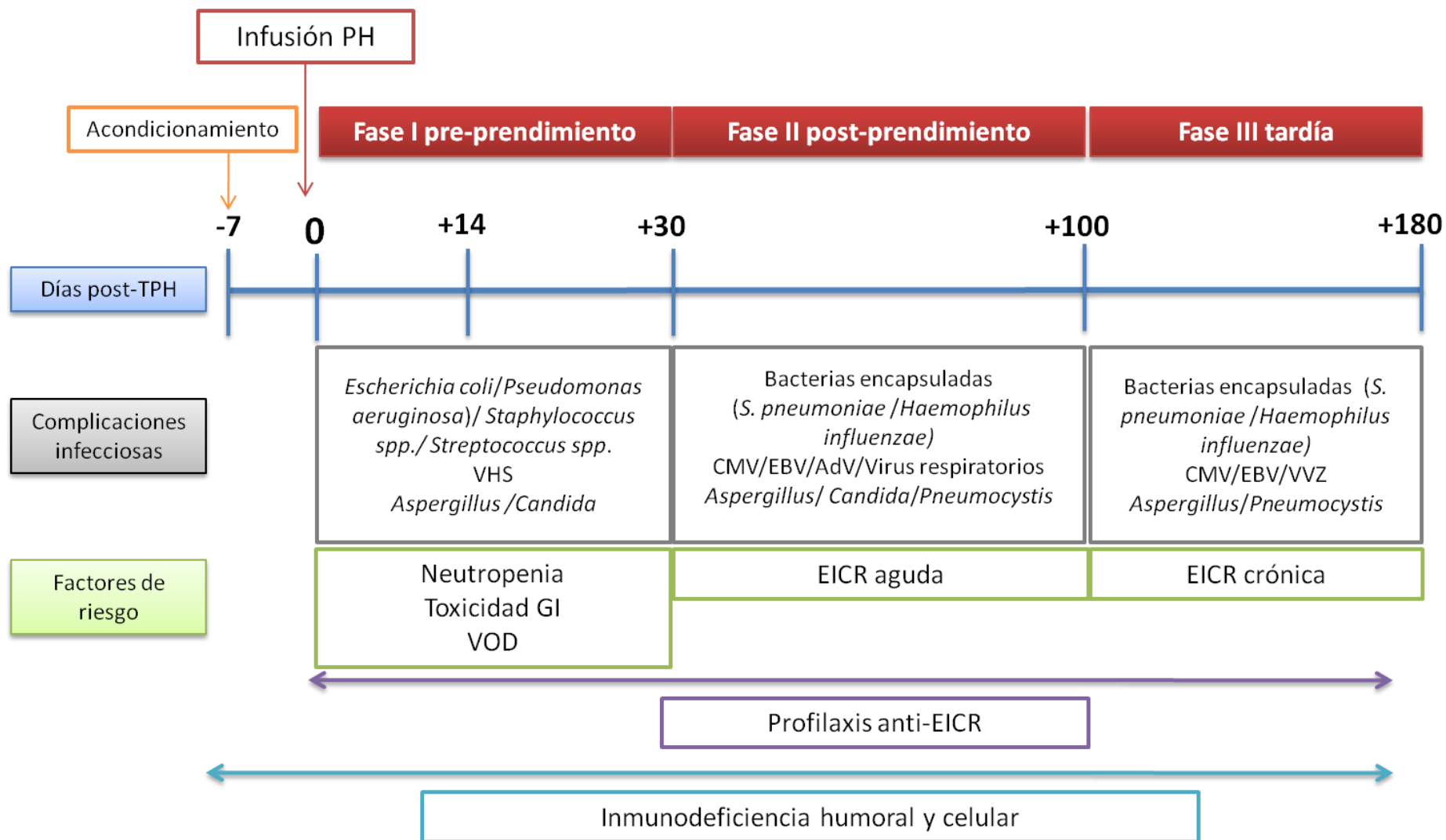


Figura 1. Fases post-TPH, factores de riesgo y agentes infecciosos destacados en cada fase.

De una manera más detallada y en función de su naturaleza, los principales agentes infecciosos que habitualmente aparecen en este tipo de pacientes son presentados a continuación:

a) Infecciones bacterianas

Las infecciones bacterianas son generalmente causadas por microorganismos oportunistas y la localización es variable, siendo frecuentes la aparición de fiebre sin foco infeccioso, infecciones pulmonares e infecciones de piel y mucosas. El 90% de estas infecciones ocurren en la fase de neutropenia post-TPH (Figura 1) lo que hace necesario medidas de aislamiento estrictas del paciente y el uso de antibióticos de manera profiláctica (15). Engloban principalmente bacteriemias por *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* y *Clostridium difficile* así como otras infecciones causadas por Bacilos Gram Negativos (BGN) como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Después de la fase de neutropenia y de forma directamente relacionada con la presencia de EICR, aparecen bacteriemias producidas por bacterias encapsuladas como *S. pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*.

b) Infecciones víricas

Las infecciones víricas ocurren habitualmente entre el día del trasplante y el día +90 aunque se han observado reactivaciones virales posteriores al día +100 acompañadas de un retraso funcional en la reconstitución inmunológica (16). Entre las infecciones post-TPH, cabe destacar las causadas por los virus de la familia *Herpesviridae*, en las que tras una infección primaria el genoma viral permanece latente en el huésped, pudiendo reactivarse y generar nuevas infecciones durante los períodos de inmunodepresión del paciente. El establecimiento en la práctica clínica de una pauta profiláctica de tratamiento farmacológico con Aciclovir, ha evitado las recidivas de VHS y Virus Varicela-zóster (VVZ). En el periodo previo a la introducción de esta terapia antiviral, estas infecciones ocurrían respectivamente en el 70% y el 40% de los pacientes (17). Respecto a otros virus de la familia *Herpesviridae*, se ha conseguido reducir la morbi-mortalidad asociada a infecciones por Citomegalovirus (CMV) o virus Epstein-Barr (VEB) gracias a la introducción de estrategias de monitorización rutinaria de la carga viral en SP que permiten en el caso de que se requiera instaurar un tratamiento anticipativo o “pre-emptive”. De estos virus se hablará en detalle posteriormente.

Entre las infecciones causadas por *Enterovirus*, destacan el Adenovirus (AdV) (cuya problemática en el alo-TPH se desarrollará posteriormente), Coxsackie y Rotavirus, los cuales, son los principales causantes de diarrea. Los virus respiratorios como Virus Respiratorio Sincitial (VRS), Parainfluenza e Influenza pueden afectar a los pacientes sometidos a alo-TPH con una frecuencia y período de aparición que coincide con el mismo patrón observado en la población sana general. En la actualidad, con la introducción en la práctica clínica del trasplante haploidéntico, en el que como parte de la profilaxis frente a la EICR se emplea altas dosis de Ciclofosfamida post-trasplante (Cy-PT), se ha descrito un aumento de la incidencia de infecciones por virus BK (18). La monitorización de este virus causante de episodios de cistitis hemorrágica tras el alo-TPH no está recomendada en las guías clínicas debido principalmente a que no existe una terapia efectiva. Sin embargo, Papadopoulou y col. han descrito la completa resolución de los síntomas derivados de esta infección en 5 de los 7 pacientes a los que se infunde inmunoterapia adoptiva con linfocitos T (LT) memoria específicos de este virus (19). El retraso en la reconstitución inmunológica después del trasplante además de la aparición de EICR y el uso de regímenes de acondicionamiento mieloablativos también favorecen la aparición de infección por este virus (20).

c) Infecciones fúngicas

Aspergillus fumigatus (AF) es el agente fúngico que mayoritariamente causa infección fúngica invasiva (IFI) en receptores de alo-TPH, con valores atribuibles de mortalidad entorno al 70-95% a pesar de la evolución en los tratamientos antifúngicos (21). Esta complicación infecciosa se observa en un 5-15% de los trasplantes alogénicos teniendo una incidencia documentada en España del 8.3% (22). La profilaxis primaria es la única estrategia de manejo de las infecciones fúngicas que ha demostrado disminuir la mortalidad global y la mortalidad relacionada con IFI. Por ello, a todos los pacientes sometidos a alo-TPH debe administrarse profilaxis antifúngica con fármacos derivados de azoles como Posaconazol, Itraconazol o Voriconazol. Recientemente, otros fármacos como Caspofungina o Micafungina han demostrado su utilidad como profilaxis antifúngica, sobre todo en el trasplante haploidéntico que emplea Cy-PT (23).

El riesgo de aparición de la infección por AF, denominada Aspergilosis invasiva (AI) sigue una distribución bimodal con un primer pico durante la fase de neutropenia y un segundo, alrededor del día +100 en aquellos pacientes con EICR. Se consideran, por

tanto, pacientes de alto riesgo de desarrollo de AI los receptores de alo-TPH que padecen EICR. Además, la reactivación de CMV en el período posterior al trasplante se ha asociado con un riesgo casi 4 veces mayor de desarrollo de AI de inicio tardío (24). Recientemente se ha descrito que es necesaria la completa reconstitución de la inmunidad celular T para la disminución de la incidencia de infección fúngica post-TPH (16). En todos los pacientes sometidos a trasplante alogénico, se realiza bisemanalmente la detección en suero del antígeno de Galactomanano (GM) de AF. A pesar de que esta técnica ha demostrado una sensibilidad y especificidad superior al 90% para el diagnóstico de AI, con la introducción en la práctica clínica de los nuevos fármacos antifúngicos ha mostrado grandes limitaciones, principalmente por una alta frecuencia de falsos positivos y negativos (25, 26). Esta profilaxis antifúngica tiene implicaciones directas sobre la utilidad de estos biomarcadores, describiéndose una disminución de la sensibilidad de las técnicas diagnósticas como GM.

Respecto a otras infecciones fúngicas producidas por *Candida spp.*, su incidencia ha disminuido como resultado del uso de antifúngicos, principalmente fluconazol, como tratamiento profiláctico. Otros hongos que aparecen con menos frecuencia son *Fusarium spp.*, y *Mucor spp.*

1.4.3 Enfermedad injerto contra receptor: tipos, profilaxis y tratamiento

La EICR es la complicación principal del alo-TPH y consiste en un grupo de manifestaciones clínicas e histológicas que aparecen como consecuencia de la reacción inflamatoria secundaria al reconocimiento y destrucción de autoantígenos en el receptor a cargo de las células inmunocompetentes del donante. Concretamente, es mediada por los LT del donante que son activados por las células presentadoras de antígeno (CPA) del receptor. Clínicamente, se caracteriza por daño tisular que afecta principalmente a piel, hígado e intestino.

Clásicamente, la EICR se clasificaba en aguda, caracterizada por la aparición de manifestaciones clínicas previas al día +100 post-TPH, y crónica; con clínica posterior a ese día (27). Sin embargo, esta definición puramente temporal, se ha sustituido por una nueva clasificación que añade dos nuevos estadios: la EICR aguda de tipo persistente, recurrente o de inicio tardío, con manifestaciones de tipo agudo posterior al día +100 y el “síndrome de solapamiento” que contempla la presencia de características clínicas de EICR aguda y crónica de forma simultánea (28). La incidencia de EICR aguda es

variable dependiendo de diversos factores, siendo fundamental la disparidad HLA entre donante y receptor, pasando de una incidencia del 35-45% en receptores de PH de hermano HLA idéntico al 60-80% en DNE (29). La EICR crónica, por su parte, es la principal causa de muerte no relacionada con la recaída después del alo-TPH. Sus principales factores de riesgo son la edad y la historia previa de EICR aguda.

Un factor clave en la prevención de la aparición de EICR, es la profilaxis empleada después del alo-TPH. Los esfuerzos van encaminados a evitar la aparición de EICR aguda, ya que es el principal desencadenante de EICR crónica. Según la EBMT, existen diferentes esquemas de profilaxis frente a EICR clasificados principalmente en función del tipo de acondicionamiento empleado (30).

En relación al régimen de acondicionamiento mieloablativo, la pauta clásica de profilaxis anti-EICR es la combinación de Ciclosporina (CsA) y Metotrexato (MTX). En los últimos años se ha sustituido el uso de CsA por Tacrolimus (Tac). El mecanismo de acción de CsA y Tac es la inhibición de la producción de IL-2, cuyo papel es fundamental en la diferenciación y proliferación de los LT citotóxicos. La administración de CsA o Tac se inicia el día previo al trasplante y se mantiene aproximadamente hasta el sexto mes post-TPH en ausencia de EICR. CsA se administra a dosis de 4,5mg/kg/12h con el objetivo de alcanzar una concentración sanguínea de 200–400ng/mL mientras que Tac se administra habitualmente a 0,15mg/kg/día para alcanzar una concentración de 5-15ng/mL (31). El MTX fue el primer fármaco evaluado en la profilaxis para EICR. Es un antagonista del ácido fólico con capacidad citotóxica, que a dosis bajas produce efectos antiinflamatorios mediante la atenuación de los LT. Habitualmente se suele administrar este fármaco a dosis de 15mg/m² en el día +1 y tres dosis de 10mg/m² en los días +3, +6 y +11. La administración de MTX requiere rescate con Leucovorin por sus efectos adversos (32).

Respecto a los regímenes de acondicionamiento de intensidad reducida, el tratamiento estándar profiláctico frente a EICR es CsA en combinación con Micofenolato de mofetilo (MMF). El MMF es un pro-fármaco del ácido micofenólico, que administrado a dosis de 20mg/kg, inhibe la síntesis de purinas en los LT al inhibir la enzima inosina monofosfato deshidrogenasa. Este fármaco se administra aproximadamente durante el primer mes después del alo-TPH (33).

Por otra parte, la globulina antitimocítica (ATG) se emplea en el trasplante de DNE y su administración está indicada tanto en regímenes mieloablativos como de intensidad reducida. Actualmente, un 75% de los centros han introducido el uso de ATG peri-condicionamiento en sus protocolos clínicos. ATG es un fármaco inmunosupresor obtenido de animales hiperinmunizados (caballos o conejos) con linfocitos procedentes de timo humano. La administración de ATG a dosis de 2,5mg/kg/día desde el día -4 al -2 (o -1) previo al trasplante produce la apoptosis de linfocitos dependiente del sistema de complemento (34).

Por último, se está extendiendo el uso de la Cy-PT a dosis de 50mg/kg los días +3 y +4 post-TPH. Este agente alquilante basa su actividad en la eliminación de las células aloreactivas, mientras que conserva la funcionalidad de los PH por lo que no se daña ni el injerto ni afecta a la reconstitución inmune (35). El uso de la Cy-PT está indicado en el trasplante haploideéntico pero hay abierta una interesante línea de investigación que analiza su papel en otros tipos de trasplante. En este sentido, el trasplante haploideéntico es una estrategia prometedora debido a su baja tasa de EICR, siendo esta complicación de curso leve y con una muy buena respuesta al tratamiento de primera línea (36).

A pesar de todas estas medidas farmacológicas profilácticas, un 30% de los pacientes desarrollan EICR después del alo-TPH requiriendo tratamiento con corticoides. El mecanismo de acción de estos fármacos consiste en la inhibición de la producción de citoquinas inflamatorias a través de la regulación de su actividad linfocitaria.

1.4.4 Fallo de injerto

Se define el fallo de injerto primario como la falta de recuperación hematológica en dos o más series celulares a los 28 días del alo-TPH, sin datos de recaída tumoral. El fallo de injerto secundario se caracteriza por citopenias en dos o más series celulares de forma persistente a pesar de una recuperación hematológica inicial. Ambos tipos de fallo de injerto se pueden relacionar con la toxicidad farmacológica, infecciones o aparición de EICR. Las medidas adoptadas habitualmente son: supresión precoz de la profilaxis frente a EICR, administración de G-CSF e infusión de linfocitos de donante (37).

2. Virus objeto de estudio por su implicación en el trasplante alogénico

2.1 Citomegalovirus

El CMV es un virus de la familia *Herpesviridae* cuya infección tiene una alta prevalencia mundial, aproximadamente un 60% en los países desarrollados, en los que la infección primaria suele ser asintomática. En pacientes sometidos a alo-TPH, la infección por CMV aparece en el 70-80% de los receptores, en la mayoría de casos, por reactivación del virus latente en el paciente entre el día del trasplante y el día +120. La infección por este virus puede causar infecciones pulmonares, hepáticas, digestivas o del sistema nervioso central siendo la neumonía la manifestación clínica más frecuente, con una mortalidad sin tratamiento del 50-70% (38).

La infección por CMV después del trasplante alogénico tiene una incidencia variable dependiendo de múltiples factores de riesgo, entre los cuales destacan la positividad serológica del receptor y la aparición de EICR. Los pacientes con serología negativa para CMV (R-) tienen menor riesgo de padecer esta complicación post-TPH cuando el donante tiene la serología positiva (D+) mientras que los pacientes con serología positiva (R+) trasplantados con donantes CMV- (D-) pierden la protección derivada del donante ya que no le aporta LT específicos de CMV, con un riesgo aumentado de sufrir reactivación por dicho virus (39, 40). Por esta razón, las guías clínicas recomiendan buscar un donante de acuerdo al status serológico del paciente, ya que cuando la serología donante/receptor es positiva, la reconstitución inmune es más rápida y con un riesgo menor de sufrir reactivaciones por CMV (41). Igualmente, los R+ que reciben injerto con depleción de LT o selección positiva de células CD34+, tienen un riesgo particularmente alto de desarrollar infección por CMV.

A pesar de la alta morbi-mortalidad asociada al CMV post-trasplante, se han logrado importantes avances en la prevención de esta infección vírica con la introducción de las estrategias de tratamiento anticipado en el alo-TPH (42). Este abordaje ha conseguido disminuir la incidencia de infección tisular por CMV. Según la *European Conference on Infections in Leukaemia*, todos los pacientes sometidos a alo-TPH deben ser monitorizados al menos semanalmente mediante la determinación en SP del Ag pp65 o del ADN de CMV mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta monitorización debe mantenerse como mínimo hasta el día +100 post-TPH y continuar en caso de EICR, infección por CMV y trasplante de DNE (43). Cuando se constata la

presencia de ADN vírico acompañado de signos o síntomas atribuibles al virus, se puede hablar de enfermedad por CMV (44).

Durante las últimas décadas, Ganciclovir ha sido el fármaco comúnmente utilizado en el tratamiento anticipado de la infección por CMV en el alo-TPH, a pesar de la importante toxicidad hematológica que genera. Foscarnet constituye una alternativa terapéutica en caso de ineficacia o resistencia a Ganciclovir aunque sus efectos adversos a nivel de la función renal y/o alteraciones hidroelectrolíticas son frecuentes. El empleo de nuevos fármacos como Letermovir supondrá un cambio en el abordaje de este virus ya que ha demostrado en ensayos clínicos un buen control del virus con escasa toxicidad (45). Esta estrategia de manejo del CMV post-trasplante contribuye a reducir el impacto económico que supone una infección por este virus en el paciente trasplantado, tal y como ya ha sido demostrado recientemente por Robin C y col. quienes han descrito como dos o más episodios de CMV aumentan en un 25-30% los gastos derivados del trasplante (46).

2.2 Virus Epstein-Barr

El VEB es un virus de la familia *Herpesviridae*, con una prevalencia aproximada del 90% en la población adulta sana. Este virus tras la infección primaria permanece latente en los linfocitos B (LB) reactivándose durante los períodos de inmunodepresión, pudiendo causar un Síndrome Linfoproliferativo Post-Trasplante (SLPT) como consecuencia del tropismo del VEB por los LB del donante tras el trasplante. Este fenómeno ocurre típicamente en los primeros 6 meses post-TPH, hecho anterior a la reconstitución inmune de LT específicos de VEB (47). La incidencia del SLPT post-TPH es aproximadamente del 4% y se presenta con una gran variedad de síntomas y signos que pueden ir desde la fiebre y la presencia de un síndrome mononucleósico hasta el desarrollo de pancitopenia que puede progresar rápidamente a linfoma, con una mortalidad asociada del 80%. Se consideran factores de riesgo del SLPT post-TPH: disparidad HLA, discrepancia serológica donante/receptor, presencia de EICR, depleción de células T y regímenes de acondicionamiento de intensidad reducida, que permiten la presencia de células B residuales (48).

En los pacientes con alto riesgo de sufrir reactivación del virus se monitoriza semanalmente el ADN de VEB mediante PCR hasta el cuarto mes post-TPH, así como los signos y síntomas clínicos que puedan atribuirse al SLPT (49). La monitorización

del ADN viral es fundamental para prevenir el desarrollo del SLPT. Wagner HJ y col. han demostrado que el 50% de los pacientes con una carga viral de VEB >4000 copias/ μ g en SP desarrollaban SLPT (50). Por tanto, la presencia de ADN vírico sin síntomas clínicos se considera indicación de terapia con Rituximab (anticuerpo monoclonal anti-CD20) con una pauta de administración semanal hasta presentar negatividad del ADN (51). Las deficiencias en la reconstitución inmune de LT y LB post-TPH se asocian con el desarrollo del SLPT (52). Otras reactivaciones víricas, como las causadas por CMV están estrechamente relacionadas con la reactivación por VEB y con el riesgo de sufrir SLPT. También el retraso en la recuperación de LT CD4-CD8-post-TPH se asocia a una mayor tasa de reactivación por VEB (53).

2.3 Adenovirus

La reactivación por AdV tras el alo-TPH puede cursar como una infección asintomática, enfermedad localizada (cistitis hemorrágica, colitis o neumonía) y/o enfermedad diseminada. La incidencia oscila entre un 5-40% de los pacientes que reciben un alo-TPH. Tiene lugar aproximadamente hasta el día +90 después del trasplante y se asocia con una mortalidad del 20-80% de los casos (54). Actualmente, no existe consenso sobre la monitorización de la viremia en pacientes post-TPH debido, principalmente, a la baja incidencia de este virus. Sin embargo, la *European Conference on Infections in Leukemia* recomienda monitorizar semanalmente ADN de AdV mediante PCR en los pacientes con al menos uno de los siguientes factores de riesgo: depleción de LT en el injerto, EICR, linfopenia y trasplante de SCU (55). Otros autores recomiendan la monitorización a todos los pacientes post-TPH, ya que se ha descrito una correlación entre la carga viral y la mortalidad asociada a enfermedad por AdV (56). Una severa linfopenia con un valor <300 linfocitos/ μ L en SP en el momento de la detección del virus es indicativo de desarrollo de enfermedad por AdV (57). Del mismo modo, recuentos de LT CD4+ <0,15 $\times 10^9$ /L en SP en los primeros 3 meses post-TPH se consideran factor de riesgo de desarrollar adenoviremia (58).

El único fármaco antiviral aceptado para el tratamiento de la infección por AdV es el Cidofovir. Sin embargo, hay estudios que demuestran que la resolución del virus con este fármaco solo ocurre en pacientes que recuperan la funcionalidad de LT durante el tratamiento (59). Las opciones terapéuticas para la resolución de la infección en caso de fallo del tratamiento (incremento de la carga viral > 1 log/semana) pasan por la infusión

de linfocitos del donante y por avances en la investigación de los LT específicos de AdV (60).

3. Reconstitución inmunológica post-TPH

El éxito del trasplante alogénico depende del equilibrio dinámico que se establece entre las fuerzas inmunes del donante y el receptor. El nuevo sistema inmunológico adquirido por el receptor tras el alo-TPH debe ser capaz de defender al paciente de las complicaciones infecciosas que pueda sufrir en el periodo post-trasplante. La reconstitución inmunológica después del alo-TPH está mediada por multitud de mecanismos celulares y moleculares complejos y dinámicos que comienzan con la recuperación de la inmunidad innata en las primeras semanas post-TPH. Mientras que habitualmente en el primer mes post-TPH la subpoblación de células *Natural Killer* (NK) es la primera en reconstituirse, la normalización de la subpoblación de LT CD8+ puede requerir hasta un año, y la de los LT CD4+ y LB puede durar hasta los dos años (61).

3.1 Factores que influyen en la reconstitución inmune después del alo-TPH

La duración de este proceso depende tanto de factores intrínsecos del paciente como son la edad, funcionalidad del timo y patología de base como de otros relacionados con el propio trasplante. Clásicamente, los principales factores que influyen en la reconstitución inmunológica son (62):

- Fuente de PH. Los injertos procedentes de SP incluyen 10 veces más células linfoides T y B que los productos de MO, lo que influye especialmente en la reconstitución de los LT CD4+ (63). El trasplante SCU contiene menor cantidad de PH por lo que su cinética de prendimiento es más lenta, con escasa respuesta antigénica y un mayor número de infecciones asociadas (64).
- Concentración de células linfoides infundidas en el injerto. Los LT maduros infundidos sobreviven en el receptor durante meses, mejorando la respuesta frente a agentes infecciosos.
- Edad del receptor. Factor relacionado fuertemente con la capacidad tímica residual. La reconstitución inmunológica dependerá del timo a partir del sexto mes post-TPH (65).

- Intensidad del régimen de acondicionamiento. Los acondicionamientos de intensidad reducida producen menor daño tímico comparados con los mieloablativos y con aquellos que incluyen radioterapia o fármacos con actividad anti-LT. Un menor daño en este órgano conlleva una mejor reconstitución de los LT vírgenes (66).
- Serología CMV. Como se ha comentado anteriormente, cuando donante y receptor poseen serología positiva para CMV, el paciente recibe LT específicos frente a este virus, lo cual, deriva en una menor tasa de reactivación y una más rápida reconstitución inmunológica (67).
- EICR. La presencia de EICR produce daño tímico. Además, los fármacos inmunosupresores utilizados para su tratamiento también influyen en la anómala reconstitución inmunológica de estos pacientes.

En este sentido, Itzykson y col. han monitorizado 77 pacientes sometidos a alo-TPH durante 24 meses con el objetivo de determinar los principales factores que influyen en la reconstitución de las subpoblaciones inmunológicas de LT, incluidos los LT reguladores (LTreg), LB y células NK. Curiosamente, los factores que afectan en mayor medida son la serología de CMV y la replicación de éste, seguido de la linfopenia y el desarrollo de una EICR (68).

3.2 Reconstitución de la inmunidad innata

3.2.1 Neutrófilos

En general, la mayoría de componentes del sistema inmunitario innato se reconstituyen con relativa rapidez y competencia en el periodo después del alo-TPH. Después del trasplante, los pacientes entran en una fase de aplasia caracterizada por una neutropenia grave hasta que la cifra de neutrófilos se recupera. La dosis total de células nucleadas y de células CD34+ infundidas con el injerto afecta a la cinética de reconstitución de neutrófilos. Los neutrófilos suelen alcanzar niveles por encima de 500/ μ L aproximadamente en el día +14 tras un trasplante de SP, en el +21 tras un trasplante de MO y algo más de 30 días en un trasplante de SCU.

3.2.2 Células Natural Killer

Las células NK se recuperan de forma temprana tras un alo-TPH, alcanzando niveles normales aproximadamente en el primer mes. Las células NK se definen por la expresión de los antígenos de superficie CD16 y CD56, y por la ausencia de expresión de CD3. En relación a la expresión de CD56, las células NK se diferencian en dos grandes subpoblaciones:

- Células NK CD56^{bright}. Es la primera subpoblación de células NK en aparecer después del alo-TPH, representando un 10% del total de células NK. Presentan un fenotipo inmaduro y su función principal es la de producir citoquinas inmunorreguladoras. Son las células precursoras de las NK CD56^{dim}, por lo que tras esta primera expansión (aproximadamente en el primer mes), su número comienza a descender, aunque pueden persistir hasta un año tras el alo-TPH (69).
- Células NK CD56^{dim}. Representan un 90% del total de NK, tienen fenotipo maduro y expresan marcadores característicos de esta subpoblación: NKG2C, NKG2D, etc. Son más efectivas que las anteriores en citotoxicidad directa (Granzyma B⁺Perforina⁺) y toxicidad mediada por anticuerpos. Respecto a la reconstitución post-TPH, NK CD56^{dim} recuperan la expresión del receptor de activación NKG2C de 3 a 6 meses después del alo-TPH (70). Este proceso se ve favorecido por la presencia de LT maduros procedentes del donante (71).

En general, entre 6 meses y 1 año después del alo-TPH el fenotipo NK del receptor es normal, similar al del donante. El retraso funcional en la reconstitución inmune post-TPH de las células NK se relaciona con una mayor incidencia de EICR y mayor riesgo de sufrir infecciones virales (72). La actividad efectora de las células NK está regulada por el balance entre señales de activación y de inhibición como resultado de la expresión de moléculas KIR (*Killer Immunoglobulin-like Receptor*) en su superficie. La compatibilidad donante/receptor en el genotipo de receptores KIR se ha asociado con una mayor supervivencia, menor tasa de mortalidad y menor incidencia de reactivaciones víricas (73). Las células NK también pueden intervenir en el control de la activación linfocitaria regulando, a través de diversos mecanismos, la aparición de episodios de EICR crónica (72). La reconstitución temprana de esta subpoblación se ha relacionado también con una mayor supervivencia global de los pacientes trasplantados (72, 74).

3.2.3 Células dendríticas

Las células dendríticas (DC) son las CPA por excelencia cuya función principal consiste en procesar y presentar antígenos a las subpoblaciones que componen la inmunidad adaptativa, principalmente los LT. Esta subpoblación tiene una recuperación lenta después del trasplante y, aunque se pueden detectar en las primeras semanas después del alo-TPH, no recuperan su correcta funcionalidad hasta el año (75). Esta subpoblación se subdivide en DC de linaje mielóide (CD11c+), conocidas como mDC, y CD plasmacitoides, de linaje linfóide CD11c-. Para ejercer su función, las DC, deben activarse, madurar y migrar hacia los órganos linfoides más cercanos. La competencia funcional de estas mDC todavía no se ha dilucidado en el contexto del alo-TPH.

3.3 Reconstitución inmunidad adaptativa

La recuperación de la inmunidad adaptativa B y T tras el trasplante alogénico puede requerir hasta 2 años para poder alcanzar recuentos normales y una funcionalidad completa. Esto es debido a tres factores principalmente: el daño producido sobre el timo por el régimen de acondicionamiento, la pobre función tímica residual que existe en el sujeto adulto y la escasa cantidad de precursores linfoides infundidos con el injerto. Aunque esta clasificación es mucho más compleja de lo que a continuación se indica, debido a que no es el objeto de nuestro estudio, podemos clasificar de forma general los linfocitos en tres estadios madurativos: linfocitos vírgenes o naïve, derivados de los órganos primarios de linfopoyesis, y que aún no han tenido contacto antigénico, linfocitos memoria y linfocitos efectores que tras el contacto con el antígeno son capaces de desarrollar una respuesta antígeno-específica.

3.3.1 LT

Como se ha comentado previamente, el órgano fundamental para la reconstitución inmunológica de los LT es el timo, y su funcionalidad después del alo-TPH condiciona la recuperación de estas células. Los regímenes de acondicionamiento utilizados, la edad del paciente y el desarrollo de EICR son devastadores para la función del timo post-TPH (76). La reconstitución de la función hematopoyética del timo después del alo-TPH va a permitir la producción de LT CD4+ o colaboradores, LT CD8+ o citotóxicos y LTreg.

Tras realizarse el injerto de los PH en el paciente, se produce una primera fase de expansión de los LT memoria (CD45RO+) infundidos. En los primeros 6 meses post-trasplante la reconstitución linfóide T se realiza de forma timo-independiente, mediante la proliferación rápida de las células linfoides T maduras residuales del paciente y/o las infundidas con el injerto (77). Así, en las primeras semanas se observa una expansión de células T memoria CD8+, con una expansión inferior de LT CD4+ conllevando una inversión del cociente CD4+/CD8+ que posteriormente se restablecerá a partir de los 3-6 meses. Sin embargo, la respuesta inmune generada por estas células tendrá un repertorio de reconocimiento antigénico limitado (77).

A partir de los 6 meses, la reconstitución inmune es timo-dependiente y se manifiesta por la aparición de recuentos significativos de LT naïve y de un amplio repertorio de receptores de células T (TCR). En este punto, comienza la expansión de LT inmaduros (CD45RA+ o CD45RO-CD27+), derivados de las células progenitoras del donante, que poseen un repertorio amplio de TCR, por lo que serán capaces de producir una respuesta inmune más adecuada y específica (76). La duración de esta segunda fase depende tanto del daño realizado al timo durante el trasplante como por: la intensidad del tratamiento de acondicionamiento, el tratamiento con glucocorticoides por una EICR y el desarrollo de infecciones que pueden infectar las células epiteliales del timo limitando la funcionalidad de las mismas. La reconstitución inmune completa de origen timopoyético no se completa hasta 3-5 años después del alo-TPH, pero puede continuar afectada de manera indefinida según las características del paciente. En la Figura 2 se resume la reconstitución inmunológica del LT tras un alo-TPH. Recientemente se han desarrollado estrategias para mejorar la función del timo post-TPH como la administración exógena de IL-7 que, además de favorecer la timopoyesis, aumenta la proliferación de LT maduros (77).

Los LTreg tienen un papel fundamental en el establecimiento de la EICR y las alteraciones en su reconstitución post-TPH contribuyen a este fenómeno, asociándose cuadros más severos de EICR a un menor número de LTreg (78). Esta subpoblación inmunoreguladora expresa altos niveles de receptor de IL-2. Kennedy-Nasser AA y col. han publicado que, tras administrar IL-2 a pacientes en el período post-TPH, observan una expansión *in vivo* de la subpoblación LTreg regulada por la expresión de la proteína PD-1 y que se asocia a una menor incidencia de infecciones virales y EICR (79).

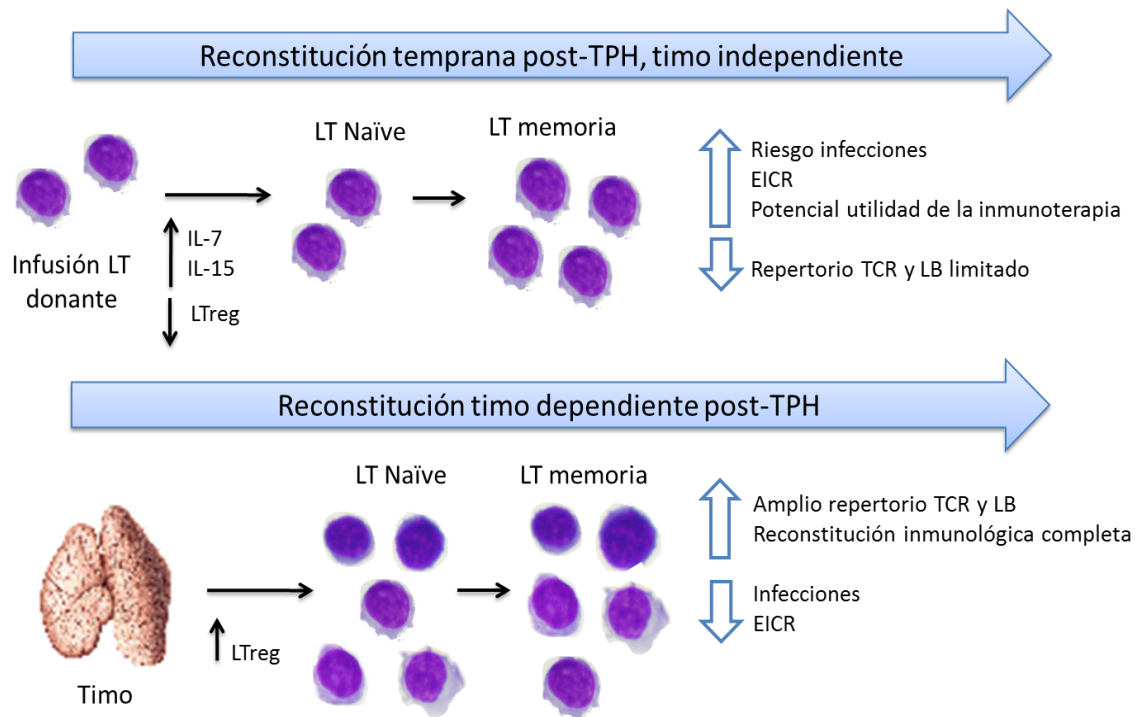


Figura 2. Representación esquemática de la reconstitución de LT. Adaptado de Williams KM y col. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2008; 21(3):579-96. (80)

3.3.2 LB

Los recuentos de LB tras el alo-TPH están disminuidos en los primeros meses, con un aumento posterior por encima de los niveles normales durante los primeros 1-2 años. El fenotipo inicial de los LB post-trasplante es naïve, mientras que la reconstitución de las células memoria puede tardar hasta 5 años (81). La primera Ig en recuperar niveles anteriores al trasplante es la IgM (2-6 meses), posteriormente aparece la IgG (3-18 meses) y finalmente se reconstituyen los niveles de IgA (hasta 3 años). A pesar de la expansión de los LB, la capacidad funcional permanece comprometida durante 2 años después del alo-TPH. Este fenómeno se ha atribuido a la defectuosa inmunidad T durante este período de tiempo, especialmente debido a una insuficiente señalización de LT CD4⁺ para estimular la maduración de las células B naïve (82). Esta disminución de la funcionalidad de LB deriva en una respuesta alterada e insuficiente tras la administración de vacunas a los pacientes que han recibido un alo-TPH.

4. Reconstitución inmunológica específica de virus post-TPH

El retraso en la reconstitución inmunológica después del alo-TPH influye directamente en la aparición de complicaciones infecciosas a partir del día +100 después del trasplante alogénico. Tal y como se ha descrito previamente, a pesar de que los LT memoria provenientes del donante o de células del paciente que han resistido el régimen de acondicionamiento, son esenciales para una respuesta rápida y eficaz a una infección vírica, la clave para la recuperación de la respuesta inmunológica post-TPH específica de virus son los LT inmaduros ya que proporcionan el amplio repertorio de TCR necesario para controlar una amplia variedad de patógenos (83).

La monitorización de esta respuesta de LT específicos de virus ha permitido durante los últimos años conocer los valores numéricos asociados a una respuesta protectora en este tipo de pacientes. Sin embargo, hasta el momento no se ha establecido un valor umbral que pueda ser utilizado de manera estandarizada en la práctica clínica. Este campo ha sido ampliamente explorado para la infección por CMV pero no tanto para otras infecciones víricas como VEB y AdV.

Actualmente, el aislamiento de LT específicos de virus de un donante sano y su infusión en el receptor es una técnica en auge que se conoce como transferencia adoptiva de LT específicos de antígeno. Esta técnica es considerada una opción terapéutica factible y bien tolerada, que representa un procedimiento rápido y eficaz para la reconstitución inmunológica específica de virus post-TPH (84). Desde el inicio de esta técnica, el 74% de los 246 pacientes evaluados han resuelto la infección vírica tras el tratamiento con inmunoterapia adoptiva con LT CD4+ y con CD8+ específicos de antígeno. Concretamente, el 85/62/74% de los pacientes resolvieron la infección tras la transferencia de LT específicos de CMV/VEB/AdV, respectivamente (85). En este sentido, se han publicado también los primeros resultados de la infusión simultánea de LT específicos de múltiples virus producidos con la nueva tecnología “*CliniMACS Prodigy System*”, sistema automatizado de purificación, selección y expansión de LT antígeno-específicos (86). Tanto estos tratamientos específicos de virus como su monitorización exigen disponer de equipamiento de laboratorio específico y de tecnología con suficiente sensibilidad para la detección de las respuestas inmunológicas antivirales desarrolladas.

4.1 LT activados por CMV

En base a las diferentes tecnologías desarrolladas para la determinación de LT específicos de CMV, se puede asegurar que la presencia de un nivel determinado de LT citotóxicos (CD8+) específicos de CMV (CTL^{CMV}) protege frente a la infección por CMV (87). Varios estudios han demostrado que tener bajo control la infección por CMV post-TPH requiere la reconstitución de esta subpoblación de CTL^{CMV}. Concretamente, Borchers y col. han monitorizado los CTL^{CMV} de 278 pacientes durante un año llegando a la conclusión que 1 CTL^{CMV}/μL en SP entre el día +50 y +75 post-TPH es suficiente para discriminar los pacientes que sufrirán o no reactivación por CMV en el grupo R+/D+ (88). Cwynarski y col. por su parte, han estudiado 24 receptores de alo-TPH llegando a la conclusión que la recuperación de CTL^{CMV} por encima de 10x10⁶/L está asociada con protección a enfermedad por CMV (89). Gratama y col. han afirmado que un nivel inferior a 7 CTL^{CMV}/μL durante los primeros 65 días después del alo-TPH es un factor de riesgo de complicaciones relacionadas con CMV (90). La recuperación de la subpoblación de CTL^{CMV} después del trasplante alogénico es, por tanto, un marcador de protección de reactivaciones por CMV. Sin embargo, no se ha establecido aún un valor umbral de consenso que defina futuras reactivaciones víricas en un paciente trasplantado. La reconstitución de esta subpoblación de CTL^{CMV} después del alo-TPH se ha relacionado también con un menor riesgo de recaída tumoral según el estudio publicado recientemente por Varanasi PR y col (91).

Respecto a la reconstitución de la subpoblación de LT CD4+ específicos de CMV, ésta tiene lugar de forma paralela a la de los CTL^{CMV} (92, 93). La deficiencia en la reconstitución de esta subpoblación en los primeros 30-50 días después del alo-TPH se asocia a un aumento del riesgo de infección por CMV (94). La recuperación de estos LT CD4+ específicos de CMV post-TPH es un proceso complejo y lento. Este proceso se ve condicionado por la concentración de citoquinas inflamatorias que han sido inducidas por el daño tisular generado por el tratamiento farmacológico que ha recibido el paciente. Interferón gamma (IFN-γ), Interleucina (IL)-2 y Factor de necrosis tumoral alpha (TNF-α) así como otras citoquinas homeostáticas (IL-4, IL-10) inducidas por la propia linfopenia son algunos de los ejemplos. Tormo y col. han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la producción de citoquinas por los LT un mes después del alo-TPH entre los pacientes que reactivan o no el CMV (95).

Este nivel crítico de LT CD4+ y CD8+ específico de CMV dependerá de la frecuencia de LT anti-CMV en los distintos períodos post trasplante, de la actividad funcional de los mismos así como del microambiente biológico instaurado en el paciente. Además, la reactivación por CMV conduce a la expansión de CTL^{CMV} post-TPH pero curiosamente se han observado defectos en el repertorio de TCR de estos LT que pueden imposibilitar el control de la reactivación vírica (96).

De entre las técnicas desarrolladas hasta el momento, QuantiFERON®-CMV es un método estandarizado que mide los valores de IFN- γ , que producen los LT CD8+ cuando son estimulados *in vitro* con un cóctel de péptidos (n=21) altamente inmunogénicos incluidos en la secuencia de las proteínas del CMV: IE-1, IE-2, pp65, pp50 y gB, que son presentados por moléculas HLA-I muy comunes (abarcando > 98% de la población humana). Sin embargo, tiene la desventaja que no mide el IFN- γ que producen los LT CD4+ (97). Además de la monitorización de la carga viral de CMV mediante PCR, se considera actualmente la cuantificación de CTL^{CMV} el método óptimo para monitorizar la inmunidad linfocitaria específica de CMV después del alo-TPH ya que, como se ha descrito, la detección de la expansión post-TPH de CTL^{CMV} indica la resolución de la infección (88). La inmunoterapia adoptiva con estos CTL^{CMV} en pacientes con reactivación por este virus después del alo-TPH ha demostrado una disminución de los requerimientos farmacológicos y de los días de tratamiento necesarios para su resolución (98).

Resultados publicados recientemente por nuestro Grupo describen diferentes patrones de reconstitución inmunológica de la subpoblación de CTL^{CMV} en un grupo de pacientes que han recibido un alo-TPH, así como afirman que la actividad funcional de los CTL^{CMV} prevalece sobre su número, en lo que se refiere a generar protección en el paciente (99). En la misma línea, Moins-Teisserenc H. y col. han demostrado que la monitorización de la expresión de CD27 y CD46RA en esta subpoblación de CTL^{CMV} es fundamental para definir la protección frente a este virus, permitiendo establecer también diferentes patrones en función de estos marcadores (100). Paralelamente se ha descrito en esta subpoblación específica de CMV la necesidad de evaluar además la expresión de CD40L y CD107a. Król y col. demuestran mediante citometría de flujo como la caracterización funcional de CTL^{CMV} que expresan CD40L/CD107a permite evaluar el status funcional de dicha subpoblación prediciendo, de esta manera, las infecciones por este virus post-TPH (101).

4.2 LT activados por VEB

Los pacientes que sufren reactivación por VEB después del alo-TPH han mostrado un nivel de LT citotóxicos (CD8+) específicos de VEB (CTL^{VEB}) indetectable (102). Por tanto, el requisito necesario para tener bajo control la infección por VEB post-TPH y disminuir el riesgo de padecer SLPT es la reconstitución de los LT específicos de VEB. La monitorización de la inmunidad específica de este virus ha permitido optimizar la indicación de Rituximab aplicando el fármaco únicamente a pacientes con déficit en la reconstitución de estos LT específicos de VEB, además de identificar pacientes que se puedan beneficiar de la inmunoterapia adoptiva con estas células (103). Mediante “*Enzyme-linked immunosorbent spot*” (ELISPOT), método que permite la detección de IFN- γ o TNF- α producido por LT después del estímulo con el antígeno vírico, D’Aveni M y col. demuestran que un valor de LT específicos de VEB superior a 1000 “*spot forming cells*”/10⁶ células mononucleadas junto con una carga de ADN viral <40000 copias/mL en SP, es suficiente para el aclaramiento del virus, no necesitando el paciente recibir un tratamiento farmacológico antiviral (104).

Los multímeros son estructuras compuestas por varias moléculas de HLA unidas cada una de ellas a un antígeno de interés (péptido vírico). Estos péptidos son reconocidos por los TCR de los LT memoria específicos de esos antígenos. Estos complejos de LT memoria específicos de antígeno unidos a los multímeros pueden ser visualizadas mediante citometría de flujo, ya que el multímero se encuentra conjugado a un fluorocromo o microbola magnética que podría permitir la determinación, caracterización fenotípica y el aislamiento de los LT memoria específicos de virus en el paciente (105). Utilizando la tecnología de tetrámeros, multímeros que constan de cuatro estructuras y, por lo tanto, cuatro sitios de unión péptido-HLA, se ha demostrado que el valor predictivo positivo (VPP) de sufrir SLPT se incrementa de un 39% a un 100% en pacientes que presentan ADN de VEB >1000 copias/mL en SP y niveles de CTL^{VEB} <0,5/mm³. De esta forma, se ha demostrado que el análisis de CTL^{VEB} junto con la cuantificación de ADN es útil para la identificación de los pacientes con alto riesgo de desarrollar SLPT (102, 106). Sin embargo, hasta el momento aún no hay definido un consenso del valor umbral capaz de definir futuras reactivaciones víricas.

La inmunoterapia adoptiva con CTL^{VEB} en pacientes con VEB y/o SLPT ofrece una tasa de respuesta en el 70% de los pacientes infundidos, sin mortalidad ni EICR asociada (103). Aunque la reconstitución de CTL^{VEB} ha sido estudiada en detalle y su

importancia ha sido demostrada, la respuesta de LT CD4+ específica de este virus está aún mal definida, la cual, se ha demostrado que es necesaria para inducir una respuesta competente de CTL^{VEB} (107).

4.3 LT activados por AdV

Los escasos estudios que existen en la literatura muestran que la reconstitución de LT citotóxicos (CD8+) específicos de AdV (CTL^{AdV}) es esencial para el manejo de la infección post-TPH, ya que su presencia post-TPH está asociada al aclaramiento del virus, contribuyendo a la resolución de la infección. Por ello, se recomienda la monitorización de CTL^{AdV} para la detección temprana de pacientes de riesgo (59). En contraste con el CMV y el VEB, la infección activa por este virus en pacientes inmunosuprimidos está menos estudiada, realzando la necesidad de estudios de monitorización que permitan elucidar el tipo de respuesta inmunológica funcional desencadenada frente a este virus tras el trasplante.

La técnica denominada “*Intracellular cytokine staining*” (ICS) permite la detección de citoquinas, habitualmente IFN- γ y TNF- α , secretadas por LT del paciente después de ser estimulados *ex vivo* con péptidos del virus de interés. Utilizando esta tecnología, Feuchtinger T y col. han descrito como en ninguno de los pacientes que fallecieron a consecuencia de infección por AdV se detectaron CTL^{AdV} mientras que los que resolvieron la infección tuvieron valores de $0,56 \times 10^9/L$ de CTL^{AdV} de media hasta los 200 días post-TPH (108). Del mismo modo en relación a los LT CD4+, Guérin-El Khourouj V y col. han establecido que ningún paciente con niveles de LT CD4+ específicos de AdV $>0,06 /mL$ en SP desarrolla adenoviremia (109). Al igual que para CMV y VEB, se han utilizado otras técnicas para la monitorización de estos LT específicos de AdV como ELISPOT y multímeros, obteniendo similares conclusiones y sin poder también establecer un valor umbral que defina futuras reactivaciones víricas.

Las técnicas de inmunoterapia adoptiva también han sido testadas para este virus. En este sentido, J. Feucht y col. han descrito 30 pacientes con enfermedad por AdV o viremia post-TPH a los que se infunden CTL^{AdV}, alcanzando un aclaramiento de la viremia en el 86% de los pacientes (110).

4.4 Caracterización funcional de LT tras activación viral

Recientemente, se han publicado algunos estudios en los que se resalta la importancia de monitorizar la actividad funcional de estas subpoblaciones T específicas de virus sobre la monitorización de la subpoblación T antígeno-específica total identificada con tecnología multimérica. La importancia de estos hallazgos va en consonancia con la afirmación de que a pesar del desarrollo de dicha tecnología, hasta el momento, aún no hay definido un consenso del valor umbral capaz de definir futuras reactivaciones víricas. Camargo JF y col. examinan la producción de diversas citoquinas por parte de CTL^{CMV} tras estimulación *ex vivo* mostrando un patrón funcional (IL-2+IFN- γ +TNF- α +MIP-1 β +) asociado a protección frente a CMV (111). En la misma línea, Pelák O y col. emplean la misma tecnología para demostrar que la determinación de CTL^{CMV} productores de IFN- γ e IL-2 constituye el parámetro funcional más adecuado para predecir la resolución espontánea de episodios por este virus post-TPH (112). Todos estos datos publicados para CMV realzan la necesidad de monitorizar la respuesta funcional linfocitaria después del alo-TPH más que la población total de LT específicos de virus. Sin embargo, este campo no ha sido explorado aún para otras infecciones víricas como VEB y AdV.

5. Parámetros reguladores de la respuesta inmunológica de LT específica de virus

Tal y como se ha descrito anteriormente, diversos grupos hemos publicado recientemente diferentes patrones de reconstitución inmunológica T específica de virus en pacientes sometidos a alo-TPH, lo que hace pensar que existen variables biológicas y/o clínicas que podrían condicionar el desarrollo de una respuesta protectora y, por consiguiente, desencadenar un patrón inmunológico específico u otro después del trasplante. Sin embargo, no están aún definidos estos parámetros que condicionarían la susceptibilidad de sufrir una mayor tasa de infecciones víricas o la capacidad del organismo de aclarar al virus sin necesidad de tratamientos anti-virales complementarios durante el periodo post-TPH.

5.1 Papel de otras subpoblaciones inmunológicas: NK y DC

Un retraso funcional de entre 3 a 6 meses en la reconstitución de las células NK después del alo-TPH, se relaciona con una mayor incidencia de infecciones virales (113). Las células NK y específicamente la subpoblación CD56^{dim}NKG2C se consideran cruciales

para la resolución de los episodios de CMV, incluso en ausencia de células T (114). Esta afirmación se refuerza con la alta incidencia de infecciones graves en las deficiencias congénitas de células NK. Minculescu y col. han demostrado que los pacientes con recuentos de células NK en el día +30 superior a 150 células NK/ μ L tienen una incidencia más baja de infecciones virales post-trasplante (74). Las células NK también pueden producir mediadores inmunorreguladores, dando forma así a la respuesta de otras subpoblaciones inmunológicas como las DC y LT (115). Se ha descrito que la presencia de LT maduros procedentes del donante favorece la diferenciación de células NK post-TPH. El análisis de los receptores KIR de las células NK muestra como la expresión en las NK de receptores inhibidores como KIR3DL1 está asociada a un menor riesgo de infección por CMV (93). Por el contrario, varias publicaciones han reportado una menor incidencia de reactivación por CMV en los pacientes que reciben trasplantes de donantes con mayor número de receptores KIR activadores (116).

Por otro lado, una de las funciones principales de las DC consiste en capturar células infectadas por virus, procesarlas y presentar sus antígenos a los LT CD8+. Wikstrom y col. han demostrado como la EICR induce un defecto funcional en las DC que conduce a un fracaso en la generación de LT CD8+ funcionales específicos de virus, demostrando así como las DC favorecen la generación de una respuesta inmunológica competente frente a virus (117). Recientemente se ha descrito que los LT CD4+ tienen un papel importante en la estimulación de las DC favoreciendo el ejercicio de su función sobre los LT CD8+ específicos de virus (118). Además, se ha demostrado que la inhibición de la expresión del receptor tirosina quinasa AXL, presente en DC y células NK, aumenta la susceptibilidad de sufrir infección por un virus ya que induce la expresión de IFN-I. AXL es, por tanto, esencial para modular los efectos inmunosupresores del IFN-I y permitir la inducción de una respuesta óptima de LT frente a virus (119). Todos estos datos realzan el papel que las subpoblaciones celulares NK y DC podrían tener en el desarrollo de una respuesta inmunocompetente específica de virus post-TPH.

5.2 Tratamiento inmunosupresor post-trasplante

Después de la fase de neutropenia, la aparición de una EICR es el principal factor que retrasa la recuperación inmune y favorece las reactivaciones víricas. Los fármacos

habitualmente empleados como tratamiento profiláctico frente a EICR actúan directamente sobre la funcionalidad de los LT, reduciendo de manera dosis-dependiente la producción de IFN- γ , IL-2 y TNF- α por parte de los CTL^{CMV} (120). Concretamente, la CsA ha demostrado la reducción de la función de LT específicos de CMV (121), mientras que MTX ejerce un efecto inhibitorio sobre la producción de citoquinas *in vitro* (122). La combinación de ambos fármacos inhibe *in vitro* la proliferación y las funciones efectoras de CTL específicos de virus (120, 123). Por otro lado, algunos estudios han demostrado que CsA y MTX influyen en la funcionalidad, fenotipo y proliferación de células NK, lo que puede tener implicaciones importantes para la EICR y en la maduración fenotípica de DC durante la presentación de antígeno (124, 125).

Otros fármacos inmunosupresores administrados habitualmente en pacientes diagnosticados de EICR son los corticoides, los cuales, se ha demostrado que incapacitan la reconstitución de CTL^{CMV} funcionales de forma dosis dependiente (90, 126). Además, el uso de Ganciclovir ante una posible reactivación por CMV aumenta la inmunosupresión instaurada en el paciente en el periodo post-TPH, lo cual, favorecería la presencia de otras infecciones oportunistas por VEB, AdV y AF (127, 128).

Por tanto, el análisis del papel que ejercen los fármacos inmunosupresores empleados en el periodo post-trasplante sobre la respuesta específica a virus podría ser de ayuda para prever la susceptibilidad del paciente de sufrir una mayor tasa de infecciones víricas.

5.3 Co-infecciones fúngicas

El hongo AF constituye la causa más frecuente de IFI con una incidencia del 5-15% después de alo-TPH. Recientemente se ha descrito que, al igual que sucede con los virus, es necesaria la completa reconstitución de la inmunidad celular T para la disminución de la incidencia de infección fúngica post-TPH (129). Stuehler y col. han estudiado la reconstitución inmune post-TPH en pacientes seleccionados con diagnóstico de probable/probada AI, según los criterios del Grupo cooperativo europeo para la investigación y tratamiento de infecciones fúngicas invasoras (EORTC/MSG) (130), observando una disminución significativa del número de LT totales, NK y LT específicos de *Aspergillus* durante 12 meses (131). Existen, además, diferencias significativas en el número de LT específicos de virus funcionales existentes entre pacientes con AI post-TPH y sujetos sanos. Este hecho podría ser explicado por la producción de la toxina fúngica Gliotoxina (GT), que constituye la toxina por

excelencia producida mayoritariamente por las cepas de AF. Estudios *in vitro* han demostrado que la GT es responsable de la virulencia del hongo al suprimir la respuesta inmune innata y adaptativa. GT altera funciones de los neutrófilos, como la fagocitosis y la actividad de la mieloperoxidasa (132).

Yamada A y col. demostraron que entre las funciones inmunosupresoras de la GT está la de bloquear la función fisiológica de los LT, más concretamente mediante inhibición de la actividad citotóxica de subpoblaciones de LT CD4+ y CD8+ específicos de antígeno (133). En este sentido, se ha observado que tras exponer subpoblaciones de linfocitos memoria específicos de enterotoxina B de *Staphylococcus aureus* (SEB) y CMV a diferentes concentraciones de GT, existe una disminución significativa de la frecuencia de estos LT (134). Específicamente, la GT bloquea la citotoxicidad mediada por perforina y Fas de LT específicos de antígeno. Además, el efecto de GT se correlaciona con una fuerte reducción de la producción de TNF- α , IL-12 e IFN- γ (135, 136). Todo ello hace que la presencia en el paciente de hifas de AF pueda regular negativamente la funcionalidad de la población de LT específicas de virus. Este hecho supondría un factor prioritario a la hora de caracterizar la situación clínica del paciente después del alo-TPH así como la susceptibilidad del mismo a sufrir otras infecciones de etiología viral.

Respecto a la influencia de los diferentes fármacos inmunosupresores sobre los efectos de la GT, existen resultados contradictorios. Estudios recientes han demostrado como el tratamiento con diferentes fármacos inmunosupresores, como corticosteroides y Ciclofosfamida (CY), afecta a la virulencia de las cepas de AF productoras de GT (137, 138). Estos resultados sugieren que el análisis del régimen de inmunosupresión específico empleado tras el alo-TPH podría ser importante para definir el potencial patogénico de la GT (138). En este sentido, actualmente no hay estudios *in vitro* que hayan identificado como la inmunosupresión profiláctica frente a EICR puede regular el potencial patogénico de la GT.

El mecanismo de acción por el cual GT ejerce sus efectos es un asunto poco explorado. Pahl y col. afirman que la GT inhibe la activación de las células T mediante la interrupción de la vía NF- κ B (139, 140). NF- κ B participa en procesos inflamatorios, antiapoptóticos e inmunes en respuesta a diversos estímulos, incluido TNF- α o CD40. Por lo tanto, la inhibición de la activación de NF- κ B causa susceptibilidad a la apoptosis

en las células T, ya que regula los genes antiapoptóticos como TRAF1 y controla la actividad enzimática de las caspasas (141).

Respecto a otras subpoblaciones celulares, hasta el momento no existen muchos estudios de como la GT modula el resto de componentes del sistema inmunológico. Ampliar el conocimiento existente sobre su relación con las células NK sería primordial, ya que se ha descrito que el recuento absoluto de estas células puede ser un biomarcador valioso para el tratamiento de la AI (131). Respecto a otras subpoblaciones como DC, Kupfahl C y col. han descrito que la GT provoca una fuerte disminución de la producción de TNF- α e IL-12 por parte de estas células (142).

La validez del test del GM, prueba diagnóstica que habitualmente se realiza post-trasplante para el diagnóstico de AI, ha sido cuestionada como hemos comentado previamente debido a los falsos positivos y negativos encontrados en la práctica clínica. En este sentido, existen datos experimentales que ponen de relevancia el potencial de la GT como biomarcador biológico de la infección por AF (143). La GT y la bismetilgliotoxina (bmGT), metabolito secundario y de mayor estabilidad que la GT, han sido detectados en el suero de pacientes con AI documentada (probada o probable) y constituyen un marcador más sensible y específico que el GM sérico en el diagnóstico de AI (144, 145).

En definitiva, GT constituye un nuevo mecanismo inmunosupresor que contrarresta la respuesta inmune celular frente a los virus, lo que podría condicionar la susceptibilidad a las infecciones oportunistas en los receptores de trasplante alogénico.

5.4 Polimorfismos genéticos

Con el desarrollo de innovadoras técnicas de análisis genético mediante Secuenciación Masiva o "*Next-Generation Sequencing*" (NGS), es posible determinar la contribución de variantes genéticas en el desarrollo de infecciones después del trasplante alogénico. Los polimorfismos de un solo nucleótido (del inglés "*Single Nucleotide Polymorphism*", SNPs) representan las variantes genéticas más comúnmente encontradas en el genoma humano. Los SNPs pueden tener implicaciones funcionales sobre los niveles de expresión génica, la estabilidad del ARN mensajero así como la producción y la actividad biológica de la proteína resultante. Existen varios trabajos que demuestran como diversos SNPs en genes relacionados con el sistema inmunológico influyen en el

curso y el desarrollo de infección por virus post-TPH, tal y como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Principales genes relacionados con infecciones víricas post-TPH. Adaptado de Wojtowicz y col. *Virulence* 2016; 7(8):917-29. (146)

Virus	Complicación post-TPH	Mecanismo de acción	Genes asociados a infección vírica post-TPH
CMV	Infección CMV	Perdida de función	<i>TLR9</i> (D/R), <i>DC-SIGN</i> (R), <i>IFN-γ</i> (R), <i>CTLA4</i> (R), <i>CD28</i> (R), <i>FOXP3</i> (R)
		Ganancia de función Desconocido	<i>KIR</i> (D) <i>MCP-1</i> (R), <i>IFL3/4</i> (D), <i>CCR5</i> (D)
	Enfermedad CMV	Perdida de función Desconocido	<i>DC-SIGN</i> (R), <i>IL-10</i> (R) <i>MCP-1</i> (R), <i>CCR5</i> (D)
VEB	Infección VEB	Perdida de función	<i>IFN-γ</i> (R), <i>CCR5</i> (R)
VHS	Infección VHS	Perdida de función	<i>NOD2/CARD15</i> (D/R)

Las citoquinas y las quimiocinas son la primera línea de defensa contra las infecciones virales y desempeñan funciones importantes en el control de células infectadas por virus. Estudios recientes han demostrado que SNPs en genes que codifican estas citoquinas producen diferencias interindividuales en la producción de las mismas, con un rol importante en la defensa de infecciones víricas (147). Concretamente, SNPs en genes que codifican para citoquinas y quimiocinas como los que se indican en la Tabla 1 se han asociado a un mayor riesgo de reactivación de CMV y VEB, mientras que para AdV aún no hay datos publicados (148-153). Por ejemplo, SNPs en el receptor Toll-like (TLR) 2 y 4 han resultado protectores frente a la infección por CMV (154). Corrales y col. han demostrado que los pacientes que reciben un donante con un genotipo A/A en el gen *CCR5* desarrollan infección por CMV con una mayor carga viral (155). Con el mismo gen, se han publicado resultados similares en el contexto de infección por VEB (156). En relación a esta patología se ha demostrado que el genotipo *IFN- γ* 3/3 es asociado a una menor producción de *IFN- γ* , siendo un factor de riesgo de reactivación de VEB (157).

Como ya hemos comentado previamente, se ha demostrado que el genotipo *KIR* del receptor, que regula la función de las células NK, influye en el desarrollo de la infección por CMV. Concretamente, SNPs en genes como *KIR2DS2* y *KIR2DS4* se han asociado a un riesgo reducido de infección por CMV (116, 158). La infección por CMV involucra varios cambios fenotípicos en la célula NK, incluida la expansión y

diferenciación del repertorio de sus receptores KIR (159). Específicamente, KIR3DL1 es un receptor inhibitorio que ha demostrado que juega un papel importante durante la reactivación del CMV en pacientes inmunodeprimidos. De Rham y col. han explorado la expresión de KIR3DL1 en células NK durante la reactivación de CMV y han demostrado como los niveles de expresión de este receptor aumentan en el tiempo transcurrido entre el trasplante y la reactivación vírica, disminuyendo una vez resuelta la infección. Este hecho demuestra la implicación que este receptor puede tener en la eliminación de la infección por CMV (160). Este mecanismo es mucho más complejo ya que el receptor KIR3DL1 es altamente polimórfico, lo cual, puede condicionar la respuesta de las células NK provocando que variantes genómicas en este gen influyan en la funcionalidad de estas células NK (161). En resumen, identificar variantes genéticas que puedan predecir la susceptibilidad a virus puede ayudar a identificar pacientes con mayor riesgo de complicaciones asociadas a virus post-TPH.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

- Existe un patrón de respuesta funcional inmunológica desarrollada frente a CMV, VEB o AdV que puede, tras el alo-TPH, proteger de la infección y/o desarrollo de la enfermedad por estos virus. El desarrollo de este patrón es regulado por: el tipo del virus, las subpoblaciones celulares del sistema inmunológico (LT CD4+, LT CD8+, células NK, DC), los polimorfismos genéticos del paciente y los propios fármacos inmunosupresores administrados como tratamiento profiláctico frente a una EICR.
- La presencia de GT/bmGT en SP procedente de una infección de base por AF interfiere en la funcionalidad de las subpoblaciones memoria específicas de CMV/VEB/AdV, aumentando la susceptibilidad del paciente de desarrollar coinfecciones múltiples virales.

OBJETIVOS PRINCIPALES

- **Bloque I.** Identificar en sujetos sanos, el potencial regulatorio inmunológico de los agentes patógenos y farmacológicos propios de un paciente que ha sido sometido a un alo-TPH.
- **Bloque II.** Caracterizar en pacientes que reciben un alo-TPH el microambiente funcional inmunológico que protege a los pacientes frente a una infección por CMV, VEB o AdV así como los principales parámetros biológicos que lo modulan.
- **Bloque III.** Analizar el papel de los polimorfismos genéticos y de la técnica de NGS en la modulación de la respuesta inmunológica específica de virus post-TPH.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

Bloque I.

- Demostrar la función inmunosupresora de la GT como elemento inhibidor de la actividad funcional de las subpoblaciones inmunológicas tras el estímulo antígeno-específico en sujetos sanos.
- Establecer, en sujetos sanos, el papel de la profilaxis farmacológica frente a la EICR en la modulación de la actividad inmunológica frente a virus.

Bloque II.

- Describir los patrones de recuperación de LT CD4+ y CD8+ funcionales específicos de CMV, VEB y AdV que se observan en pacientes que han sido sometidos a un alo-TPH.
- Analizar en pacientes sometidos a un alo-TPH el papel inmunoregulador anti-viral que tienen las células NK y mDC, la presencia de GT y los fármacos administrados frente a EICR sobre los diferentes patrones de respuesta T encontrados.

Bloque III.

- Describir el papel de los polimorfismos genéticos en regiones reguladoras de genes de citoquinas, quimiocinas y sus receptores en el desarrollo de infecciones víricas y enfermedad asociado a virus post-trasplante.
- Elaborar un score genético de predicción de riesgo de infección por CMV después del alo-TPH mediante la aplicación de modelos matemáticos con la inclusión de variables genómicas y clínicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Consideraciones éticas

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación con medicamentos (CEIm) de Navarra (código: E015/12) y del Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (código: 396_15). Éste fue desarrollado de acuerdo con la Declaración de Helsinki para la investigación médica en seres humanos. Se obtuvo el consentimiento informado firmado de todos los participantes antes de su inclusión en el estudio, en el cual, se explicaba la importancia de participar en el mismo, así como las características de la investigación y los posibles riesgos y beneficios derivados.

2. Diseño metodológico

- **Bloque I:** estudio unicéntrico prospectivo en el que se incluyeron **23 sujetos sanos** de la Comunidad Foral de Navarra.
- **Bloque II:** estudio multicéntrico prospectivo en el que se incluyeron **50 pacientes** que fueron sometidos entre los años 2017-2019 a un alo-TPH en el Servicio de Hematología y Hemoterapia del Complejo Hospitalario de Navarra (CHN) y en el Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM). Concretamente, de los 50 pacientes incluidos 17 pertenecían al CHN mientras que 33 provenían del HGUGM.
- **Bloque III:** estudio unicéntrico retrospectivo en el que se incluyeron de manera consecutiva **90 parejas donante/receptor**. Estos últimos habían sido sometidos a un alo-TPH en el HGUGM durante el periodo comprendido entre los años 2000-2015.

Un esquema del diseño metodológico de este proyecto de tesis se representa en la Figura 3.

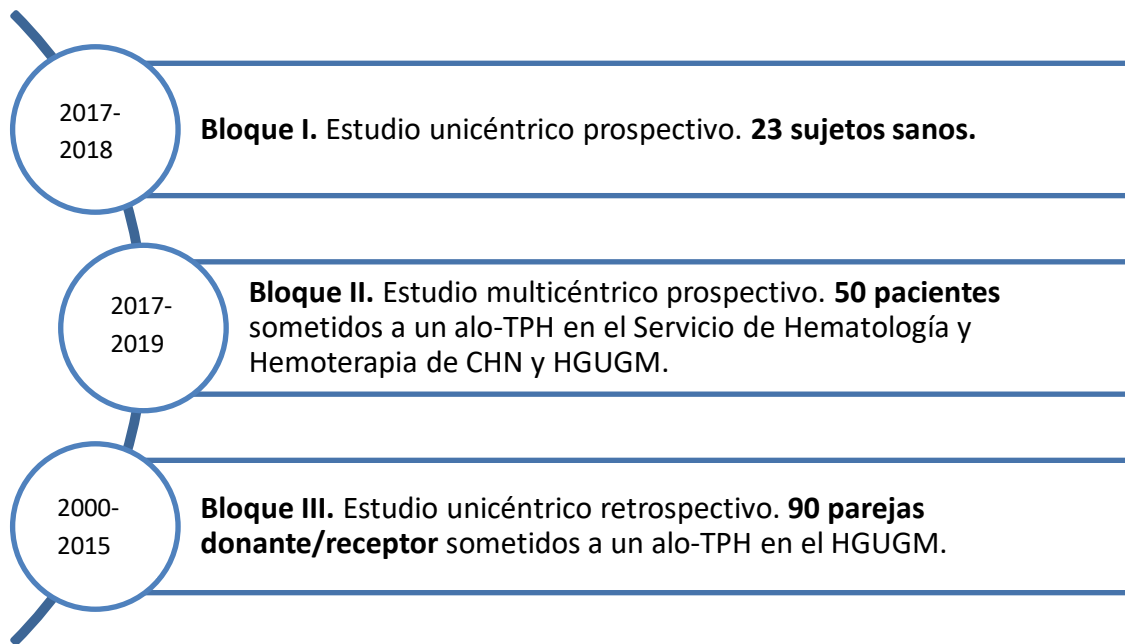


Figura 3. Diseño metodológico del estudio que recoge las tres cohortes de sujetos propuestas para el alcance de los objetivos principales de este proyecto de tesis.

3. Bloque I

3.1 Sujetos de estudio

En el primer bloque del estudio se incluyeron 20 sujetos sanos que mostraron serología positiva para CMV y VEB en el momento de extracción de la muestra. Los participantes correspondieron a 18 mujeres y 2 hombres con una mediana de edad de 39 años (26-72). Los análisis serológicos fueron realizados en el Servicio de Microbiología del CHN con muestras de suero siguiendo los protocolos técnicos establecidos. Concretamente, para la detección cuantitativa de anticuerpos específicos de clase IgG dirigidos contra antígenos de CMV se utilizó la técnica de inmunoanálisis de micropartículas quimioluminiscente (CMIA, Alinity, Abbott Laboratories, IL, EEUU) considerando valores positivos cuando el resultado era superior a 6UA/mL. En paralelo, se empleó la tecnología de la quimioluminiscencia (CLIA, Liaison XL, DiaSorin, Italia) para la determinación de anticuerpos específicos de clase IgG dirigidos contra antígenos de la cápside (VCA) del VEB. Se consideraron valores positivos cuando los resultados obtenidos fueron superiores a 20UA/mL. Adicionalmente, se reclutaron tres sujetos sanos cuyas muestras fueron proporcionadas por el Banco de Sangre y Tejidos de Navarra, Biobanco de Navarrabiomed, Departamento de Salud del Gobierno de Navarra (apartado 4).

3.2 Simulación *in vitro* del microambiente patógeno y farmacológico post-TPH

De cada uno de los 20 sujetos sanos incluidos se obtuvieron 30 mL de SP anticoagulada con heparina de litio. Las células mononucleadas (CMN) de sangre periférica fueron aisladas mediante centrifugación sobre gradiente de densidad empleando el reactivo Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Sciences, PA, EEUU) siguiendo protocolos estandarizados. Se empleó como medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 100UI/ml de penicilina, 100ng/ml de estreptomicina y suero fetal bovino (SFB) al 10%. Este último fue descomplementado antes de su uso durante media hora en un baño termostático a 56°C. A continuación, se re-suspendieron 1×10^6 de CMN por pocillo en placas de cultivo de 96 pocillos de fondo redondo (Costar, Corning, NY, EEUU). Las CMN fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ y expuestas a diferentes condiciones experimentales que son presentadas en la Figura 4.

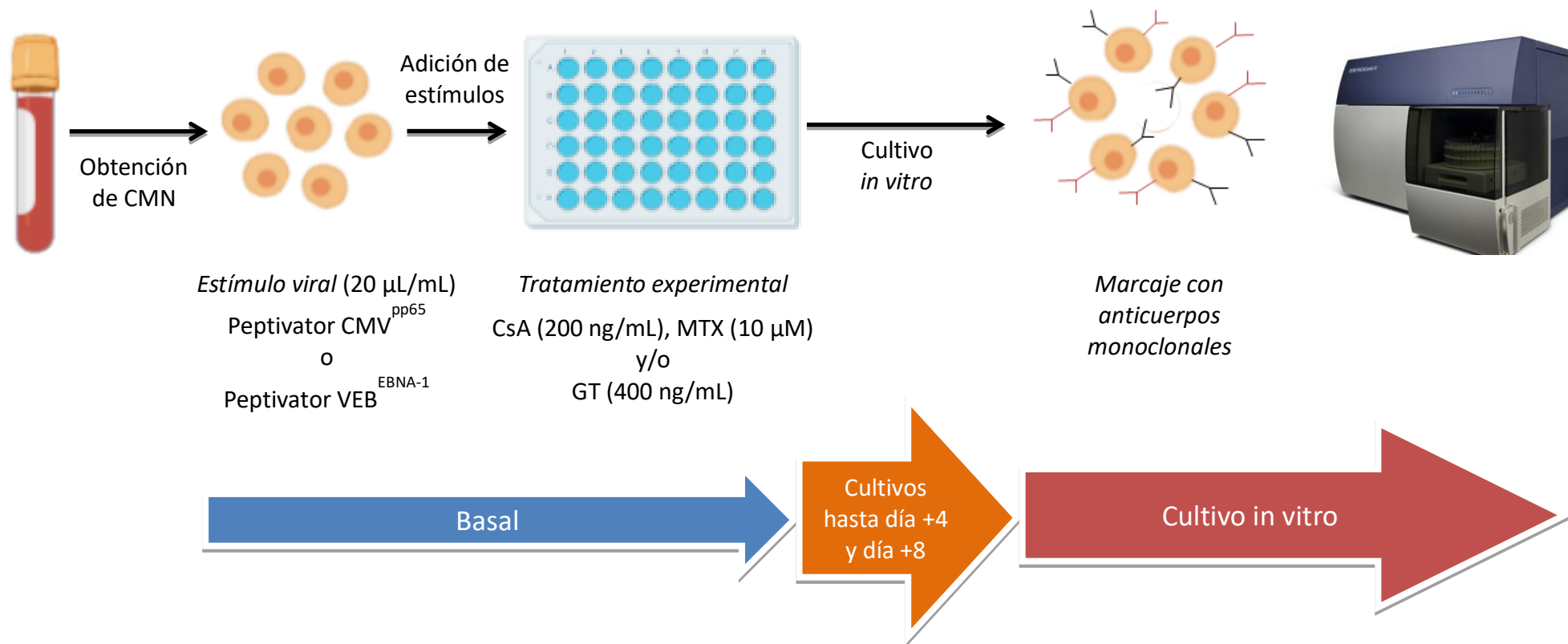


Figura 4. Condiciones de cultivo aplicadas a las CMN obtenidas de cada sujeto sano. Se analizó mediante citometría de flujo una muestra basal del ensayo y tras ser las células cultivadas 4 y 8 días.

En relación a los distintos estímulos que fueron utilizadas en estas diferentes condiciones experimentales, es necesario comentar algunos aspectos importantes:

El PepTivator CMV^{pp65} (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) consiste en un conjunto de péptidos (0.6 nmol de cada péptido por mL) que pueden ser presentados por moléculas del CMH de clase I o de clase II y que cubre la secuencia completa de la proteína del tegumento pp65 de CMV. En el caso del PepTivator VEB^{EBNA-1}, dicho conjunto de péptidos cubre la secuencia de la proteína nuclear 1 (EBNA-1). Ambas proteínas son inductoras en el ser humano de una respuesta inmunodominante de LT CD4+ (restricción clase II) y CD8+ (restricción clase I) dirigida de manera específica contra CMV y VEB. La concentración de cada Peptivator (20µL/mL) utilizada en los ensayos experimentales fue la recomendada por el fabricante.

Las CMN activadas con el conjunto de péptidos que componen las proteínas virales fueron tratados también con GT (Sigma-Aldrich, San Luis, EEUU) y/o con los agentes inmunosupresores que se emplean habitualmente en la práctica clínica como tratamiento profiláctico frente a EICR: CsA (Sandimmun, Novartis, Suiza) y MTX (Pfizer, NY, EEUU).

En función de la concentración de GT encontrada en el suero de pacientes con AI (162), se utilizó una concentración de 400ng/mL en todos los experimentos desarrollados. Como reactivo diluyente de la GT se empleó Dulbecco's PBS (dPBS, Sigma-Aldrich).

La concentración experimental empleada tanto de CsA como de MTX fue similar a los niveles encontrados en SP de pacientes que han recibido la dosis estipulada para estos medicamentos (163) después de haber sido sometidos a un alo-TPH. Concretamente, se utilizó una concentración de 200ng/ml de CsA empleando como diluyente suero fisiológico glucosado al 5%. El MTX se empleó a una concentración de 10µM siendo diluido previamente en solución fisiológica. Para la preparación de estos fármacos se siguieron los protocolos proporcionados por el Servicio de Farmacia del CHN.

3.3 Análisis celular mediante citometría de flujo

Tras sembrar 1×10^6 CMN y exponerlas a las diferentes condiciones experimentales (Figura 4), estas fueron analizadas basalmente y en los días +4 y +8 de cultivo. A continuación, en los siguientes apartados se describe de manera específica el procesamiento realizado, siendo el mismo en todos los días planificados:

3.3.1 Identificación y caracterización fenotípica de subpoblaciones celulares

En los diferentes días de análisis (basal, +4 y +8), las CMN de cada condición de estudio fueron recogidas y marcadas durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA) y en oscuridad con los paneles de anticuerpos monoclonales descritos en la Tabla 2. Una vez lavadas las células y re-suspendidas en dPBS, 250.000 eventos fueron adquiridos y analizados en un citómetro de flujo FACSCanto™ II (Becton Dickinson-BD, NJ, EEUU) 3 láseres (azul, 488 nm; rojo, 633 nm; violeta, 405 nm). El equipo posee 8 detectores de fluorescencia independientes, configuración 4-2-2 (4 detectores para el láser azul, 2 para el rojo y 2 para el violeta). Una compensación semiautomática del equipo fue previamente realizada. Para la adquisición y el análisis de los datos se empleó el software de análisis policromático FACSDiva 6.0 (BD).

El análisis de las muestras se realizó en primer lugar mediante la identificación en el citómetro de flujo de las siguientes subpoblaciones inmunológicas: células NK, mDC y LT. Respecto a las células NK maduras, fueron subdivididas en 2 subpoblaciones en función de la expresión relativa en su membrana del antígeno CD56: células CD56^{dim} y CD56^{bright}. En este bloque de estudio solo se evaluaron las células CD56^{dim} (CD3-CD16+CD45+), ya que son el subtipo predominante en SP de sujetos sanos, poseen alta actividad citotóxica y expresan en su membrana una alta concentración de receptores que potencian su capacidad efectora (164). Por otro lado, las mDC fueron identificadas como: CD3-CD11c+CD14-CD45+CD86+. Finalmente, la subpoblación de LT CD4+ se identificó como CD3+CD4+CD45+ y los LT CD8+ como CD3+CD8+CD45+.

En segundo lugar, se calculó el valor absoluto de cada subpoblación utilizando el porcentaje obtenido en el análisis previo y el número de eventos adquiridos (250.000 eventos) en cada muestra.

Tabla 2. Anticuerpos monoclonales empleados para citometría de flujo en este bloque.

Antígeno	Fluorocromo	Clon	Casa comercial	Especificidad
CD3	VioletFluor450	UCHT1	Tonbo Biosciences ^a	Células T
CD45	APC-H7	2D1	BD ^b	Leucocitos
CD45	PerCP Cy5.5	HI30	Tonbo	Leucocitos
CD4	PerCP	SK3	Biolegend ^c	LT colaboradores
CD8	BV 510	SK1	Biolegend	LT citotóxicos
CD16	FITC	3G8	BD	Células NK
CD56	PE	MY31	Tonbo Biosciences	Células NK
CD11c	APC	MJ4-27G12	Miltenyi Biotec	mDC
CD86	PeCy7	IT2.2	Biolegend	mDC
CD14	PE	M5E2	BD	Monocitos

^a Tonbo Biosciences, San Diego, CA, EEUU

^b BD-Becton Dickinson, New Jersey, EEUU

^c Biolegend, San Diego, CA, EEUU

3.3.2 Evaluación de la proliferación celular de LT mediante tinción con éster de succinimidil-carboxifluoresceína

La capacidad proliferativa de los LT fue estudiada utilizando las mismas condiciones experimentales y el mismo cronograma (basal, +4 y +8) del ensayo previo (Figura 4).

2×10^6 de CMN fueron resuspendidas en 1 ml de dPBS que contenía un 5% de SFB. A continuación, fueron incubadas con 2,2 μ l de éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE, Sigma-Aldrich) (0,5mM) durante 5 minutos en oscuridad a TA. Con la finalidad de eliminar el exceso de este reactivo y evitar con ello la toxicidad celular se realizaron tres lavados con dPBS. A continuación, se cultivaron 2×10^5 CMN por pocillo previamente marcadas con CFSE en una placa de 96 pocillos de fondo redondo en presencia de las diferentes condiciones experimentales planteadas. Se empleó como control positivo fitohemaglutinina (PHA, Sigma-Aldrich) a una concentración de 0,24mg/dL. La ausencia de estímulo antigénico, fármacos y GT se utilizó como controles negativos.

En el momento basal y tras 4 y 8 días desde el inicio del cultivo se analizó mediante citometría de flujo el recuento absoluto de LT que habían entrado en proliferación. Para ello las CMN fueron marcadas con los mismos anticuerpos monoclonales (Tabla 2) que habían sido utilizados en el apartado previo para la caracterización fenotípica linfocitaria T. La magnitud de la proliferación se determinó utilizando el porcentaje de células gateadas (LT CD4+ o CD8+) que se situaban en la fracción espectral de

proliferación (CFSE^{dim}). El valor absoluto de células que habían proliferado para cada condición se calculó teniendo en cuenta dicho porcentaje y el número de eventos adquiridos (250.000 eventos). Para la adquisición y el análisis de la proliferación en las diferentes condiciones experimentales se empleó de nuevo el software de análisis policromático FACSDiva 6.0.

3.3.3 Estudio de la apoptosis celular inducida por Gliotoxina

Para evaluar el potencial apoptótico de la GT, se testaron diferentes concentraciones de ésta en CMN obtenidas de donantes sanos. Para ello, se seleccionaron 10 sujetos sanos de los 20 incluidos en este bloque de estudio y se obtuvieron de cada uno de ellos 15 mL de SP anticoagulada con heparina de litio. Tras aislar la población de CMN mediante centrifugación sobre gradiente de densidad, se sembraron 1×10^6 de CMN por pocillo en placas de cultivo de 96 pocillos exponiéndolas a distintas concentraciones de GT. Concretamente fueron las siguientes: 200, 400, 800 y 1000ng/mL. Tras 4 y 8 días de cultivo, se realiza el marcaje de las células con Ioduro de propidio (IP, Biolegend), y Anexina V-APC (Biolegend). El marcaje combinado con ambos reactivos permite diferenciar entre las siguientes subpoblaciones: células vivas (Anexina-IP-), apoptóticas tempranas (Anexina+IP-), apoptóticas tardías (Anexina+IP+) y necróticas (Anexina-IP+). Empleando la metodología ya descrita para el uso del citómetro de flujo FACSCantoTM II, se obtuvo el porcentaje de CMN apoptóticas tempranas y tardías así como necróticas para cada concentración de la micotoxina.

3.4 Separación inmunomagnética de subpoblaciones celulares y análisis de la vía de señalización NF- κ B.

Con el objetivo de evaluar la implicación de la vía de señalización NF- κ B en el mecanismo de acción que se desencadena con las condiciones experimentales analizadas en este bloque de estudio, se empleó una matriz de proteínas diseñada específicamente para el estudio de dicha ruta molecular (Proteome Profiler Array, R&D Systems, Inc., EE. UU.). Para ello, tres productos de leucoaféresis (aproximadamente 65 mL) obtenidos de tres sujetos sanos en el Banco de Sangre y Tejidos de Navarra fueron centrifugados sobre un gradiente de densidad con Ficoll-Paque para obtener las CMN. Éstas fueron transferidas a otro recipiente y lavadas con dPBS para remover los restos de componentes sanguíneos.

A continuación, se empleó la tecnología proporcionada por el equipo *AutoMACS Pro Separator* (Miltenyi Biotec). Esta permite la separación inmunomagnética automática de subpoblaciones celulares, que han sido previamente marcadas con un anticuerpo que reconocerá en la membrana de la subpoblación de interés un antígeno en concreto. Dicho anticuerpo se encuentra conjugado a microbolas magnéticas. Empleando esta tecnología, a partir de las CMN de los tres sujetos sanos se realizó una selección negativa en base a la cual se obtuvieron subpoblaciones purificadas de células NK o LT de cada individuo. Para ello se emplearon el “*NK Cell Isolation Kit*” y “*Pan T Cell Isolation Kit*” (Miltenyi Biotec). La pureza obtenida tras la selección de cada subpoblación se determinó mediante análisis de la subpoblación de interés por citometría de flujo, empleando para ello los anticuerpos monoclonales previamente definidos en la Tabla 2. En todas las depleciones realizadas se obtuvieron unas purezas para cada una de las subpoblaciones enriquecidas de NK y LT superiores al 90%.

A continuación, de cada sujeto se sembraron 10^7 de células NK o LT por pocillo en placas de cultivo de 6 pocillos. Ambas subpoblaciones celulares fueron cultivadas en una atmósfera humidificada a 37°C con 5% de CO₂ y expuestas a las condiciones experimentales descritas previamente en la Figura 4. Después de 4 días de incubación, cada subtipo celular de cada sujeto y de cada condición fue recogido y lisado con el tampón de lisis incluido en el kit. La cantidad de proteína obtenida fue cuantificada mediante el método Bradford, empleando para ello dicho reactivo (Bradford, Bio-Rad, CA, EEUU).

Finalmente, 250 µg de cada lisado celular obtenido para cada condición y cada sujeto se analizó en una matriz de proteínas diseñada para estudiar la ruta de señalización NF-κB. Para ello siguiendo las recomendaciones del fabricante, los lisados celulares fueron incubados durante toda la noche con las membranas de nitrocelulosa. Las membranas contienen los anticuerpos de captura y controles específicos para 45 proteínas (Tabla 3, Figura 5). Las posiciones A1, A2, A23, A24, F1 y F2 corresponden a puntos de referencia. Estos han sido fijados por duplicado en las membranas de nitrocelulosa por el fabricante. La membrana fue lavada para eliminar las proteínas no adheridas e incubada con un cóctel de anticuerpos de detección biotinilados. Posteriormente, se añadieron los reactivos de detección de quimioluminiscencia, mostrando una señal en cada punto de captura que se correspondía con la cantidad de proteína unida al anticuerpo. Las imágenes de todas las señales fueron adquiridas simultáneamente

empleando un equipo Chemidoc (Bio-Rad) y se realizó un análisis de densitometría de todas las matrices utilizando el software ImageJ (Bio-Rad).

Tabla 3. Proteínas incluidas en el array de proteínas de la vía NF- κ B.

Coordenadas	Símbolo	Descripción
B1, B2	ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
B3, B4	BCL10	B-cell lymphoma/leukemia 10
B5, B6	CARD6	Caspase recruitment domain-containing protein 6
B7, B8	CD40/TNFRSF5	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 5
B9, B10	clAP1/BIRC2	Baculoviral IAP Repeat Containing 2
B11, B12	clAP2/BIRC3	Baculoviral IAP Repeat Containing 3
B13, B14	FADD/MORT1	FAS-associated death domain protein
B15, B16	Fas/TNFRSF6/CD95	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6
B17, B18	I κ B α	NF-kappa-B inhibitor alpha
B19, B20	I κ B ϵ	NF-kappa-B inhibitor epsilon
B21, B22	IKK1/IKK α /CHUK	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha
B23, B24	IKK2/IKK β	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta
C1, C2	IKK γ /NEMO	NF-kappa-B essential modulator
C3, C4	IL-1 RI	Interleukin-1 receptor type 1
C5, C6	IL-17 RA	Interleukin-17 receptor A
C7, C8	IL-18 R α	Interleukin-18 receptor 1
C9, C10	IRAK1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1
C11, C12	IRF5	Interferon regulatory factor 5
C13, C14	IRF8	Interferon regulatory factor 8
C15, C16	JNK1/2	Mitogen-activated protein kinase 8
C17, C18	JNK2	Mitogen-activated protein kinase 9
C19, C20	LTBR/TNFRSF3	Lymphotoxin-beta
C21, C22	Metadherin/AEG-1	Metadherin
C23, C24	MYD88	Myeloid differentiation primary response protein MyD88
D1, D2	NF κ B1	Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit
D3, D4	NF κ B2	Nuclear factor NF-kappa-B p100 subunit
D5, D6	NGFR/TNFRSF16	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 16
D7, D8	p53	Cellular tumor antigen p53
D9, D10	p53 (pS46)	Cellular tumor antigen p53
D11, D12	RelA/p65	Transcription factor p65
D13, D14	RelA/p65 (pS529)	Transcription factor p65
D15, D16	cRel	Proto-oncogene c-Rel
D17, D18	SHARPIN	Shank-associated RH domain-interacting protein
D19, D20	SOCS6	Suppressor of cytokine signaling 6
D21, D22	STAT1p91	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta
D23, D24	STAT1 (pY701)	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta
E1, E2	STAT2	Signal transducer and activator of transcription 2
E3, E4	STAT2 (pY689)	Signal transducer and activator of transcription 2
E5, E6	STING/TMEM173	Stimulator of interferon protein
E7, E8	TLR2	Toll-like receptor 2
E9, E10	TNF RI/TNFRSF1A	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A
E11, E12	TNF RII/TNFRSF1B	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B
E13, E14	TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
E15, E16	TRAIL R1/DR4	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10A
E17, E18	TRAIL R2/DR5	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10B

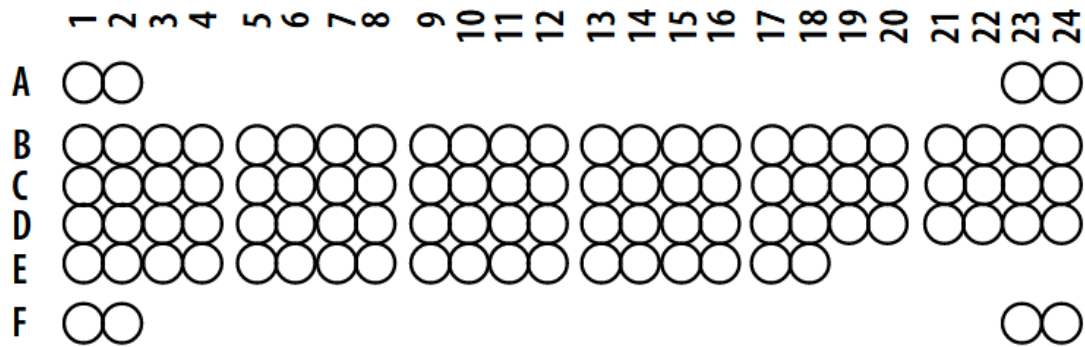


Figura 5. Coordenadas para el análisis de los datos obtenidos en el array estudiado.

3.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico de todos los resultados incluidos en este Bloque I de estudio fue realizado con el software SPSS v.25 (Chicago, IL, EEUU). Los resultados se presentaron usando el software Prism (*GraphPad Prism* v.8, San Diego, EEUU). Los datos siguieron una distribución paramétrica, por lo que fueron expresados como media \pm desviación estándar. En primer lugar, se analizaron los resultados medios obtenidos en las diferentes condiciones experimentales y en los diferentes días de análisis (basal, +4 y +8) mediante la prueba de ANOVA. Se realizaron comparaciones por parejas con el método de Tukey y con el método de Wilcoxon y los grupos con p-valor $<0,05$ se consideraron estadísticamente diferentes.

Por otro lado, la normalización de los datos cuantitativos obtenidos en las diferentes membranas se realizó mediante factores de corrección utilizando como referencia siempre la misma membrana, según la siguiente ecuación:

$$X(Ny) = X(y) * P1/P(y)$$

X(Ny) = Intensidad de la proteína “X” normalizada en el array “Y”

X(y) = Intensidad de la proteína “X” en el array “Y”

P1 = Media de las intensidades de los controles positivos del array de referencia

P(y) = Media de las intensidades de los controles positivos del array “Y”

La representación de datos y análisis estadístico se realizó utilizando el software Perseus 1.6.10.5 (165). Se empleó un T-test, aceptando como criterio estadístico significativo un p-valor $<0,05$.

4. Bloque II

4.1 Población de estudio

En este bloque de trabajo se incluyeron 50 pacientes que fueron sometidos a un primer alo-TPH en el CHN y en el HGUGM durante el período comprendido entre enero de 2017 y agosto de 2019. El estudio incluyó a sujetos adultos (≥ 18 años) diagnosticados de una patología hematológica, para la cual, estuviera indicado como procedimiento terapéutico la realización de un alo-TPH.

Estos 50 pacientes reclutados recibieron un trasplante alogénico de PH procedente de un hermano HLA-idéntico, DNE o donante haploidéntico. A los donantes se les sometió a un proceso de leucoaféresis, después de haber inducido con la administración del fármaco G-CSF (Filgrastim, Zarzio, Sandoz, Alemania) la movilización de sus PH desde la MO a la SP. A través de este procedimiento de leucoaféresis se consigue obtener los PH movilizados, mientras que el resto de elementos sanguíneos retornan al donante. Los regímenes de acondicionamiento y la profilaxis farmacológica frente a EICR administrada a los pacientes fueron pautados de acuerdo al diagnóstico y la edad, entre otros criterios, siguiendo los protocolos clínicos de las instituciones participantes. La profilaxis frente a EICR consistió en la administración de los siguientes fármacos: MTX y Tac o CsA y MMF o bien combinando estos dos últimos con Cy-PT. En tres pacientes, la depleción de LT del injerto se realizó utilizando globulina antitimocítica (ATG, Fresenius, Alemania). La EICR aguda y crónica se diagnosticó y graduó de acuerdo con la conferencia de consenso sobre EICR aguda (27).

4.2 Monitorización de infecciones víricas y fúngicas después del alo-TPH

Tras la infusión de PH y hasta el día +180 después del trasplante, todos los pacientes fueron monitorizados en relación a la aparición de complicaciones infecciosas de origen vírico.

La monitorización de la carga viral de CMV se realizó en muestras de plasma sanguíneo obtenidas de los pacientes mediante PCR cuantitativa a tiempo real, empleando un límite de detección de 100copias/mL (155UI/mL). La identificación de ADN viral se realizó dos veces a la semana durante el primer mes después del alo-TPH y semanalmente hasta aproximadamente el día +100. La identificación del estado serológico para CMV (IgG) de todos los donantes y sus receptores se llevó a cabo con

una muestra extraída de ambos grupos de sujetos antes de la infusión de los PH. Dicho análisis se realizó en los Servicios de Microbiología del CHN y HGUGM siguiendo los protocolos establecidos por los correspondientes servicios. Ningún paciente recibió profilaxis específica contra el CMV.

Ante la presencia de datos clínicos de reactivación vírica (carga viral >100 copias/mL), se instauró tratamiento anticipativo, del inglés “*pre-emptive*”, con Valganciclovir (900mg/12h) o Foscarnet (60mg/kg/12h) con dosis ajustadas a la función renal. Esta terapia antiviral se mantuvo durante un mínimo de 2 semanas y se interrumpió después de un resultado negativo de PCR o una disminución significativa de la carga viral. Se consideró un “*nuevo episodio de infección por CMV*” cuando al paciente se le detectó ADN vírico en SP después de no haber recibido tratamiento antiviral durante dos semanas y no haber presentado niveles significativos de ADN viral en ese mismo período. Según Ljungman y col. la enfermedad por CMV se consideró probada en los pacientes cuando la presencia de síntomas clínicos y/o signos de colitis, neumonía, encefalitis o retinitis se acompañó de la detección de ADN vírico en muestras de fluidos biológicos del paciente (166).

Simultáneamente, la presencia de VEB fue monitorizada semanalmente mediante PCR cuantitativa en caso de fiebre y/o signos y síntomas de SLPT. La infección por VEB se definió como la detección de ≥ 500 copias/mL de ADN en plasma sanguíneo. Como parte de la rutina asistencial, el plasma de los pacientes no fue analizado recurrentemente para la detección de otros virus: VHS, virus BK, virus Gripe A, VRS y AdV. Sin embargo, en presencia de signos y síntomas en los pacientes compatibles con infecciones causadas por estos virus, a petición del clínico responsable se realizaron los análisis pertinentes de laboratorio para la detección de los mismos. La presencia mediante PCR de ADN vírico sin un valor umbral establecido, se consideró un resultado positivo en el paciente. De manera general, todos los pacientes incluidos en el estudio desde su ingreso hasta aproximadamente un año después de la infusión de los PH recibieron profilaxis antiviral frente a VHS con Aciclovir (800mg/12h).

Respecto a las infecciones fúngicas, se realizó bisemanalmente en el suero de todos los pacientes la determinación del antígeno de GM. Para ello se empleó el kit “*Aspergillus Ag Kit*” (Bio-Rad) en el Servicio de Microbiología del CHN y HGUGM, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Un resultado fue considerado positivo cuando el valor de absorbancia fue $\geq 0,5$. El clínico utilizó las directrices del EORTC/MSG para

establecer un diagnóstico de posible, probable o probada AI (130). El tratamiento de elección tras el diagnóstico de AI fue Voriconazol. Una vez recogidos los datos obtenidos en el contexto clínico proporcionados por el Servicio de Microbiología de ambos centros, se empleó la misma metodología (Aspergillus Ag Kit, Bio-Rad) para analizar este parámetro en los restantes sueros hasta completar el cronograma previsto. Esta determinación fue realizada en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Miguel Servet (Zaragoza).

4.3 Diseño experimental

En cada uno de los días fijados en el cronograma (Figura 6) de cada paciente se obtuvieron entre 40-50 mL de SP (empleando heparina de litio como agente anticoagulante) y 10 mL de sangre en tubo con gel separador de suero. Todas las muestras se procesaron en un plazo de 24 horas después de la extracción.

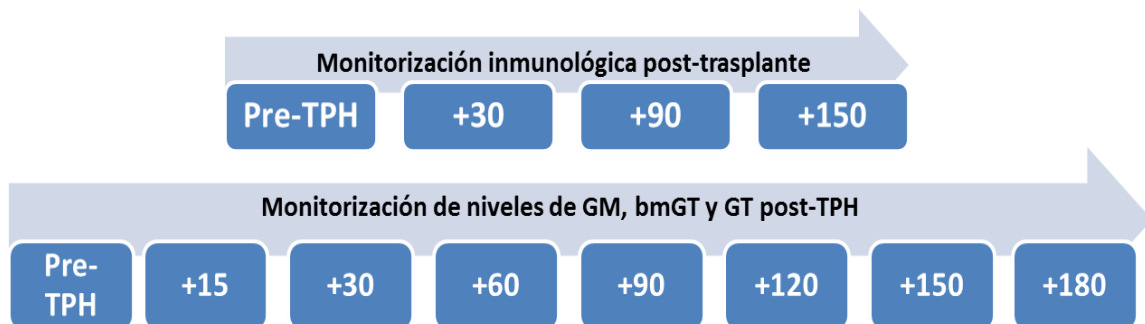


Figura 6. Cronograma de recogida de muestras de los pacientes incluidos en el Bloque II de estudio.

4.4 Monitorización inmunológica post-trasplante

4.4.1 Procesamiento inicial de la muestra

Tras la extracción de SP, se obtuvieron las CMN mediante centrifugación sobre gradiente de densidad utilizando Ficoll-Paque siguiendo protocolos estandarizados. Se utilizaron 5×10^5 CMN de cada una de las muestras obtenidas antes del trasplante y en los días +30, +90 y +150 posteriores a la infusión de PH, para caracterizar la reconstitución inmunológica post-TPH de cada paciente.

4.4.2 Cuantificación de subpoblaciones celulares

Concretamente, se analizaron mediante citometría de flujo las siguientes subpoblaciones celulares: células NK, mDC, LT CD4+ y LT CD8+. Para ello, las CMN fueron marcadas con anticuerpos monoclonales específicos (Tabla 4) e incubadas durante 15 minutos a TA y en oscuridad.

Tabla 4. Anticuerpos monoclonales empleados para citometría de flujo.

Antígeno	Fluorocromo	Clon	Casa comercial	Especificidad
CD3	VioletFluor450	UCHT1	Tonbo	Células T
CD45	APC-H7	2D1	BD	Leucocitos
CD45	PerCP Cy5.5	HI30	Tonbo	Leucocitos
CD4	PerCP	SK3	Biolegend	LT colaboradores
CD8	BV 510	SK1	Biolegend	LT citotóxicos
IFN- γ	APC	B27	BD	Células T
IL-2	PE	MQ1-17H12	BD	Células T
CD40L	FITC	24.31	Biolegend	Células T
CD107a	PECy7	H4A3	BD	Células T
CD16	APC Cy7	3G8	Biolegend	Células NK
CD56	PE	MY31	Tonbo	Células NK
CD158e (KIR3DL1)	APC	DX9	Biolegend	Células NK
CD158i (KIR2DS4)	FITC	REA860	Miltenyi Biotec	Células NK
CD11c	APC	MJ4-27G12	Miltenyi Biotec	mDC
CD86	PeCy7	IT2.2	Biolegend	mDC
CD14	PE	M5E2	BD	Monocitos

Al igual que en el análisis fenotípico realizado en el grupo de sujetos sanos (Bloque I) las células NK fueron definidas como CD3-CD16+CD45+ y divididas en dos subtipos basados en la expresión relativa del antígeno CD56: CD56^{dim} y CD56^{bright}. En este caso además se evaluó en la superficie de las células NK la expresión de receptores KIR, concretamente, CD158e (KIR3DL1) y CD158i (KIR2DS4). Paralelamente, mDC fueron

identificadas como CD3-CD11c+CD14-CD45+CD86+, LT “helper” como CD3+CD4+CD45+ y LT citotóxicos como CD3+CD8+CD45+.

4.4.3 Caracterización funcional de subpoblaciones de LT específicas de CMV/VEB/AdV

Con el objetivo de evaluar la respuesta inmunológica dirigida contra virus oportunistas se evaluó la producción de IFN- γ , IL-2 y la expresión de CD40L, CD107a por parte de los LT específicos de CMV/VEB/AdV de los pacientes. Para ello se utilizaron de nuevo 2×10^6 de CMN de las muestras obtenidas de los pacientes acorde al cronograma previamente descrito (Figura 6).

Utilizando la metodología descrita por Manz y col. y Assenmacher y col. (167, 168), las CMN fueron estimuladas simultáneamente con los PepTivators CMV^{pp65}, VEB^{EBNA-1} y AdV^{Hexon} (Miltenyi Biotec) durante 1 hora en un incubador a 37°C y 5% CO₂. Tanto el PepTivator CMV^{pp65} como el VEB^{EBNA-1} se han descrito en el bloque previo. El Peptivator AdV^{Hexon} cubre la secuencia de la proteína Hexon, proteína mayoritaria de la cápside del AdV. Como control negativo, CMN no fueron activadas y como control positivo el estímulo utilizado fue SEB (Sigma-Aldrich) a una concentración de 10 μ g/mL.

Tras la exposición durante 1 hora de las CMN a la mezcla de péptidos multiviral o a las condiciones control, estas fueron incubados con 10 μ g/mL de Brefeldin A (Sigma-Aldrich) y 2,5 μ g/mL de Monensina (Biolegend) durante 5 horas a 37°C en un incubador con una atmósfera con un 5% de CO₂. Ambos agentes se emplearon como inhibidores del transporte intracelular entre el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico, bloqueando con ello tras la activación celular el transporte de IFN- γ /IL-2 a la membrana y su secreción al medio extracelular. Este mecanismo permite que ambas moléculas se acumulen en el complejo Golgi/Retículo endoplásmico, pudiendo con ello ser detectadas mediante tinción intracelular.

Después de la incubación, las CMN fueron lavadas con dPBS frío, centrifugadas 8 min a 800g, decantadas y re-suspendidas en 200 μ L de EDTA 0,02% (Sigma-Aldrich). Tras 15 minutos de incubación a 37°C las células fueron fijadas y permeabilizadas empleando el kit IntraStain (Dako, Agilent Technologies, CA, EEUU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente, las células fueron teñidas con los

anticuerpos monoclonales intracelulares y de membrana específicos (Tabla 4) durante 20 minutos a TA y en oscuridad.

4.4.4 Análisis mediante citometría de flujo

Tras marcar las CMN con los correspondientes anticuerpos monoclonales (apartado 4.2 y 4.3) las CMN fueron lavadas y re-suspendidas en dPBS antes de su adquisición. De cada muestra, se adquirieron 250.000 eventos en un citómetro de flujo FACSCanto™ II 3 láseres. Para esta adquisición y el posterior análisis de los resultados se utilizó el software de análisis policromático FACSDiva 6.0.

La estrategia para el análisis de los CMN se describe a continuación. En primer lugar, las células fueron gateadas en base a su dispersión empleando el valor de dispersión lateral (*side scatter*-SSC) *versus* dispersión frontal (*forward scatter*-FSC). En segundo lugar, la concentración de cada subpoblación (células/ μ L de SP) se calculó utilizando los porcentajes de células NK, mDC, LT CD4+ y CD8+ determinados mediante citometría de flujo y el número total de leucocitos que había sido cuantificado antes del procesamiento de la sangre con un contador hematológico (Cell-Dyn Sapphire, Abbott Laboratories). A continuación, la concentración de LT CD4+ y CD8+ multivirales (CMV/VEB/AdV) que produjeron IFN- γ , IL-2 o expresaron CD40L y CD107a se calcularon a partir del total de los recuentos de leucocitos y los resultados obtenidos por citometría de flujo de cada subpoblación específica.

4.5 Monitorización de los niveles de GT y bmGT post-TPH

Como se ha descrito previamente en el diseño experimental, se recogieron muestras de suero de todos los pacientes incluidos en el estudio antes del trasplante y +15, +30, +60, +90, +120, +150 y +180 días después del mismo (Figura 6). Tal y como Domingo y col. describe en su estudio (144) mediante cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC) se realizó la detección y cuantificación de GT y bmGT en el suero de los pacientes reclutados, en colaboración con el Grupo de la Dra. Eva Gálvez (Instituto de Carboquímica-CSIC, Zaragoza).

Para ello, 200 μ L de suero fueron extraídos con Diclorometano (DCM), separando la fase orgánica y evaporando la muestra a sequedad. A continuación, el residuo obtenido se re-disolvió en DCM y se inyectó semiautomáticamente con Linomat IV (Camag, Muttenz, Suecia) en una placa de HPTLC. Estas placas están compuestas por un gel de

sílice que actúa como soporte de la fase estacionaria. A continuación, la placa cromatográfica es introducida en una cámara horizontal de elución donde se añade la fase móvil, la cual avanza por capilaridad a lo largo de la fase estacionaria. La fase móvil es una mezcla de Tetrahydrofurano/n-heptano/acetonitrilo (THF/C7/ACN; 58:40:2 [v/v/v]) (PanReac). Transcurridos 25 minutos, la placa se coloca en el escáner para cromatografía en capa fina, TLC Scanner IV, que permite la evaluación de los cromatogramas. Los resultados hallados tras la medición de las áreas de los picos entre 200-270 nm (UV-visible) fueron interpolados a una recta de calibrado de diferentes concentraciones de GT y bmGT (Sigma-Aldrich), en el rango comprendido entre 1- 75 ng de ambos componentes; como se describe en Domingo MP y col. (144) Todos los picos obtenidos cuya medición de su área se tradujera tras su interpolación en la recta de calibrado en una concentración de GT/bmGT se consideraron positivos. Los datos resultantes de GT/bmGT fueron expresados como $\mu\text{g/mL}$.

4.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico de este bloque de estudio se realizó con el software SPSS v.25. Los resultados se presentaron usando el software Prism (*GraphPad Prism* v.8). Las variables categóricas se describieron como números absolutos y porcentajes. El test exacto de Fisher se empleó para comparar variables cualitativas. Se calculó el Odds ratio (OR) y sus correspondientes intervalos de confianza del 95% (IC 95%). Por otro lado, tras aplicarse pruebas de normalidad que constatan la distribución no paramétrica de los datos, las variables cuantitativas fueron mostradas como valor de la mediana y su correspondiente rango.

Con el objetivo de comparar la reconstitución de las distintas subpoblaciones celulares analizadas en los diferentes subgrupos dentro de los primeros 180 días después de la infusión de PH, se empleó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Además, se utilizó la prueba de correlación de Spearman para analizar entre sí las subpoblaciones inmunológicas. Por otro lado, se estimó la incidencia acumulada de infección por CMV en el día +30 después del alo-TPH.

Finalmente, se realizó un análisis multivariante para evaluar la contribución de los distintos factores de interés clínico sobre la reconstitución inmunológica post-TPH. Los resultados inter-grupos se consideraron estadísticamente diferentes cuando se obtuvo una p-valor $<0,05$.

5. Bloque III

5.1 Población de estudio

Se incluyeron en este bloque de estudio de manera consecutiva 90 pacientes que recibieron un alo-TPH procedente de un hermano HLA-idéntico en el HGUGM durante el periodo comprendido entre los años 2000-2015. Simultáneamente se incluyeron también sus correspondientes 90 donantes HLA-idéntico. El periodo de estudio comprendió los primeros 180 días después de la infusión de PH. Por ello, cinco pacientes (5,4%), que fallecieron antes del día +180 post-TPH fueron excluidos del análisis.

5.2 Monitorización del CMV después del alo-TPH

Todos los pacientes recibieron Aciclovir (800mg/12h) desde la fecha de su ingreso en el HGUGM hasta aproximadamente un año después de la infusión de los PH como profilaxis antiviral frente a VHS. Tras la infusión y hasta el día +180 después del trasplante, todos los pacientes fueron monitorizados en relación a la aparición de complicaciones infecciosas relacionadas con el CMV. Para ello, se emplearon los mismos criterios clínicos que se han descrito previamente en el Bloque II. Del mismo modo, se monitorizó la carga viral de CMV en muestras de plasma sanguíneo mediante PCR cuantitativa a tiempo real empleando un límite de detección de 100 copias/mL (155 UI/mL). Se definió la infección primaria o reactivación por CMV como la detección de >100 copias/mL o >155 UI/mL de ADN de CMV en una muestra de plasma sanguíneo del paciente. La detección de ADN viral se realizó dos veces a la semana durante el primer mes después del alo-TPH y semanalmente hasta aproximadamente el día +100. El *status* serológico para CMV de todos los receptores y sus correspondientes donantes se determinó antes de la infusión de los PH en los Servicios de Microbiología del HGUGM. Ningún paciente recibió profilaxis contra el CMV.

Tal y como se ha descrito previamente, ante datos clínicos de reactivación vírica (carga viral >100 copias/mL), se instauró el tratamiento anticipativo con Valganciclovir (900mg/12h) o Foscarnet (60mg/kg/12h) con dosis ajustadas a la función renal. Esta terapia antiviral se mantuvo durante un mínimo de 2 semanas y se interrumpió después de un resultado negativo de PCR o una disminución significativa de la carga viral. Para

la definición de un “*nuevo episodio de infección por CMV*” así como de enfermedad causada por el virus se emplearon los criterios ya definidos en el bloque previo. Específicamente, se consideró probada la neumonía relacionada con CMV tras la detección de ADN viral en lavado broncoalveolar (BAL) combinado con la presencia en el paciente de síntomas clínicos y / o signos de neumonía (166).

5.3 Análisis de SNPs mediante secuenciación masiva

5.3.1 *Diseño de panel de NGS mediante enriquecimiento por captura*

Se seleccionaron mediante búsqueda bibliográfica genes implicados en la patogénesis del CMV o en otras infecciones víricas. En primer lugar, la búsqueda se centró en el contexto de las infecciones víricas después del alo-TPH, ampliándose posteriormente a otros contextos clínicos. La búsqueda bibliográfica se hizo en diferentes bases de datos electrónicas: MEDLINE (PubMed), Embase y la base de datos de revisiones sistemáticas de Cochrane. Para obtener una visión más amplia del tema, no se aplicaron restricciones cronológicas. Finalmente, en base a 24 artículos revisados exhaustivamente (Tabla 5), se seleccionaron los genes candidatos para su estudio. Los 50 genes seleccionados en base a esta búsqueda y otros elegidos por su relación con los primeros son descritos en la Tabla 5. De manera global, corresponden a genes que codifican moléculas relacionadas con el sistema inmunitario: citoquinas, quimioquinas y receptores asociados; habiendo mostrado algunos de ellos asociación con la infección por CMV en estudios previos.

Tabla 5. Genes relacionados con el sistema inmunológico seleccionados para el análisis.

Símbolo	Descripción	Referencia
<i>CCL4</i>	C-C motif chemokine ligand 4	
<i>CCL5</i>	C-C motif chemokine ligand 5	(169)
<i>CCL8</i>	C-C motif chemokine ligand 8	(150)
<i>CCR5</i>	C-C motif chemokine receptor 5	(156, 170, 171)
<i>CCR8</i>	C-C motif chemokine receptor 8	
<i>CD48</i>	CD48 molecule	
<i>CXCL1</i>	C-X-C motif chemokine ligand 1	(172)
<i>CXCL10</i>	C-X-C motif chemokine ligand 10	(173)
<i>CXCL12</i>	C-X-C motif chemokine ligand 12	(174)
<i>CXCR2</i>	C-X-C motif chemokine receptor 2	(172)
<i>CXCR4</i>	C-X-C motif chemokine receptor 4	(174)
<i>FOXP3</i>	Forkhead box P3	(151)
<i>IFNAR1</i>	interferon alpha and beta receptor subunit 1	
<i>IFNAR2</i>	interferon alpha and beta receptor subunit 2	
<i>IFNG</i>	Interferon gamma	(175-178)
<i>IFNGR1</i>	interferon gamma receptor 1	
<i>IFNGR2</i>	interferon gamma receptor 2	
<i>IFNK</i>	Interferon kappa	
<i>IFNL1</i>	Interferon lambda 1	
<i>IFNL2</i>	Interferon lambda 2	
<i>IFNL3</i>	Interferon lambda 3	
<i>IL10</i>	interleukin 10	(170, 171, 176, 178)
<i>IL10RA</i>	interleukin 10 receptor subunit alpha	
<i>IL10RB</i>	interleukin 10 receptor subunit beta	
<i>IL12A</i>	interleukin 12A	(179)
<i>IL12RB1</i>	interleukin 12 receptor subunit beta 1	
<i>IL12RB2</i>	interleukin 12 receptor subunit beta 2	
<i>IL1A</i>	interleukin 1 alpha	(180, 181)
<i>IL1B</i>	interleukin 1 beta	(180, 181)
<i>IL1RL1</i>	interleukin 1 receptor like 1	
<i>IL1RL2</i>	interleukin 1 receptor like 2	
<i>IL1RN</i>	interleukin 1 receptor antagonist	(153)
<i>IL2</i>	interleukin 2	(182)
<i>IL2RA</i>	interleukin 2 receptor subunit alpha	
<i>IL2RB</i>	interleukin 2 receptor subunit beta	
<i>IL4</i>	interleukin 4	(182)
<i>IL4R</i>	interleukin 4 receptor	(183)
<i>IL6</i>	interleukin 6	(175, 176, 180)
<i>IL6R</i>	interleukin 6 receptor	
<i>IL7R</i>	interleukin 7 receptor	(184)

Tabla 5 (continuación). Genes relacionados con el sistema inmunológico seleccionados para el análisis.

Símbolo	Descripción	Referencia
<i>KIR2DL1</i>	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 1	
<i>KIR2DL3</i>	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 3	
<i>KIR2DS4</i>	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 4	(116, 158)
<i>KIR3DL1</i>	killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 1	(185)
<i>KIR3DL2</i>	killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 2	
<i>KIR3DL3</i>	killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 3	
<i>LTA</i>	lymphotoxin alpha	
<i>TGFB1</i>	transforming growth factor beta 1	(182)
<i>TGFB2</i>	transforming growth factor beta 2	(182)
<i>TNF</i>	tumor necrosis factor	(153, 175, 186)

El diseño bioinformático del panel de 50 genes se realizó en colaboración con Sistemas Genómicos S.L (Valencia, España). La estrategia de diseño generó las sondas en todas las regiones definidas, que fueron fabricadas por la empresa *Agilent Technologies* siguiendo las normas para el kit de ADN *SureSelect* (*Agilent Technologies*). La secuenciación masiva se realizó en la Unidad de Genómica del HGUGM empleando la plataforma *HiSeq* (Illumina, CA, EEUU), siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante.

A partir de las 170 muestras de SP obtenidas en la evaluación previa al trasplante de los 85 pacientes y sus correspondientes 85 donantes, se obtuvo el ADN genómico empleando el kit de extracción de ADN *Maxwell® RSC Blood DNA Kit* (Promega, Wisconsin, EEUU). A continuación, se prepararon las librerías a partir de estas muestras de ADN genómico fragmentado. Tras la hibridación, se produjo la amplificación y secuenciación sobre la superficie sólida de la celda de flujo empleando la plataforma *HiSeq*. Dicha plataforma permite la secuenciación de ambos extremos del fragmento con lecturas pareadas “*paired-end sequencing*”.

La evaluación bioinformática de la secuenciación se realizó a través de la Unidad de Bioinformática de Sistemas Genómicos S.L. En primer lugar, se alinearon los archivos FASTQ obtenidos frente al genoma humano de referencia (v.GRCh37/hg19). Para la alineación se utilizó la herramienta *Burrows Wheeler Alignment tool v0.7.15-r1140*. En

segundo lugar, se emplearon filtros para eliminar duplicados de PCR, alineamientos múltiples, así como lecturas en blanco. Una vez calculada la cobertura obtenida tras la alineación, se identificaron las variantes genómicas utilizando la plataforma *GATK v.2.8-1* así como algoritmos proporcionados por el software *VarScan*. La anotación de variantes genómicas se basó en los transcritos humanos obtenidos de la plataforma *Ensembl Released v81*. Finalmente, se empleó el programa *Integrative Genomics Viewer (Broad Institute)* para visualizar las variantes genómicas tras la alineación frente el genoma de referencia y para confirmar la precisión de las mismas.

5.3.2 Filtrado de variantes genómicas

El software Genesystems (Sistemas Genómicos S.L.) se empleó para el análisis final de las variantes genómicas, proporcionando la infraestructura y la interfaz para el análisis bioinformático. El esquema empleado para el filtrado de las variantes se resume a continuación:

- Se seleccionaron SNPs y pequeñas inserciones y eliminaciones (INDELs), del inglés “*insertion-deletion length polymorphism*”.
- Se analizaron polimorfismos ubicados en regiones codificantes, en zonas de corte y empalme, del inglés “*splicing*” y en regiones intrónicas.
- Se excluyeron las variantes sinónimas.
- Se seleccionaron polimorfismos con una profundidad de lectura “Depth” $\geq 30x$.
- Se seleccionaron polimorfismos con una frecuencia alélica de la variante (VAF) $\geq 0,4$.
- Se seleccionaron polimorfismos con una frecuencia alélica poblacional (MAF) $\geq 10\%$ en la población europea para detectar SNPs y INDELs que puedan tener utilidad en la práctica clínica. Para consultar la MAF de cada variante, se utilizaron las siguientes bases de datos poblacionales: *GnomAD* y *1000 genomes*.

Finalmente, se utilizaron las bases de datos *Genecards* y *Uniprot* para obtener información genética sobre la función de la proteína codificada por cada gen, dominios críticos, etc.

5.4 Análisis estadístico

El software estadístico SPSS v.25 se utilizó para el análisis estadístico de este bloque de estudio, excepto para el cálculo de la incidencia acumulada que se calculó con el software estadístico R (versión 3.3.2). Los datos analizados de pacientes y donantes incluidos se expresan como valor numérico y porcentaje (%) para variables categóricas y como mediana y rango para variables cuantitativas. Las diferencias inter-grupos se evaluaron mediante el test exacto de Fisher. Los valores de p-valor $<0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Además, se aplicaron modelos de regresión logística múltiple para elaborar un modelo genético pre-trasplante con el objetivo de predecir la infección por CMV, así como la frecuencia de la misma. En estos modelos únicamente se incluyeron los polimorfismos genéticos y las variables clínicas con $p < 0,05$ en el análisis previo. La capacidad predictiva de cada modelo construido se evaluó empleando el área bajo la curva (AUC). Posteriormente, se seleccionaron los mejores modelos en función del AUC y del nº de variantes genéticas utilizadas.

Una vez seleccionado el modelo predictivo, se asignó a cada variante genética un valor score y un coeficiente para elaborar una ecuación de cálculo de riesgo. Se evaluaron distintos puntos de corte en función de los siguientes parámetros: sensibilidad, especificidad, VPP y valor predictivo negativo (VPN). Finalmente, en función del punto de corte seleccionado, se clasificaron los pacientes como de bajo o alto riesgo con la puntuación obtenida en el modelo predictivo elegido.

RESULTADOS

1. Bloque I

1.1. El tratamiento profiláctico frente a EICR inhibe la subpoblación de células NK CD56^{dim} tras estimulación antigénica con CMV^{pp65} o VEB^{EBNA-1}

Sobre las CMN aisladas de los 20 sujetos sanos incluidos en este bloque de estudio, inicialmente se analizó el efecto causado por la exposición a los antígenos virales CMV^{pp65} o VEB^{EBNA-1}. Concretamente, se evaluó el efecto de los antígenos virales sobre la frecuencia de las subpoblaciones de células NK CD56^{dim}, mDC, LT CD4+ y LT CD8+. Tras el análisis, no se encontraron diferencias en la frecuencia media de ninguna de las subpoblaciones inmunológicas estudiadas, con respecto a las CMN no estimuladas con los antígenos virales.

Posteriormente, se evaluó también sobre CMN, más concretamente sobre las subpoblaciones de células NK CD56^{dim}, mDC, LT CD4+ y LT CD8+, que habían sido expuestas a los antígenos virales (CMV^{pp65} o VEB^{EBNA-1}), el efecto del tratamiento farmacológico que se administra habitualmente en la práctica clínica como profilaxis contra EICR (CsA 200ng/mL y MTX 10µM) (Tabla 6). Tras el desarrollo de este ensayo se observó una disminución significativa de los valores absolutos obtenidos para las células NK CD56^{dim}, en presencia de CsA y MTX ($p^{\text{CMV}}=0,014$ y $p^{\text{VEB}}=0,004$, respectivamente).

Evaluando específicamente estos resultados en cada uno de los días analizados (basal, +4 y +8), se pudo observar, tal y como se representa en la Figura 7 que después de exponer las CMN al pool antigénico de CMV^{pp65} y al posterior tratamiento inmunosupresor con CsA y MTX, a los 4 días de cultivo existía una reducción significativa de la frecuencia de células NK CD56^{dim} en relación a la condición experimental donde sí existía presencia de antígeno viral pero ausencia de fármacos ($22975,0 \pm 9791,2$ células vs $13050,0 \pm 6392,6$ células, $p^{\text{CMV}}=0,002$). Los resultados obtenidos a los 8 días de incubación fueron similares: $14925,0 \pm 7369,5$ células NK CD56^{dim} vs $6712,5 \pm 5235,4$ células, $p^{\text{CMV}} < 0,001$.

Del mismo modo, se observaron resultados equivalentes cuando las células fueron activadas con el antígeno VEB^{EBNA-1} [$24762,5 \pm 11337,7$ células NK CD56^{dim} vs $15100,0 \pm 6677,9$ en presencia de CsA y MTX ($p^{\text{VEB}}=0,012$) después de 4 días de cultivo y $15650,0 \pm 8593,3$ vs $3762,5 \pm 3298,2$ ($p^{\text{VEB}} < 0,001$) después de 8 días de

incubación], Figura 7. Además, esta reducción tras el tratamiento con CsA y MTX en el recuento absoluto de células NK CD56^{dim} estimuladas con CMV^{pp65} o VEB^{EBNA-1} fue dependiente del tiempo de incubación ($p^{CMV/VEB} < 0,001$), obteniéndose un mayor efecto de dichos fármacos a los 8 días de incubación.

Siguiendo la misma premisa que para el análisis de las células NK CD56^{dim}, se evaluó y cuantificó el efecto del tratamiento con CsA y MTX sobre mDC previamente expuestas a los antígenos virales de CMV^{pp65} o VEB^{EBNA-1}. No se observó ningún efecto farmacológico sobre esta subpoblación (Tabla 6, Figura 8). De forma equivalente, los tratamientos con CsA y MTX administrados sobre CMN después de que éstas habían sido expuestas a los estímulos virales no indujeron una reducción de la frecuencia media de LT CD4+ o LT CD8+ (Tabla 6).

Tabla 6. Resultados obtenidos para el cultivo de CMN tras el estímulo antigénico y en presencia de CsA y MTX. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

Subpoblación celular	CMV ^{pp65} o VEB ^{EBNA-1}	CMV ^{pp65} o VEB ^{EBNA-1} +MTX +CsA	p-valor
CMV^{pp65}			
NK CD56 ^{dim}	21545,8 \pm 11313,1	15170,8 \pm 11308,8	0,014
mDC	1004,2 \pm 928,0	920,8 \pm 1125,1	0,987
LT CD4+	85958,3 \pm 16849,1	82950,0 \pm 17976,3	0,861
LT CD8+	38000,0 \pm 12004,1	35670,8 \pm 12239,7	0,824
VEB^{EBNA-1}			
NK CD56 ^{dim}	26700,0 \pm 15029,7	17279,2 \pm 14347,8	0,004
mDC	633,3 \pm 572,1	683,3 \pm 791,7	0,994
LT CD4+	82416,7 \pm 16433,1	79866,7 \pm 16681,4	0,933
LT CD8+	42137,5 \pm 9926,5	40000,0 \pm 9752,2	0,866

En resumen, la activación *in vitro* de CMN con antígenos virales CMV^{pp65} o VEB^{EBNA-1} no produjo cambios significativos en el recuento absoluto de ninguna de las subpoblaciones celulares analizadas. Sin embargo, la adición de CsA y MTX sobre las CMN expuestas a estos antígenos virales provocó la depleción de la subpoblación de células NK CD56^{dim}, a diferencia de lo observado sobre las subpoblaciones de mDC, LT CD4+ y LT CD8+ en donde dicha reducción numérica no era observada.

1.2. La presencia de GT inhibe la respuesta inmunológica tras la estimulación antigénica con CMV^{pp65} o VEB^{EBNA-1}

El mismo efecto negativo encontrado sobre las células NK CD56^{dim} cuando las CMN eran expuestas a los fármacos inmunosupresores, fue también observado con esta nueva condición. La incubación simultánea de CMN con CMV^{pp65} o VEB^{EBNA-1} y con la

proteína fúngica GT provocó una disminución significativa de la frecuencia de células NK CD56^{dim} ($p^{\text{CMV}} < 0,001$ y $p^{\text{VEB}} = 0,006$) (Tabla 7).

Realizando de nuevo un análisis específico del ensayo en relación a los días de cultivo, se pudo observar que a los 4 días se produjo una reducción de la frecuencia de esta subpoblación tras la incubación con CMV^{pp65} y GT ($22975,0 \pm 9791,2$ vs $11837,5 \pm 7198,9$; $p^{\text{CMV}} < 0,001$). De forma paralela a los 8 días de incubación se obtuvieron datos equivalentes ($14925,0 \pm 7369,5$ vs $2950,0 \pm 3386,9$ células NK CD56^{dim}; $p^{\text{CMV}} < 0,001$).

Con el antígeno VEB^{EBNA-1} se obtuvieron también resultados similares. Después de 8 días de cultivo, la frecuencia media de células NK CD56^{dim} se redujo significativamente en presencia de GT respecto al control activado únicamente por el pool antigénico viral [$15650,0 \pm 8593,3$ vs $2475,0 \pm 2863,0$ ($p^{\text{VEB}} < 0,001$)]. Estos resultados son representados en la Figura 7. Este efecto de depleción de la GT sobre la subpoblación de células NK CD56^{dim} resultó ser dependiente también del tiempo de cultivo en presencia de cualquiera de los dos virus estudiados ($p^{\text{CMV/VEB}} < 0,001$).

A continuación, se analizó el efecto de la GT sobre la subpoblación de LT CD4+ y CD8+ tras la activación antigénica. En el análisis global del ensayo se pudo observar que el mismo efecto observado sobre las células NK CD56^{dim} se reprodujo mayoritariamente sobre la subpoblación de LT CD4+ y CD8+ pero con algunas excepciones. Globalmente, la subpoblación de LT CD4+ activados con CMV^{pp65} seguía el mismo patrón descrito para NK, su valor medio se reducía significativamente en presencia de la toxina fúngica ($85958,3 \pm 16849,1$ a $74025,0 \pm 13944,8$; $p^{\text{CMV}} = 0,001$). Sin embargo, cuando las CMN eran expuestas al antígeno VEB^{EBNA-1} en presencia de GT este efecto negativo no era reproducido (Tabla 7).

Respecto a la subpoblación de LT CD8+, la presencia de GT reducía de forma significativa la frecuencia de LT CD8+ activados con los antígenos víricos testados ($p^{\text{CMV}} < 0,001$ y $p^{\text{VEB}} = 0,017$) (Tabla 7). Tras realizar el análisis específico del ensayo en relación a los días de cultivo, el efecto observado por la GT tuvo lugar específicamente a los 8 días de cultivo (Figura 10). El valor medio de los LT CD8+ después de la estimulación con CMV^{pp65} ($37762,5 \pm 12459,0$) se reducía significativamente ($23050,0 \pm 9575,0$) en presencia de GT ($p^{\text{CMV}} = 0,001$).

En ese mismo día de estudio se obtuvo el mismo efecto negativo después de activar las CMN con el antígeno VEB^{EBNA-1}. Una reducción significativa de los LT CD8+ ($41600,0$

$\pm 9989,3$ a $27662,5 \pm 14945,8$) fue observada en presencia de GT ($p^{\text{VEB}}=0,004$) (Figura 10). En ambos casos cómo ocurría para las células NK CD56^{dim} la reducción de la frecuencia media de estos LT citotóxicos fue dependiente del tiempo de incubación en presencia de GT ($p^{\text{CMV}}=0,010$ y $p^{\text{VEB}}=0,007$).

Tabla 7. Resultados obtenidos tras el cultivo de CMN activados con CMV^{pp65} o VEB^{EBNA-1} y en presencia de GT. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

Subpoblación celular	CMV ^{pp65} o VEB ^{EBNA-1}	CMV ^{pp65} o VEB ^{EBNA-1} + GT	p-valor
CMV^{pp65}			
NK CD56 ^{dim}	21545,8 \pm 11313,1	11329,2 \pm 10146,3	<0,001
mDC	1004,2 \pm 928,0	783,3 \pm 739,9	0,670
LT CD4+	85958,3 \pm 16849,1	74025,0 \pm 13944,8	0,001
LT CD8+	38000,0 \pm 12004,1	29008,3 \pm 11398,1	<0,001
VEB^{EBNA-1}			
NK CD56 ^{dim}	26700,0 \pm 15029,7	17520,8 \pm 15705,9	0,006
mDC	633,3 \pm 572,1	670,8 \pm 814,9	0,998
LT CD4+	82416,7 \pm 16433,1	74954,2 \pm 18614,1	0,143
LT CD8+	42137,5 \pm 9926,5	35287,5 \pm 13546,5	0,017

Por lo tanto, a diferencia de lo que ocurrió con las mDC dónde no se observó ningún cambio tras la activación viral y la exposición a la GT, el efecto encontrado sobre las células NK CD56^{dim} y los LT fue diferente. Una potente cinética inhibitoria sobre las células NK CD56^{dim} y un diferente comportamiento de los LT CD4+ y CD8+ a la presencia combinada de los diferentes antígenos virales con la GT fueron los hallazgos significativos de este ensayo.

1.3. GT potencia el efecto inmunosupresor de CsA y MTX sobre las células NK CD56^{dim} y LT CD4+ y CD8+ en presencia de antígenos CMV^{pp65} o VEB^{EBNA-1}

Tras demostrar el efecto inhibitorio de la GT sobre subpoblaciones inmunológicas que habían sido expuestas a antígenos virales, se evaluó cómo la combinación simultánea de GT (400ng/mL), CsA (200ng/mL) y MTX (10 μ M) afectaba a estas mismas subpoblaciones celulares, tras ser activadas de nuevo con los mismos antígenos virales (CMV^{pp65} o VEB^{EBNA-1}). El valor medio de los valores absolutos obtenidos en cada una de las condiciones experimentales estudiadas en los 20 sujetos sanos es mostrado en la Tabla 8.

Cuando los datos fueron analizados para cada subpoblación se pudo observar que el valor medio de las células NK CD56^{dim} disminuía en presencia de MTX, CsA y GT tras haber sido estimuladas las CMN con CMV^{pp65} si se comparaba con la condición

experimental de activación viral y exposición única al tratamiento profiláctico ($p^{\text{CMV}}=0,012$). Sin embargo, este resultado no se reproducía tras estimular las células con $\text{VEB}^{\text{EBNA-1}}$ (Tabla 8). Los resultados obtenidos a cada día de análisis son representados en la Figura 7.

Cuando las subpoblaciones de LT fueron analizadas se observó que la combinación de GT con CsA y MTX producía una reducción significativa del valor medio de los LT estimulados por antígenos víricos en comparación con el tratamiento único con CsA y MTX, tal y como se describe en la Tabla 8. Específicamente, el valor medio de LT CD4+ estimulados con CMV^{pp65} se redujo significativamente de $92837,5 \pm 20812,2$ en ausencia de GT a $61900,0 \pm 22142,5$ células tras la combinación de GT, CsA y MTX después de 8 días de cultivo, $p^{\text{CMV}} < 0,001$. Idénticos resultados se obtuvieron a los mismos días tras el estímulo con $\text{VEB}^{\text{EBNA-1}}$ ($85437,5 \pm 19346,5$ vs $56250,0 \pm 26761,5$ células T CD4+) y la exposición a GT, CsA y MTX, $p^{\text{VEB}} < 0,001$, (Figura 9).

Del mismo modo, los resultados obtenidos para los LT CD8+ siguieron un patrón similar. De nuevo a los 8 días de incubación, los valores absolutos de LT CD8+ estimulados con CMV^{pp65} y $\text{VEB}^{\text{EBNA-1}}$ mostraron una disminución significativa cuando se combinó GT con CsA y MTX en comparación al tratamiento único con CsA/MTX ($34500,0 \pm 14475,5$ vs $16062,5 \pm 7984,3$, $p^{\text{CMV}} < 0,001$ y $38000,0 \pm 11619,2$ vs $16137,5 \pm 11830,3$, $p^{\text{VEB}} < 0,001$) (Figura 10).

Tabla 8. Resultados obtenidos tras el cultivo de CMN activados con CMV^{pp65} o $\text{VEB}^{\text{EBNA-1}}$ en presencia de CsA, MTX y CMN activados y en tratamiento simultáneamente con CsA, MTX y GT. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

Subpoblación celular	CMV^{pp65} o $\text{VEB}^{\text{EBNA-1}}$ +MTX +CsA	CMV^{pp65} o $\text{VEB}^{\text{EBNA-1}}$ + MTX +CsA + GT	p-valor
CMV^{pp65}			
NK CD56 ^{dim}	15170,8 \pm 11308,8	8695,8 \pm 10467,3	0,012
mDC	920,8 \pm 1125,1	675,0 \pm 882,1	0,573
LT CD4+	82950,0 \pm 17976,3	66958,3 \pm 17254,1	<0,001
LT CD8+	35670,8 \pm 12239,7	24400,0 \pm 12169,0	<0,001
$\text{VEB}^{\text{EBNA-1}}$			
NK CD56 ^{dim}	17279,2 \pm 14347,8	13070,8 \pm 14021,8	0,515
mDC	683,3 \pm 791,7	579,2 \pm 650,1	0,917
LT CD4+	79866,7 \pm 16681,4	66487,5 \pm 21402,8	<0,001
LT CD8+	40000,0 \pm 9752,2	29625,0 \pm 15092,5	<0,001

Finalmente, empleando la prueba de Wilcoxon se comparó el efecto de depleción causado por la combinación de GT, CsA y MTX sobre las subpoblaciones de NK CD56^{dim} y LT. Los datos obtenidos mostraron que después de la estimulación con

cualquiera de los dos antígenos virales ($p^{\text{CMV/VEB}} < 0,001$) los LT CD4+ y CD8+ eran más sensibles al tratamiento combinado en relación a las células NK CD56^{dim}. No hay diferencias cuando se comparan los resultados entre ambas subpoblaciones de LT ni entre los virus testados.

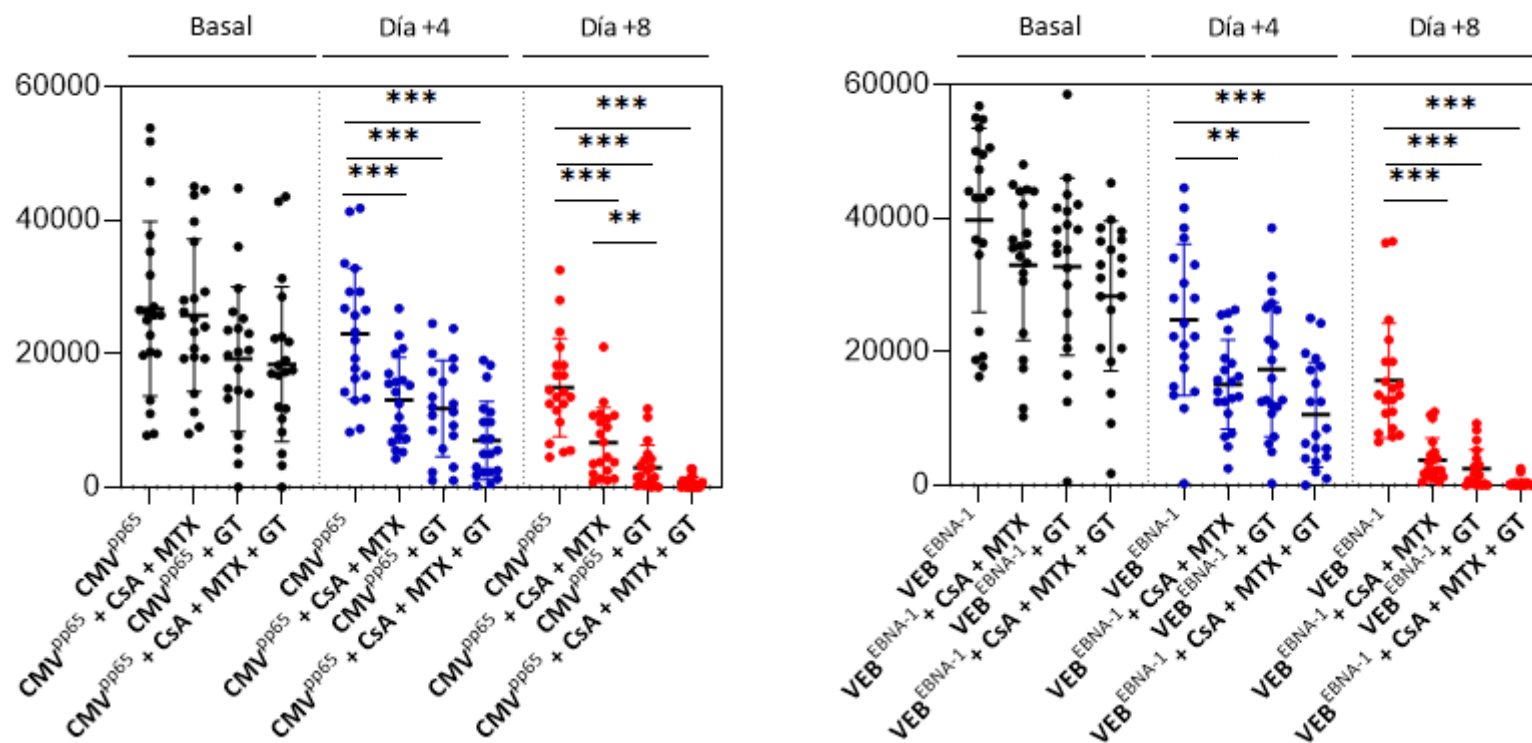


Figura 7. Resultados obtenidos para las subpoblaciones celulares de NK CD56^{dim} en los diferentes días de cultivo analizados (basal, +4 y +8) y en las condiciones experimentales estudiadas. La condición basal (sin estímulo antigénico no se representa). El nivel de significación en el test ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$) se representa por una, dos o tres estrellas, respectivamente.

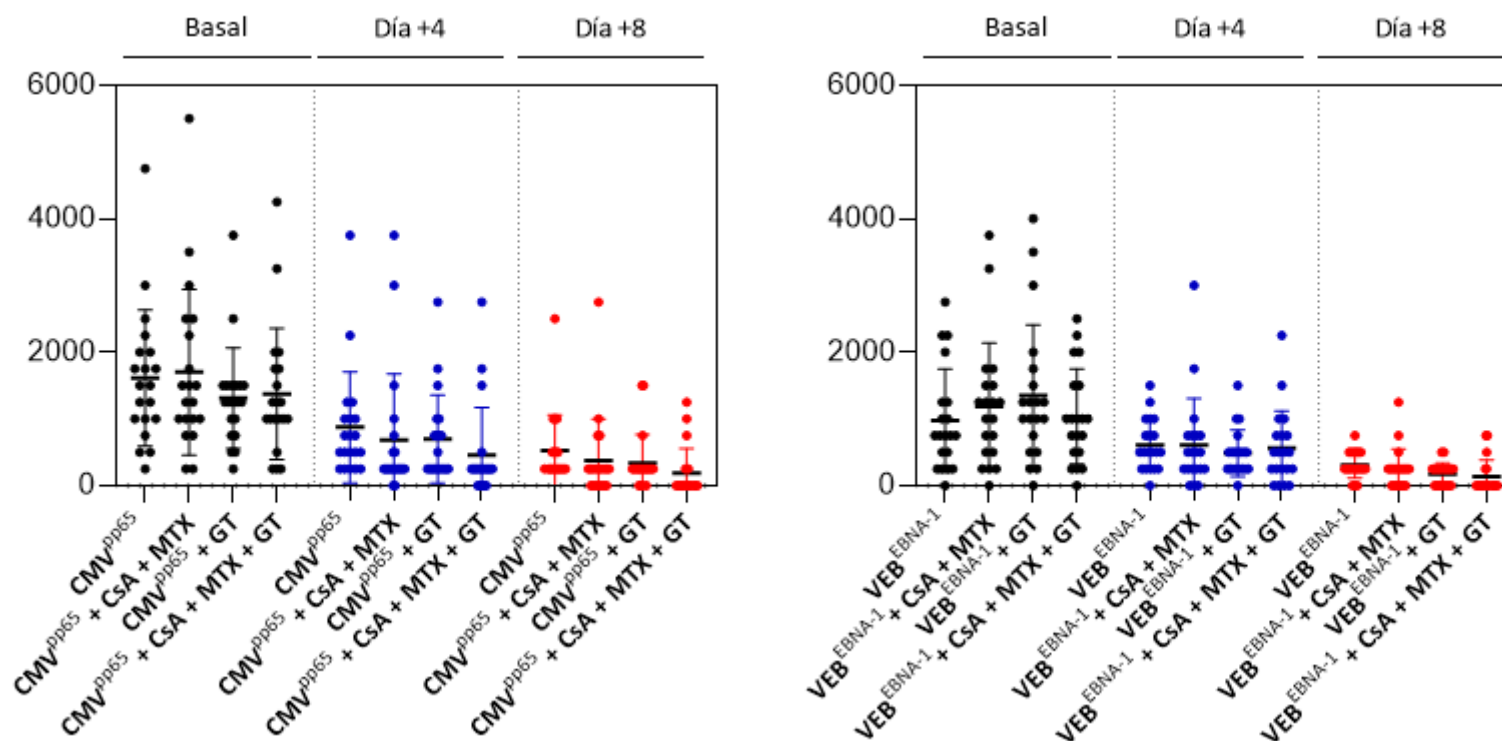


Figura 8. Resultados obtenidos para las subpoblaciones celulares de mDC en los diferentes días de cultivo analizados (basal, +4 y +8) y en las condiciones experimentales estudiadas. La condición basal (sin estímulo antigénico no se representa).

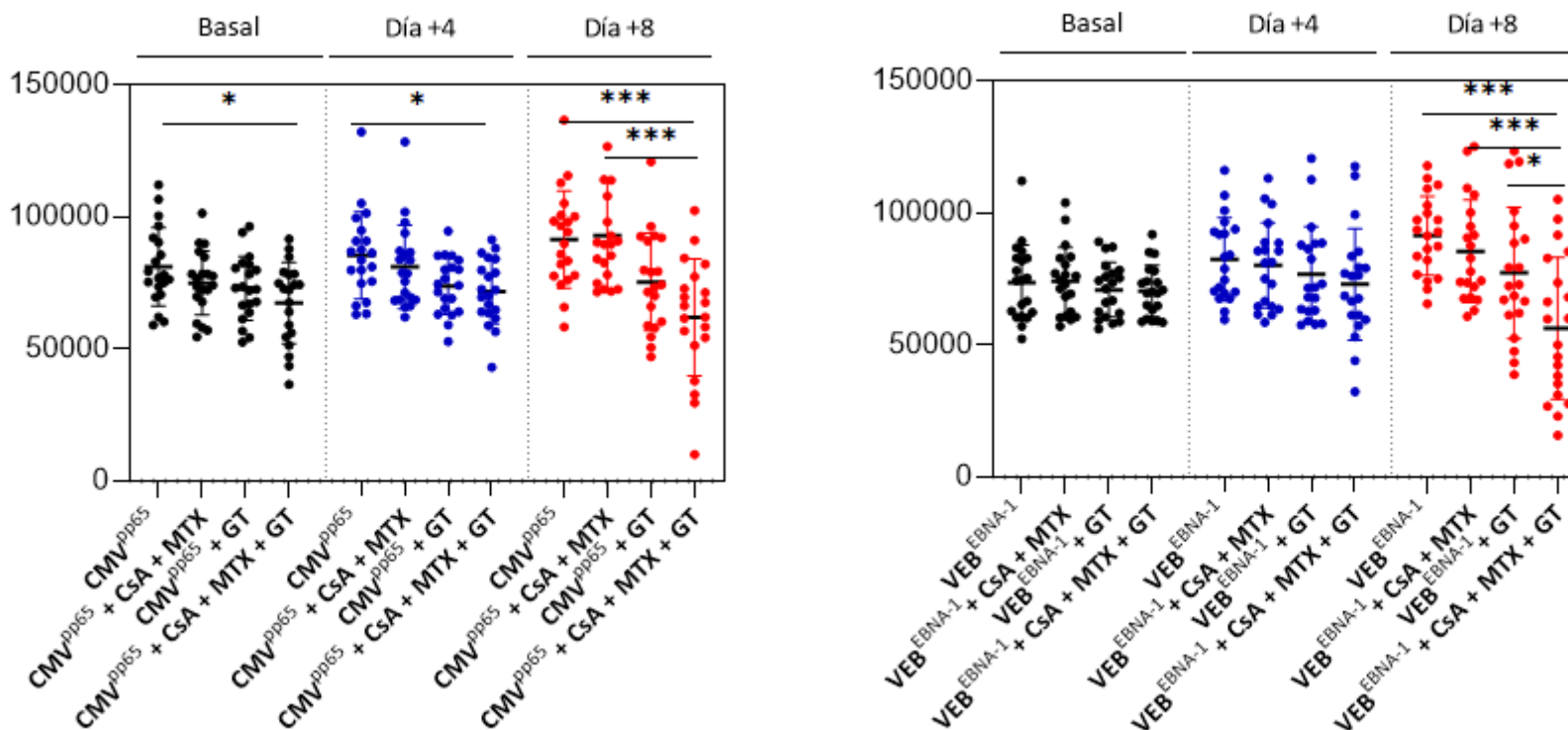


Figura 9. Resultados obtenidos para las subpoblaciones celulares de LT CD4+ en los diferentes días de cultivo analizados (basal, +4 Y +8) y en las condiciones experimentales estudiadas. La condición basal (sin estímulo antigénico no se representa). El nivel de significación en el test ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$) se representa por una, dos o tres estrellas, respectivamente.

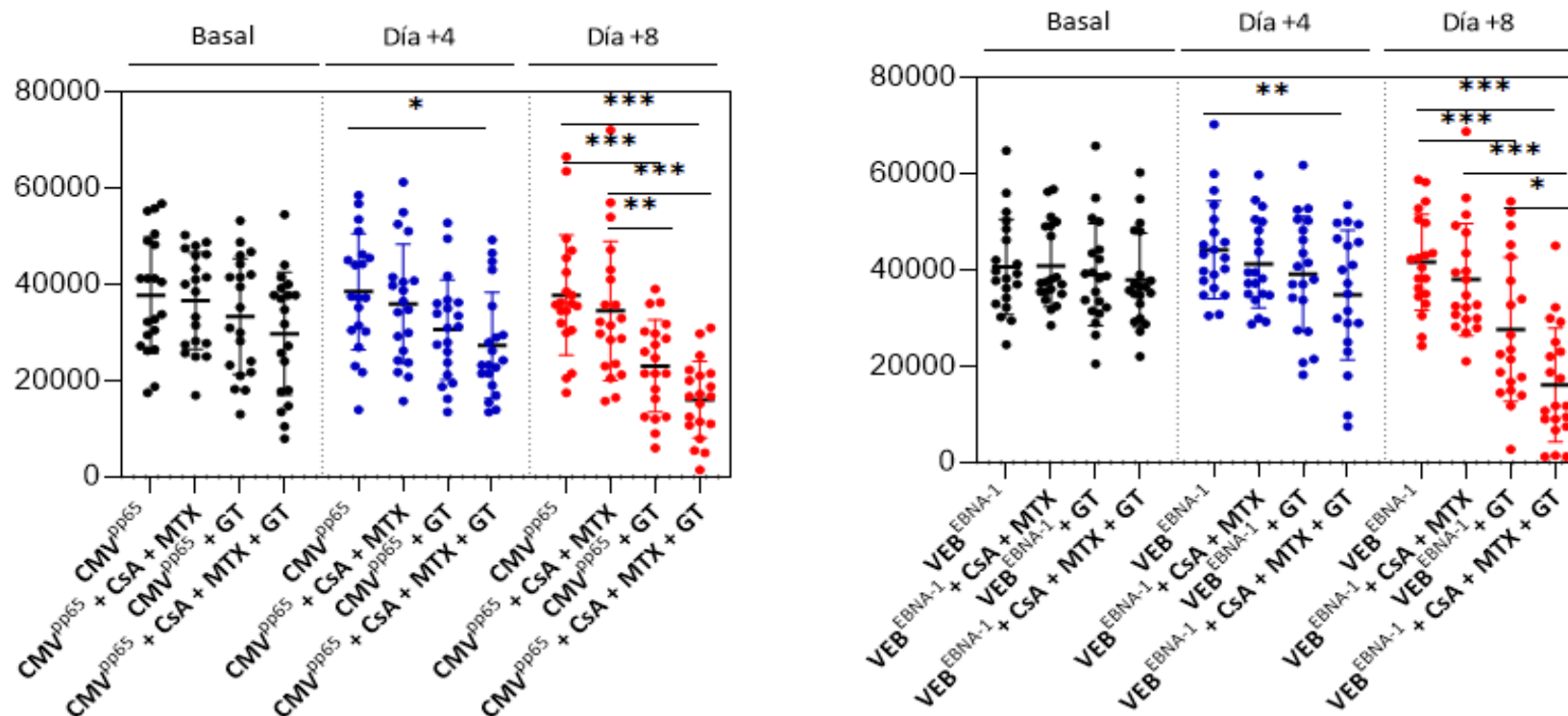


Figura 10. Resultados obtenidos para las subpoblaciones celulares de LT CD8+ en los diferentes días de cultivo analizados (basal, +4 Y +8) y en las condiciones experimentales estudiadas. La condición basal (sin estímulo antigénico no se representa). El nivel de significación en el test ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$) se representa por una, dos o tres estrellas, respectivamente.

En resumen, la GT potencia el efecto inhibitorio causado por la administración concomitante de CsA y MTX. Ello afecta de manera significativa a la frecuencia de células NK CD56^{dim} y LT CD4⁺ y CD8⁺ que han sido activadas por los antígenos virales CMV^{pp65} o VEB^{EBNA-1}. Además, este efecto inhibitorio se ha demostrado que fue más potente sobre los LT activados con CMV^{pp65} o VEB^{EBNA-1} que sobre las NK CD56^{dim}.

1.4. Efecto anti-proliferativo de la GT sobre los LT tras el estímulo antigénico con CMV^{pp65} o VEB^{EBNA-1}

Tras observar que la combinación de los fármacos CsA y MTX con la GT tenía un efecto inhibitorio sobre los LT activados con CMV^{pp65} y VEB^{EBNA-1}, se quiso evaluar como dicha condición afectaba a la proliferación de LT activados con los antígenos CMV^{pp65} o VEB^{EBNA-1}. En primer lugar, los resultados obtenidos son mostrados en la Tabla 9 y representados en la Figura 11 describen que el tratamiento con los fármacos CsA y MTX a las concentraciones utilizadas no inhibe la proliferación de las subpoblaciones de LT CD4⁺ y CD8⁺ tras la activación viral. Este resultado está en consonancia con el efecto observado y descrito en el apartado previo sobre el efecto nulo que dichos fármacos generan sobre el recuento absoluto de dichas subpoblaciones.

Paralelamente se pudo observar que la proliferación de LT activados con el pool de péptidos de CMV^{pp65} o VEB^{EBNA-1} disminuía de forma significativa tras ser incubados con GT. Concretamente, tal y como se indica en la Tabla 9, el valor medio de LT CD8⁺ que habían proliferado (CFSE^{dim}) tras ser estimulados con CMV^{pp65} y permanecer en cultivo con GT durante 8 días se reducía significativamente de $17362,5 \pm 8936,7$ a $637,5 \pm 522,3$ LT CD8⁺CFSE^{dim} ($p^{\text{CMV}}=0,027$). Resultados similares se obtuvieron cuando los LT CD8⁺ activados con VEB^{EBNA-1} e incubados con GT durante 8 días ($18837,5 \pm 7162,7$ a $1487,5 \pm 2323,3$ LT CD8⁺ CFSE^{dim}, $p^{\text{VEB}}<0,001$). Dichos datos están de nuevo en concordancia con los encontrados en los ensayos previos en donde la concentración de LT CD8⁺ disminuía significativamente en presencia de un estímulo viral y la GT a los mismos días de cultivo.

Con respecto al análisis de los LT CD4⁺, después de 8 días de incubación se observó también una reducción significativa de la proliferación causada por la exposición a la GT después de la estimulación con CMV^{pp65} o VEB^{EBNA-1} ($p^{\text{CMV}}=0,049$ y $p^{\text{VEB}}=0,036$) (Tabla 9, Figura 11). Sin embargo, estos datos no están en concordancia con los ensayos

previos que mostraban que el pool antigénico de CMV^{pp65} era el único que al combinarse con la GT generaba una reducción significativa del número de LT CD4+.

Por último, se observó que la combinación de GT con CsA y MTX producía una reducción significativa del valor medio de los LT que proliferaban tras el estímulo con cualquiera de los estímulos víricos testados, tal y como se describe en la Figura 11. Idénticos resultados se obtuvieron tras el estímulo con CMV^{pp65} y VEB^{EBNA-1} para ambas subpoblaciones de LT. Un ejemplo de los resultados obtenidos para las condiciones analizadas se muestra en la Figura 12.

Tabla 9. Resultados de proliferación de LT obtenidos empleando CFSE en los diferentes días de cultivo analizados y en las condiciones experimentales estudiadas. Los resultados se expresan como el valor medio de células que han proliferado (fracción CFSE^{dim}) ± desviación estándar.

Subpoblación celular	Días de cultivo	Basal	CMV ^{pp65}	CMV ^{pp65} +MTX +CsA	CMV ^{pp65} + GT	CMV ^{pp65} +MTX +CsA + GT	PHA
LT CD4+	+1	962,5±783,3	1150,0±1410,4	912,5±660,3	887,5±593,1	862,5±570,5	1887,5±2245,5
	+4	3387,5±1855,7	5437,5±2941,1	2650,0±1586,1	1025,0±942,0	1062,5±895,4	43487,5±38604,0
	+8	8600,0±4866,9	15975,0±8313,7	4687,5±2998,7	787,5±629,7	837,5±1211,9	60275,0±41242,6
LT CD8+	+1	912,5±722,1	1162,5±1357,9	837,5±575,1	887,5±576,2	787,5±603,0	1362,5±808,9
	+4	4725,0±3560,4	7825,0±5289,6	2812,5±1889,8	1250,0±1325,3	1025,0±888,1	31462,5±25793,1
	+8	10075,0±5920,0	17362,5±8936,7	7100,0±4396,0	637,5±522,3	650,0±625,1	53250,0±39829,7
Subpoblación celular	Días de cultivo	Basal	VEB ^{EBNA-1}	VEB ^{EBNA-1} +MTX +CsA	VEB ^{EBNA-1} + GT	VEB ^{EBNA-1} +MTX +CsA + GT	PHA
LT CD4+	+1	737,5±609,5	837,5±703,7	887,5±704,6	1350,0±1148,2	1300,0±1401,5	2462,5±2858,8
	+4	3325,0±1662,4	4637,5±2530,6	2987,5±1772,3	2287,5±1738,2	1962,5±1377,1	28537,5±24534,9
	+8	9187,5±4784,7	15425,0±5513,7	6375,0±3035,4	1862,5±2404,0	1525,0±1666,0	52212,5±33769,9
LT CD8+	+1	787,5±608,4	837,5±586,4	887,5±709,3	1150,0±940,3	1312,5±1366,6	2100,0±1947,3
	+4	5112,5±3516,3	8750,0±5917,1	3587,5±2197,8	2012,5±1346,2	1775,0±1035,2	27212,5±18030,3
	+8	10787,5±6041,6	18837,5±7162,7	7312,5±4341,4	1487,5±2323,3	1212,5±1662,8	44862,5±28770,0

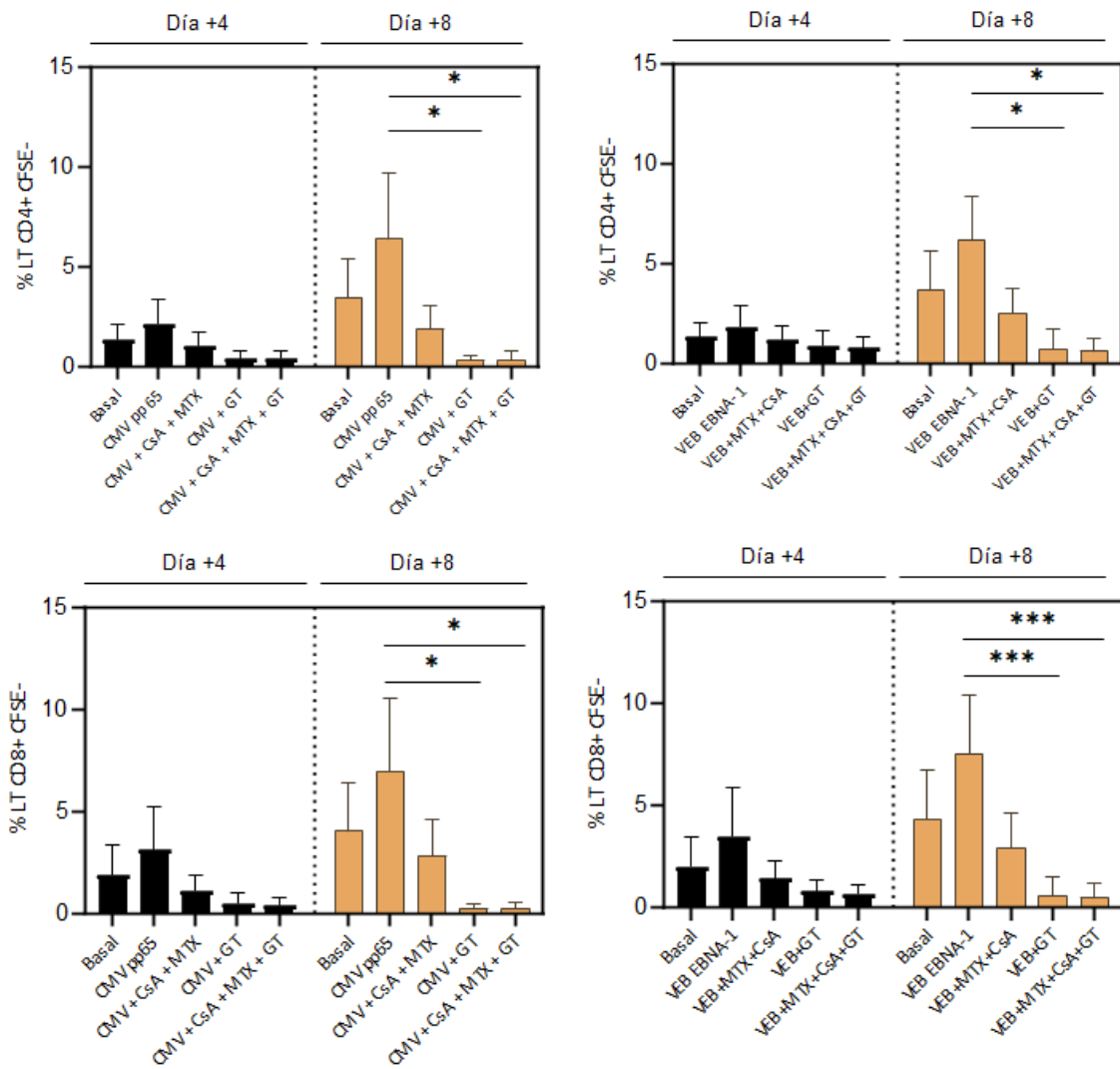


Figura 11. Resultados de proliferación de LT obtenidos a los 4 y 8 días de cultivo en las condiciones experimentales estudiadas. Los resultados se expresan como el porcentaje medio de células que han proliferado (fracción CFSE^{dim}) \pm desviación estándar. Los resultados obtenidos con PHA no se representan. El nivel de significación en el test ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$) se representa por una, dos o tres estrellas, respectivamente.

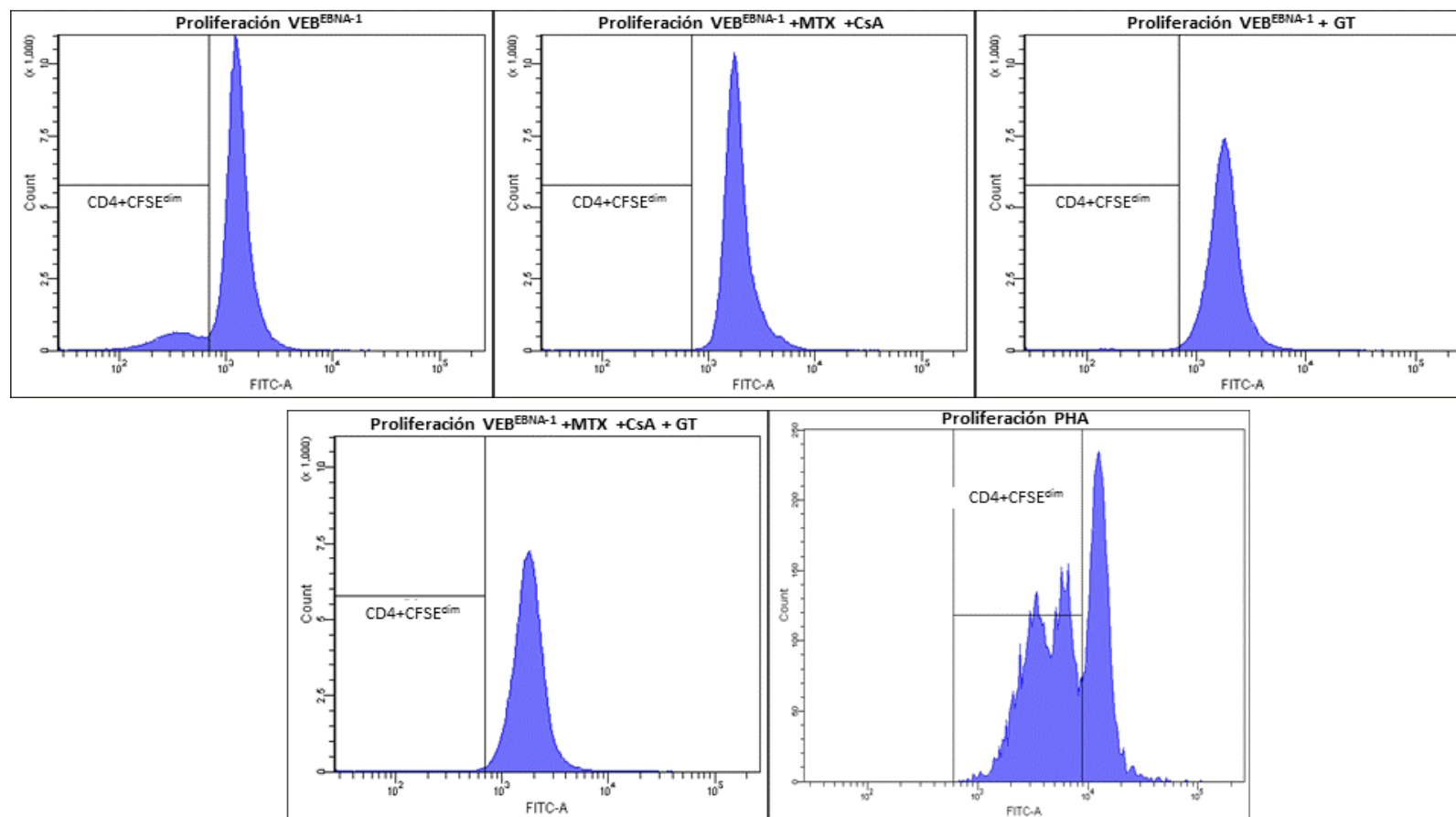


Figura 12. Resultados obtenidos con CFSE para evaluar la proliferación de LT CD8+ tras el estímulo con VEB^{EBNA-1} después de 8 días de cultivo en las condiciones experimentales estudiadas.

En resumen, los resultados obtenidos en este ensayo confirmaron que la GT bien sola o combinada con los fármacos CsA y MTX suprime la proliferación *in vitro* de los LT tras haber sido estos estimulados con los antígenos CMV^{pp65} o VEB^{EBNA-1}. Sin embargo, la exposición única de las células a CsA y MTX no afectó al valor medio de LT que proliferaban tras ser estimulados con los antígenos virales.

1.5. GT induce muerte celular de CMN dependiente de la dosis

Tras exponer CMN a diferentes dosis de GT durante 4 días, se observa una reducción de la población de CMN viables dependiente de dosis. Concretamente, el porcentaje de células que entran en apoptosis tardía, definidas como Anexina+IP+, aumenta al incrementar la dosis de GT ($p < 0,001$), Figura 13. Empleando la dosis de 200ng/mL, el porcentaje de células que han entrado en apoptosis representa un $11,94 \pm 3,59\%$ del total mientras que en contacto con 1000ng/mL de GT este porcentaje se incrementa hasta un $60,12 \pm 19,73\%$ ($p < 0,001$). La dosis testada en los apartados previos, 400ng/mL muestra un porcentaje de apoptosis a 4 días de $25,34 \pm 12,66\%$.

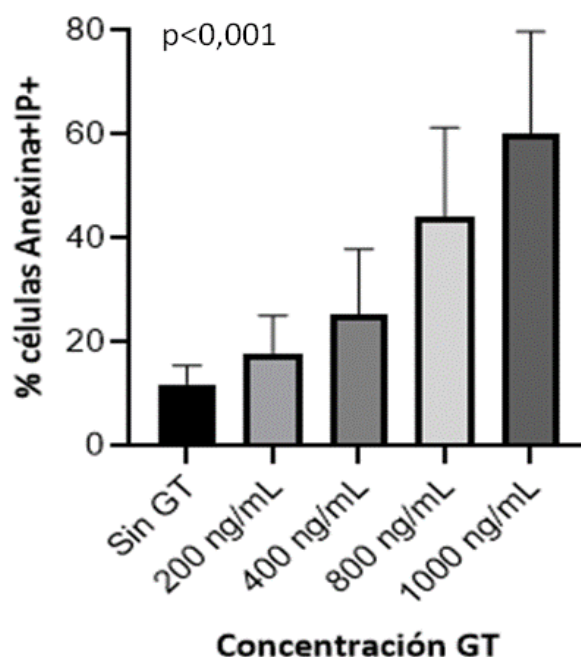


Figura 13. Porcentajes de células apoptóticas tardías obtenidos a los 4 días de cultivo sometidas a concentraciones crecientes de GT.

Cuando las CMN fueron incubadas durante 8 días de cultivo, los resultados muestran como incluso a la menor dosis testada, 200ng/mL, el porcentaje de células necróticas (Anexina-IP+) representa un $42,52 \pm 13,74\%$. Este porcentaje aumenta a dosis crecientes de GT, alcanzando valores de $75,72 \pm 9,34\%$ a 1000ng/mL. La dosis experimental de 400ng/mL conlleva un porcentaje de necrosis celular de $45,58 \pm 19,59\%$. Por tanto, la viabilidad de CMN disminuye cuando se exponen a concentraciones crecientes de GT ($p < 0,001$).

1.6. GT en combinación con farmacología profiláctica anti-EICR suprime la vía de señalización NF-κB

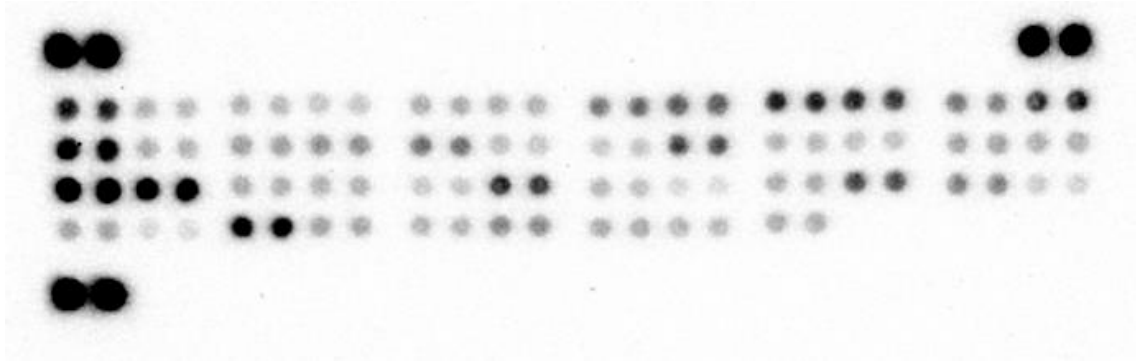
Con el objetivo de evaluar la implicación de la vía de señalización NF-κB en las condiciones experimentales testadas, se analizaron los resultados de densitometría obtenidos para todas las matrices de proteínas empleadas tanto para la subpoblación purificada de LT como de células NK.

La presencia de la proteína fúngica GT durante 4 días de incubación sobre la subpoblación de LT redujo significativamente los niveles de 6 proteínas que participan en la vía de señalización NF-κB respecto a los valores obtenidos de los LT sin tratamiento farmacológico. Específicamente, GT suprime en la subpoblación de LT la expresión de las siguientes proteínas: BCL-10, IκBα, IκBε, IL-1R1, Metadherin/AEG-1 y STING/TMEM173.

Sin embargo, tras exponer la subpoblación de LT a la combinación de profilaxis anti-EICR y GT se regulan negativamente los niveles de 26 proteínas incluidas en la ruta de señalización NF-κB. En la Tabla 10 se resumen los valores medios obtenidos para estas proteínas. Los resultados obtenidos se representan en las Figuras 14 y 15.

En el análisis de los resultados obtenidos tras la selección de células NK, no se encontraron diferencias en los niveles de las proteínas estudiadas en presencia de CsA y MTX y / o GT.

A



B

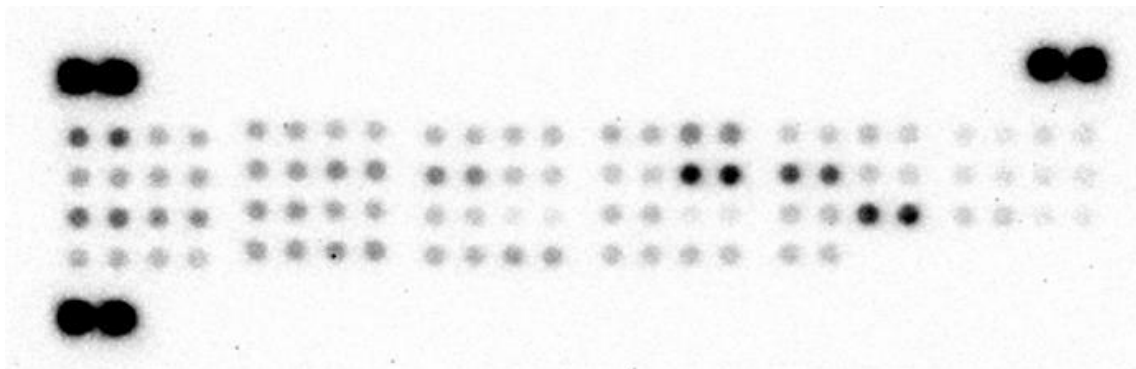


Figura 14. Resultados obtenidos en el “Proteome Profiler Array” después de 4 días de cultivo de LT en las siguientes condiciones experimentales. A) Basal, sin tratamiento, B) CsA, MTX y GT.

Tabla 10. Principales proteínas de la vía de señalización NF- κ B cuya expresión se ve regulada negativamente tras la incubación con las condiciones experimentales testadas. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

Coordenadas	Proteína	Basal	CsA + MTX	GT	CsA+ MTX+ GT	p-valor	Fold change
B1, B2	ASC	18,27 \pm 0,26	18,05 \pm 0,29	17,86 \pm 0,31	17,35 \pm 0,25	0,012	0,529
B9, B10	ciAP1/BIRC2	16,70 \pm 0,35	16,28 \pm 0,40	16,13 \pm 0,27	15,69 \pm 0,31	0,020	0,498
B13, B14	FADD/MORT1	17,26 \pm 0,63	16,87 \pm 0,13	16,27 \pm 0,26	15,91 \pm 0,24	0,026	0,392
B17, B18	I κ B α	17,89 \pm 0,90	16,78 \pm 0,79	15,74 \pm 0,48	15,59 \pm 0,55	0,019	0,203
B19, B20	I κ B ϵ	17,56 \pm 1,12	16,96 \pm 0,52	15,62 \pm 0,34	15,66 \pm 0,27	0,045	0,267
C3, C4	IL-1 RI	16,52 \pm 0,21	16,21 \pm 0,44	16,08 \pm 0,18	15,90 \pm 0,13	0,011	0,648
C5, C6	IL-17 RA	16,88 \pm 0,36	16,62 \pm 0,31	16,61 \pm 0,32	16,11 \pm 0,03	0,022	0,587
C7, C8	IL-18 R1	17,09 \pm 0,20	16,96 \pm 0,23	17,14 \pm 0,31	16,54 \pm 0,12	0,015	0,682
C9, C10	IRAK1	17,60 \pm 0,27	17,22 \pm 0,21	17,20 \pm 0,28	16,71 \pm 0,25	0,014	0,540
C11, C12	IRF5	16,29 \pm 0,30	15,95 \pm 0,21	15,70 \pm 0,41	15,38 \pm 0,10	0,007	0,531
C13, C14	IRF8	15,95 \pm 0,35	15,61 \pm 0,37	15,32 \pm 0,30	15,24 \pm 0,13	0,030	0,610
C21, C22	Metadherin/AEG-1	16,99 \pm 0,26	16,54 \pm 0,41	15,91 \pm 0,41	15,17 \pm 0,94	0,032	0,283
C23, C24	MYD88	16,36 \pm 0,59	16,26 \pm 0,47	15,89 \pm 0,39	14,75 \pm 0,71	0,040	0,330
D1, D2	NF κ B1	18,82 \pm 1,30	18,81 \pm 0,99	16,78 \pm 0,21	16,44 \pm 0,46	0,041	0,193
D7, D8	p53	16,71 \pm 0,27	16,35 \pm 0,38	16,23 \pm 0,15	15,81 \pm 0,03	0,004	0,535
D9, D10	p53 (pS46)	16,26 \pm 0,29	15,74 \pm 0,56	15,59 \pm 0,38	15,27 \pm 0,19	0,008	0,504
D11, D12	RelA/p65	17,31 \pm 1,57	16,38 \pm 0,61	14,77 \pm 0,70	13,93 \pm 0,24	0,021	0,096
D13, D14	RelA/p65 (pS529)	16,53 \pm 0,50	15,82 \pm 0,31	15,53 \pm 0,39	15,33 \pm 0,52	0,045	0,437
D21, D22	STAT1p91	17,02 \pm 0,62	16,53 \pm 0,65	15,97 \pm 0,29	15,46 \pm 0,55	0,031	0,338
D23, D24	STAT1 (pY701)	15,89 \pm 0,37	15,71 \pm 0,58	15,51 \pm 0,43	14,31 \pm 0,91	0,050	0,334
E1, E2	STAT2	16,68 \pm 0,40	16,32 \pm 0,34	15,88 \pm 0,48	15,44 \pm 0,24	0,010	0,425
E3, E4	STAT2 (pY689)	15,92 \pm 0,43	15,23 \pm 0,90	15,11 \pm 0,99	15,07 \pm 0,28	0,047	0,556
E5, E6	STING/TMEM173	18,69 \pm 0,23	18,40 \pm 0,33	16,71 \pm 0,47	16,29 \pm 0,36	0,001	0,189
E7, E8	TLR2	16,83 \pm 0,34	16,43 \pm 0,24	16,54 \pm 0,38	15,95 \pm 0,29	0,028	0,545
E9, E10	TNF RI/TNFRSF1A	16,50 \pm 0,36	16,14 \pm 0,29	16,09 \pm 0,42	15,64 \pm 0,09	0,016	0,549
E11, E12	TNF RII/TNFRSF1B	17,29 \pm 0,39	16,84 \pm 0,08	16,53 \pm 0,31	15,96 \pm 0,20	0,006	0,400

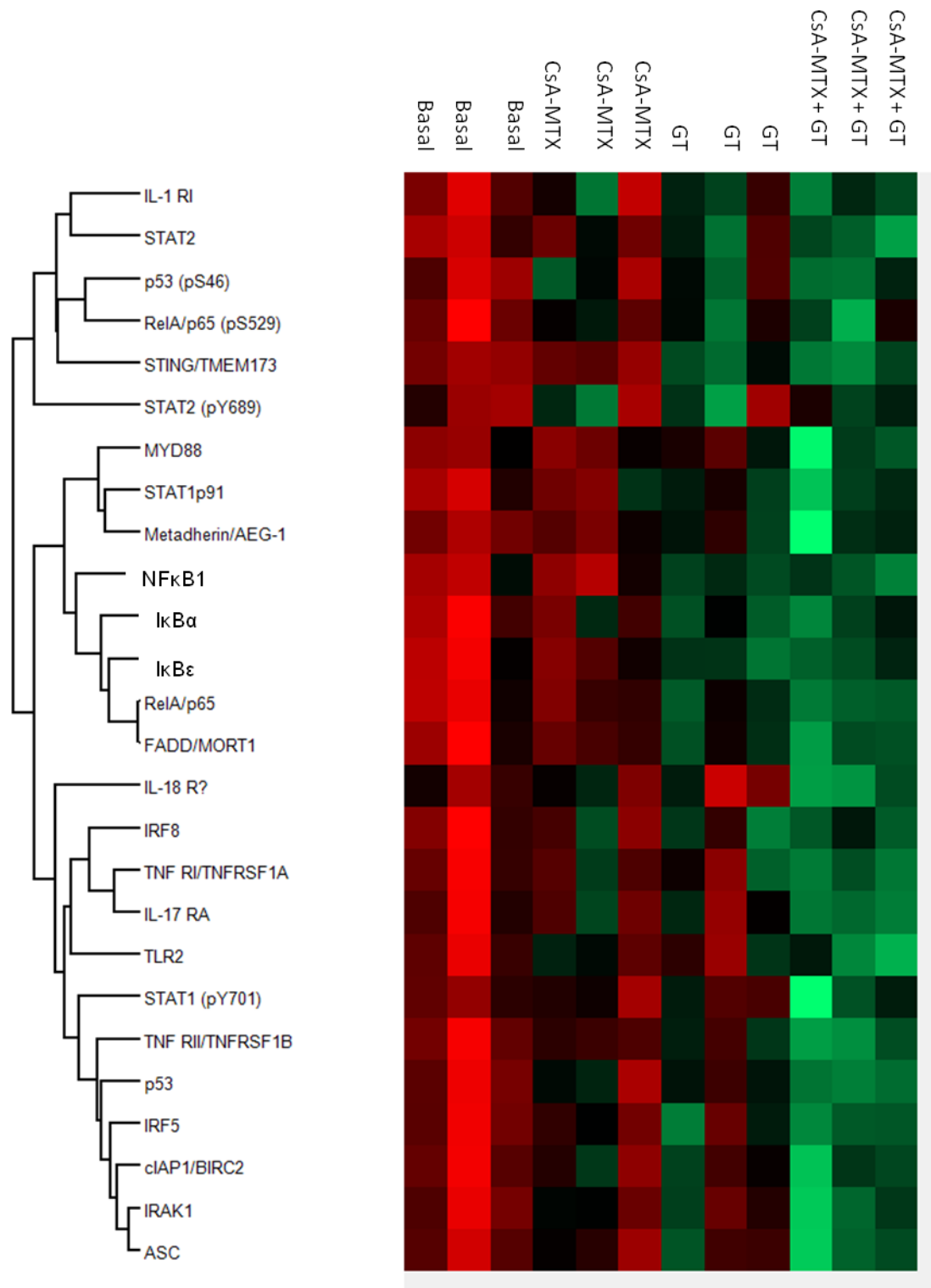


Figura 15. Dendrograma que representa el cambio de expresión proteica encontrado en los LT de tres donantes sanos tras ser sometido a las diferentes condiciones de estudio. Las proteínas reguladas negativamente se indican en verde y positivamente en rojo.

2. Bloque II

2.1. Población de estudio

En este bloque se incluyeron cincuenta pacientes adultos que fueron sometidos a un primer alo-TPH durante el período de estudio. Todos los pacientes reclutados recibieron PH procedentes de SP de su donante seleccionado. Quince pacientes fueron excluidos del análisis como consecuencia de un seguimiento incompleto durante el periodo post-trasplante. Dicho suceso fue debido a que: el paciente abandonó voluntariamente el estudio, fue sometido a un segundo trasplante por fallo de injerto, sufrió una recaída de la enfermedad o su evolución clínica derivó en un “*exitus*” previo al día +180 después del trasplante.

Por tanto, 35 sujetos fueron incluidos en el análisis final de este segundo bloque de estudio. En estos pacientes, se analizó exhaustivamente la reconstitución inmunológica de las subpoblaciones de células NK, mDC, LT CD4+ y CD8+. Además se cuantificó de manera conjunta la funcionalidad de los LT CD4+ y CD8+ específicos de CMV^{pp65}, VEB^{EBNA-1} y Adv^{Hexon}. Dicho análisis fue realizado antes de la propia infusión y en los días +30, +90 y +150 posteriores al alo-TPH. Las principales características clínicas de los pacientes incluidos en este bloque son mostradas en la Tabla 11.

2.2. Complicaciones infecciosas víricas y fúngicas después del alo-TPH: incidencia y factores de riesgo clínicos asociados.

Veinte pacientes, un 57,1% del total (n=35), sufrieron al menos un episodio de infección primaria o reactivación causada por virus (CMV, VEB, Adv, BK virus, Gripe A y VRS) durante los primeros 180 días después del alo-TPH. La infección viral más predominante en la cohorte analizada fue causada por el CMV, documentada en 17 de los 35 pacientes (48,6%) analizados. De éstos, nueve pacientes presentaron recurrencia de la infección por CMV. Esta fue definida por la aparición de más de un episodio vírico. Estos nueve pacientes presentaron una mediana de recurrencia de 2 episodios (rango, 2 a 5): 7 sufrieron dos episodios y 2 presentaron entre tres y cinco episodios de infección por CMV dentro de los 180 días posteriores al alo-TPH.

Durante el análisis global de los 17 pacientes que sufrieron infección por CMV, se observó que la mediana de aparición de los primeros episodios de la infección era el día +24 (rango, -5 a +173) después del trasplante. Sin embargo, cuando se compararon las

medias de aparición de la infección de los pacientes que sufrieron un único episodio vírico [+35 días (+24 a +173)], se observó que pacientes que sufrían más de un episodio de infección por CMV presentaban precozmente [+20 días (-5 a +32)] niveles detectables de ADN vírico en SP, $p=0,001$. Tres pacientes (8,6%) fueron diagnosticados de enfermedad por CMV, dos de los cuales tras episodios recurrentes por este virus.

Diversos autores han descrito que el estado serológico frente a CMV del donante y del receptor antes del alo-TPH constituye un factor de riesgo clínico importante relacionado con la infección por CMV después del trasplante (187). En nuestra cohorte y en línea con lo comentado, 8/9 (88,9%) pacientes con serología D-/R+ experimentaron reactivación del CMV, OR: 15,11; IC 95%: 1,62-140,58; $p=0,007$.

Por otro lado, 23/35 (65,7%) pacientes recibieron Cy-PT como profilaxis de EICR. Este grupo mostró además una incidencia mayor de infección por CMV que los pacientes que recibieron otros regímenes profilácticos frente a EICR (88,2% vs 11,8%, respectivamente; OR: 9,38; IC 95%: 1,64-53,62; $p=0,012$). Sin embargo, en nuestra cohorte y al contrario de los datos publicados por otros autores, el desarrollo de EICR aguda y/o crónica no tuvo un efecto sobre el riesgo de infección vírica por CMV (188). Ello fue debido previsiblemente al tamaño muestral de nuestro estudio (ver Tabla 11).

Respecto al resto de infecciones virales, en nuestra cohorte se detectaron únicamente 2 pacientes que mostraron valores superiores a 500 copias/mL de ADN de VEB. Sin embargo, ninguno de ellos sufrió enfermedad asociada al virus o PTLT. Estos pacientes se correspondieron con los que presentaron un mayor número de episodios de infección por CMV en el periodo post-TPH, concretamente 3 y 5 episodios.

Paralelamente, un paciente de nuestra cohorte experimentó enterocolitis relacionada con una infección por AdV, tres sufrieron cistitis hemorrágica como consecuencia de infección por virus BK y otros dos receptores experimentaron infecciones respiratorias relacionadas con el virus de la Gripe A y el VRS. Sin embargo, las variables clínicas (edad, sexo, tipo de donante, patología hematológica de base, régimen de acondicionamiento, uso de ATG, y EICR aguda y/o crónica) no se asociaron con ninguna de estas infecciones víricas. En la Tabla 11 se muestran las características clínicas de todos los pacientes incluidos en el estudio y su relación con las infecciones víricas más predominantes (CMV, VEB y virus BK).

Tabla 11. Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio e infecciones víricas.

Parámetro	Pacientes (n=35)	No CMV (n=18)	Infección CMV (n=17)	p-valor	No VEB (n=33)	Infección VEB (n=2)	p-valor	No BK (n=32)	Infección BK (n=3)	p-valor
Edad, mediana (rango), años	52 (20-71)	50 (21-71)	48 (22-67)	0,590	52 (21-71)	41,5 (20-63)	0,421	52 (20-71)	48 (33-53)	0,411
Ratio sexo (hombre/mujer)	20/15	7/11	13/4	0,041	19/14	1/1	1	18/14	2/1	0,565
Enfermedad, nº de pacientes (%)										
LAM	10 (28,6)	6 (33,3)	4 (23,5)	0,711	10 (30,3)	0 (0,0)	1	8 (25,0)	2 (66,7)	0,190
LNH	7 (20,0)	2 (11,1)	5 (29,4)	0,228	6 (18,2)	1 (50,0)	0,365	6 (18,7)	1 (33,3)	0,499
SMD	5 (14,3)	3 (16,6)	2 (11,8)	1	5 (15,2)	0 (0,0)	1	5 (15,6)	0 (0,0)	1
LAL	4 (11,4)	2 (11,1)	2 (11,8)	1	3 (9,1)	1 (50,0)	0,218	4 (12,5)	0 (0,0)	1
Neoplasia mieloproliferativa	4 (11,4)	3 (16,6)	1 (5,9)	0,603	4 (12,1)	0 (0,0)	1	4 (12,5)	0 (0,0)	1
LH	2 (5,7)	0 (0,0)	2 (11,8)	0,229	2 (6,1)	0 (0,0)	1	2 (6,3)	0 (0,0)	1
Leucemia bifenotípica	2 (5,7)	1 (5,6)	1 (5,9)	1	2 (6,1)	0 (0,0)	1	2 (6,3)	0 (0,0)	1
LLC	1 (2,9)	1 (5,6)	0 (0,0)	1	1 (3,0)	0 (0,0)	1	1 (3,1)	0 (0,0)	1
Tipo de donante, nº (%)										
Hermano HLA-idéntico	15 (42,9)	8 (44,4)	7 (41,1)	1	15 (45,5)	0 (0,0)	0,496	14 (43,7)	1 (33,3)	1
Haploidéntico	15 (42,9)	7 (38,8)	8 (47,1)	0,738	14 (42,4)	1 (50,0)	1	14 (43,7)	1 (33,3)	1
DNE	5 (14,2)	3 (16,8)	2 (11,8)	1	4 (12,1)	1 (50,0)	0,269	4 (12,6)	1 (33,3)	0,380
Régimen de acondicionamiento, nº (%)										
Mieloablativo	18 (51,4)	9 (50,0)	8 (47,1)	1	16 (48,5)	2 (100,0)	0,486	16 (50,0)	2 (66,7)	0,603
De intensidad reducida	17 (48,6)	9 (50,0)	9 (52,9)		17 (51,5)	0 (0,0)		16 (50,0)	1 (33,3)	
Depleción de células T: ATG, nº (%)	3 (8,6)	2 (11,1)	1 (5,9)	1	2 (6,1)	1 (50,0)	0,313	3 (9,4)	0 (0,0)	1
Serología CMV, nº (%)					NA	NA		NA	NA	
D+/R+	18 (51,4)	10 (55,6)	8 (47,1)	0,740						
D-/R+	9 (25,7)	1 (5,6)	8 (47,1)	0,007						
D+/R-	5 (14,3)	4 (22,2)	1 (5,9)	0,338						
D-/R-	3 (8,6)	3 (16,6)	0 (0,0)	0,229						
Profilaxis EICR, nº (%)										
CsA + MMF + Cy-PT	23 (65,7)	8 (44,4)	15 (82,3)	0,012	22 (66,7)	1 (50,0)	1	21 (65,6)	2 (66,7)	1
Tac + MTX	8 (22,8)	6 (33,3)	2 (11,8)	0,041	8 (24,2)	0 (0,0)	1	8 (25,0)	0 (0,0)	1
Tac + MTX + ATG	3 (8,6)	2 (11,1)	1 (5,9)	1	2 (6,1)	1 (50,0)	0,166	3 (9,4)	0 (0,0)	1
CsA + MMF	1 (2,9)	1 (5,6)	0 (0,0)	1	1 (3,0)	0 (0,0)	1	0 (0,0)	1 (33,3)	0,086
EICR aguda, nº (%)										
No	10 (28,6)	5 (27,8)	5 (29,4)	1	10 (30,3)	0 (0,0)	1	10 (31,3)	0 (0,0)	1
Grado II/IV	11 (34,4)	5 (27,8)	6 (35,3)	0,725	11 (33,3)	0 (0,0)	1	8 (25,0)	3 (100,0)	0,025
Grado III/IV	2 (5,7)	1 (5,6)	1 (5,9)	1	1 (3,0)	1 (50,0)	1	2 (6,3)	0 (0,0)	1
Esteroides, nº (%)	9 (25,7)	5 (27,8)	4 (23,5)	1	9 (27,3)	0 (0,0)	1	8 (25,0)	1 (33,3)	1
EICR crónica, nº (%)										
No	27 (77,1)	14 (77,8)	13 (76,5)	1	26 (78,8)	1 (50,0)	0,410	24 (75,0)	3 (100,0)	1
Limitada	6 (17,1)	3 (16,6)	3 (17,6)	1	5 (15,2)	1 (50,0)	0,318	6 (18,7)	0 (0,0)	1
Extensa	2 (5,8)	1 (5,6)	1 (5,9)	1	2 (6,0)	0 (0,0)	1	2 (6,3)	0 (0,0)	1

Las infecciones fúngicas fueron escasas en nuestra cohorte, sólo un paciente sufrió AI en el día +39 (incidencia: 2,9%), clasificada como probable según las definiciones proporcionadas por EORTC/MSG (130). En este paciente, se detectó la presencia del hongo AF en muestras de origen respiratorio, concretamente en el lavado broncoalveolar (BAL) con un resultado positivo de 3,1 en la prueba de GM ($\geq 0,5$). Sin embargo, la determinación de GM en el suero de este paciente arrojó resultados negativos para todos los días monitorizados. El resto de muestras analizadas obtenidas del resto de pacientes fueron negativas para la determinación de GM.

2.3. Interdependencia de las subpoblaciones inmunológicas después del alo-TPH.

En primer lugar, se analizó la cinética de reconstitución inmunológica de las diferentes subpoblaciones (células NK, mDC y LT CD4+ y CD8+) entre el momento previo al inicio del régimen de acondicionamiento (pre-TPH) y el día +150 después de la infusión de los PH (Figura 16).

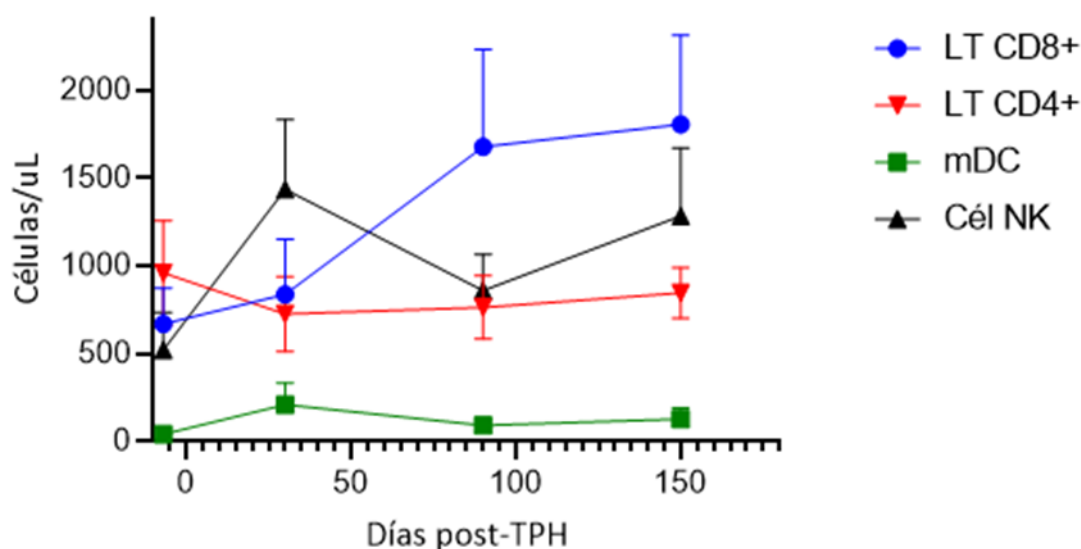
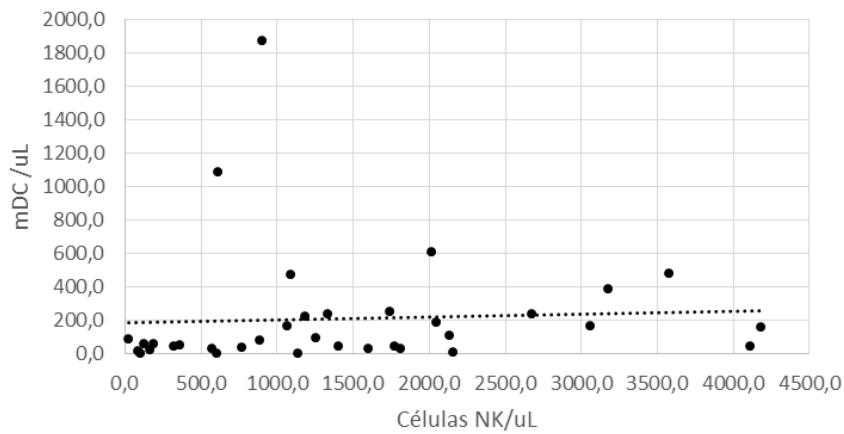


Figura 16. Cinética de reconstitución inmunológica de las diferentes subpoblaciones entre el momento previo al inicio del régimen de acondicionamiento (pre-TPH) y el día +150 después de la infusión de los PH.

A continuación, se evaluó la inter-relación existente entre estas distintas subpoblaciones analizadas. Como se muestra en la Figura 17, las concentraciones encontradas para la subpoblación de mDC se correlacionaron positivamente con las halladas para la población NK en los días +30, +90 y +150 después de alo-TPH ($p=0,040$, $<0,001$ y

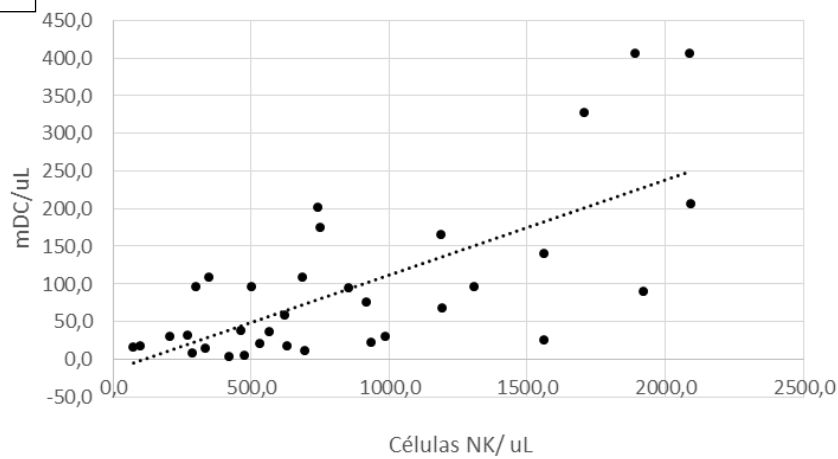
<0,001, respectivamente). Además, se obtuvo también una correlación positiva entre los valores obtenidos de LT CD4+ con respecto al de mDC ($p=0,044$) y células NK ($p=0,030$) a día +150 después del trasplante. Sin embargo, esta correlación no se observó entre las concentraciones encontradas de LT CD8+ y el resto de subpoblaciones inmunológicas analizadas, sugiriendo que durante el periodo post-TPH esta subpoblación posee una cinética de reconstitución independiente del resto de subpoblaciones estudiadas.

A



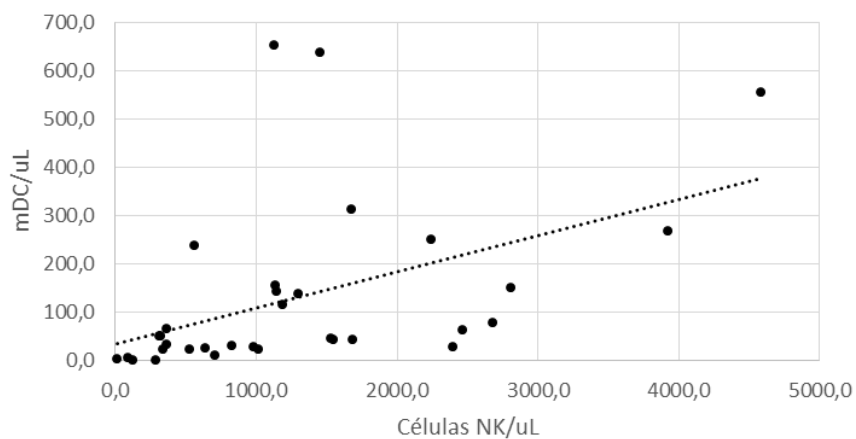
$p=0,040$
 $R=0,05$

B



$p<0,001$
 $R=0,70$

C



$p=0,006$
 $R=0,47$

Figura 17. Correlación entre los valores obtenidos de células NK y mDC en los días +30 (A), +90 (B) y +150 (C) post-TPH. Como muestra la línea de tendencia en cada uno de los gráficos presentados (A, B, C) se observó una correlación positiva entre las células NK y las mDC.

2.4. La reconstitución inmunológica después del alo-TPH tiene un impacto significativo en el control de las complicaciones víricas.

Una vez que fue calculada la concentración de cada subpoblación celular objeto de estudio, se correlacionó la mediana de cada subpoblación con el desarrollo de las infecciones víricas más predominantes (CMV, VEB y virus BK) en nuestra cohorte (Tabla 12).

En relación a los 17/35 (48,6%) pacientes que sufrieron infecciones por CMV después del alo-TPH, la concentración de las subpoblaciones celulares analizadas fue inferior respecto a los que no sufrieron ningún episodio de infección. Más concretamente, la presencia patológica del virus se asoció con un retraso en el proceso de recuperación de las mDC y células NK (tanto CD56^{dim} como CD56^{bright}) ($p=0,021$ y $p=0,014$, respectivamente). Por el contrario, dichos pacientes mostraron una concentración de LT CD8+ significativamente superior en comparación con los que no sufrieron episodios de infección por CMV ($p=0,028$).

En relación a los 2/35 (5,7%) pacientes que sufrieron infecciones por VEB después del alo-TPH y, en línea con los hallazgos anteriores, el valor medio encontrado de células NK, específicamente de la subpoblación CD56^{dim}, fue significativamente inferior en los pacientes que sufrieron reactivaciones por este virus ($p<0,001$).

Por último, los 3/35 (8,6%) pacientes que sufrieron episodios de cistitis relacionada con infección por virus-BK mostraron una concentración de NK CD56^{bright} inferior a aquellos que no sufrieron esta infección viral ($p=0,017$).

A diferencia de los datos obtenidos en el grupo de pacientes que sufrieron infección por CMV durante el periodo post-TPH, no se observó ninguna relación entre el hecho de sufrir infección por VEB o BK y presentar un recuento anómalo de mDC y LT. Sin embargo, estos datos podrían haber sido condicionados por la potencia estadística del estudio ya que sólo 2 pacientes con infección por VEB y 3 pacientes con infección por BK habían sido detectados en nuestra cohorte.

Tabla 12. Análisis de la reconstitución inmunológica de todos los pacientes incluidos estratificados en función de las infecciones víricas post-TPH. Los resultados se expresan como mediana y rango.

Subpoblación celular	Infección CMV			Infección VEB			Infección virus BK		
	No (n=18)	Si (n=17)	p-valor	No (n=33)	Si (n=2)	p-valor	No (n=32)	Si (n=3)	p-valor
Leucocitos (10 ³ /μL)	4,10 (0,50-13,30)	3,40 (0,10-13,90)	0,277	3,70 (0,10-13,90)	2,65 (1,50-5,60)	0,159	3,70 (0,10-13,90)	3,25 (0,70-13,90)	0,456
Linfocitos (10 ³ /μL)	0,75 (0,00-3,50)	0,70 (0,00-5,50)	0,898	0,70 (0,50-5,50)	0,70 (0,30-1,60)	0,761	0,80 (0,00-5,50)	0,25 (0,10-1,80)	0,177
LT CD4+ (cél/μL)	816,14 (8,42-3344,19)	568,24 (11,56-2701,44)	0,176	669,80 (8,42-3344,19)	379,09 (131,12-2701,44)	0,231	706,93 (8,42-3344,19)	622,26 (67,34-2169,37)	0,693
CD4+IL-2+	2,39 (0,00-49,57)	0,42 (0,00-12,95)	<0,001	1,12 (0,00-49,57)	0,49 (0,00-1,73)	0,212	1,12 (0,00-49,57)	0,95 (0,00-6,97)	0,478
CD4+IFN-γ+	2,37 (0,00-99,98)	0,20 (0,00-23,18)	<0,001	1,36 (0,00-99,98)	0,14 (0,00-1,73)	0,035	1,13 (0,00-99,98)	2,82 (0,00-19,72)	0,480
CD4+CD40L+	9,43 (0,00-161,91)	1,29 (0,00-103,96)	<0,001	3,93 (0,00-161,91)	1,02 (0,51-15,80)	0,138	3,89 (0,00-161,91)	4,09 (0,00-103,96)	0,947
CD4+CD107a +	22,63 (0,00-473,31)	2,74 (0,00-62,29)	<0,001	12,65 (0,00-473,31)	3,42 (0,31-14,74)	0,136	12,65 (0,00-473,31)	3,83 (1,11-59,39)	0,688
LT CD8+ (cél/μL)	770,55 (1,72-4462,80)	1117,99(7,26-7278,22)	0,028	885,38 (1,73-7278,22)	870,37 (218,97-1862,84)	0,886	897,53 (1,72-7278,22)	382,56 (11,65-5721,66)	0,171
CD8+IL-2+	6,40 (0,00-200,79)	0,66(0,00-18,56)	<0,001	2,82 (0,00-200,79)	1,27 (0,09-6,22)	0,331	2,89 (0,00-200,79)	1,64 (0,00-18,56)	0,184
CD8+IFN-γ+	4,10 (0,00-92,85)	0,39(0,00-117,60)	<0,001	1,98 (0,00-117,61)	0,25 (0,00-1,92)	0,063	1,71 (0,00-117,61)	0,75 (0,00-46,39)	0,329
CD8+CD40L+	13,71 (0,00-251,67)	2,45(0,00-352,86)	<0,001	6,14 (0,00-352,86)	2,01 (0,67-5,63)	0,054	6,14 (0,00-352,86)	3,08 (0,00-51,03)	0,048
CD8+CD107a +	39,03 (0,00-1194,26)	1,27(0,00-117,11)	<0,001	13,02 (0,00-1194,26)	1,27 (0,74-3,95)	0,087	10,92 (0,00-1194,26)	5,23 (0,75-72,85)	0,434
Cociente CD4+/CD8+	1,19 (0,14-14,80)	0,63 (0,14-8,37)	0,002	0,93 (0,14-14,81)	0,58 (0,23-1,45)	0,487	0,93 (0,14-14,81)	1,50 (0,26-8,37)	0,264
mDC (cél/μL)	44,91 (0,71-1872,75)	28,64 (0,00-479,63)	0,021	42,86 (0,00-1872,75)	16,39 (2,15-92,66)	0,220	44,84 (0,00-1872,75)	17,71 (1,08-267,63)	0,315
Células NK	1026,90(87,50-4583,70)	566,50 (18,39-3920,49)	0,014	765,06 (0,00-4583,70)	100,16 (18,39-361,22)	<0,001	752,84 (18,39-4583,70)	923,86 (109,26-3920,50)	0,857
NK CD56 ^{dim} (cél/μL)	792,5 (177,67-4120,93)	494,64 (10,22-3431,68)	0,017	620,52 (10,22-4120,93)	88,80 (13,91-140,67)	<0,001	593,90 (10,22-4120,93)	863,12 (109,22-1813,30)	0,940
NK CD56 ^{bright} (cél/μL)	77,74 (0,00-2356,49)	26,34 (0-296,62)	0,010	48,30 (0,00-2959,62)	13,60 (2,34-220,55)	0,106	55,89 (0,00-2959,62)	4,16 (0,00-2959,62)	0,017
KIR2DS4 (%)	0,24 (0,00-22,94)	0,81 (0,00-51,23)	0,038	0,51 (0,00-51,23)	0,12 (0,05-0,65)	0,262	0,53 (0,00-51,23)	0,39 (0,04-51,23)	0,884
KIR3DL1 (%)	1,79 (0,00-14,34)	2,99(0,00-20,82)	0,064	2,60 (0,00-20,82)	0,59 (0,23-12,07)	0,176	2,09 (0,00-20,82)	8,36 (0,62-17,09)	0,001

Como conclusión a los datos previamente presentados, la infección por CMV fue la única a diferencia de VEB y BK que alteró la concentración de células NK, LT y mDC durante el periodo post-TPH. Por ello se analizaron cada una de estas subpoblaciones (NK, apartado 4.1; LT y mDC, apartados 4.2 y 4.3) en el sub-grupo de pacientes que sufrieron infección por CMV (n=17) y para cada uno de los días de monitorización fijados en el cronograma.

2.4.1. *La reconstitución de las células NK es dependiente de la aparición de episodios de recurrencia de CMV post-trasplante*

En primer lugar, para estudiar la reconstitución de las subpoblaciones de células NK después del trasplante, se analizaron tanto las células CD56^{dim} como CD56^{bright}. Los datos mostrados en la Tabla 13 indican que, los pacientes que sufrieron infección por CMV experimentaron en el momento pre-TPH una concentración de células NK CD56^{bright} menor a lo registrado en el resto de pacientes que no sufrieron esta infección después del trasplante (p=0,015). Sin embargo, en los puntos monitorizados después de la infusión de los PH (+30, +90 y +150 días) no se observaron diferencias en ninguna de las subpoblaciones de células NK entre ambos grupos de estudio, tal y como se indica en la Tabla 13.

Tabla 13. Subpoblaciones inmunológicas de células NK antes de la infusión (Pre) y durante los primeros 150 días después del alo-TPH en función de las infecciones por CMV. Los resultados se expresan como mediana y rango.

Subpoblación celular (cél/ μ L)	Días post-TPH	No CMV n=18	Infección CMV n=17	p-valor
Células NK totales	Pre	421,36 (109,26-2718,27)	230,82 (34,80-836,98)	0,048
	+30	1294,89 (87,50-4182,49)	1297,52 (23,69-3580,11)	0,525
	+90	962,35 (206,68-2092,13)	660,07 (72,73-1924,20)	0,205
	+150	1379,49 (123,79-4583,70)	907,30 (91,81-3920,49)	0,102
NK CD56^{dim}	Pre	325,98 (105,40-1584,04)	222,23 (27,62-836,98)	0,100
	+30	1243,30 (77,67-3386,80)	1040,60 (10,22-3431,68)	0,636
	+90	809,10 (189,49-1867,03)	578,20 (70,39-1335,49)	0,231
	+150	1170,02 (114,18-4120,93)	685,47 (88,80-2390,27)	0,068
NK CD56^{bright}	Pre	38,95 (0,04-1355,11)	11,72 (0,00-46,71)	0,015
	+30	336,92 (0,00-2356,50)	150,64 (0,00-981,90)	0,232
	+90	94,34 (12,36-738,21)	89,41 (0,00-640,49)	0,518
	+150	77,64 (8,68-506,56)	31,73 (3,00-2959,62)	0,146

A continuación, los 17 pacientes que sufrieron infección por CMV tras el trasplante fueron estratificados en función de la frecuencia de episodios de CMV. Tras realizar el

análisis de la reconstitución de células NK, se observó una menor concentración de células NK (total, CD56^{dim} y CD56^{bright}) en aquellos sujetos que experimentaban recurrencia de CMV, en relación con aquellos que únicamente sufrían un episodio infeccioso (Tabla 14). De forma más específica se observó que en el día +30, los pacientes que sufrieron varios episodios de CMV mostraron una concentración de células NK CD56^{bright} inferior respecto a los que solo sufrieron un único episodio vírico ($p=0,036$). Este hallazgo se amplió a la subpoblación de células NK CD56^{dim} y por consiguiente a la población total NK en los días +90 y +150 después del alo-TPH, tal y como se muestra en la Tabla 14.

Tabla 14. Subpoblaciones inmunológicas de células NK antes de la infusión (Pre) y durante los primeros 150 días después del alo-TPH en función de la frecuencia de episodios de CMV. Los resultados se expresan como mediana y rango.

Subpoblaciones celulares (cél/ μ L)	Días post-TPH	Un episodio CMV n=8	>1 episodio CMV n=9	p-valor
Células NK totales	Pre	182,94 (34,80-836,98)	283,36 (21,89-698,08)	0,606
	+30	1297,52 (105,23-3580,11)	773,13 (23,69-3062,65)	0,606
	+90	809,58 (503,68-1924,17)	420,41 (72,73-852,93)	0,015
	+150	1149,17 (530,95-3920,49)	341,40 (18,39-2397,15)	0,008
NK CD56^{dim}	Pre	175,85 (27,62-836,98)	271,88 (21,10-676,65)	0,606
	+30	665,45 (58,64-3431,68)	730,85 (10,22-2781,25)	0,888
	+90	661,11 (392,09-1335,49)	420,41 (45,96-757,67)	0,046
	+150	960,43 (476,82-2370,02)	333,75 (13,92-2390,27)	0,023
NK CD56^{bright}	Pre	5,07 (0,00-16,59)	12,23 (0,63-46,71)	0,423
	+30	202,21 (48,29-981,90)	24,68 (0,00-367,04)	0,036
	+90	159,25 (76,44-640,49)	20,34 (0,00-92,79)	<0,001
	+150	141,67 (25,88-2959,52)	6,88 (0,04-37,58)	<0,001

Teniendo en cuenta que las células NK actúan como principales mediadoras de la inmunidad contra las infecciones virales y que uno de los mecanismos moleculares más importantes que utilizan para ello son la expresión en su membrana de receptores inhibidores o activadores, evaluamos en dichas células la expresión de los receptores KIR, “*Killer cell immunoglobulin like receptors*”. Concretamente el receptor inhibidor KIR3DL1 y el receptor activador KIR2DS4. En nuestra cohorte, los pacientes que sufrieron recurrencia del CMV tuvieron una mayor expresión del receptor KIR2DS4 antes del trasplante y en los días +30, +90 y +150 después del alo-TPH ($p=0,036$, $p=0,006$, $p=0,002$ y $p=0,021$, respectivamente).

2.4.2 La infección por CMV provoca cambios dinámicos en la reconstitución de las subpoblaciones de LT CD4+ y CD8+ después del alo-TPH.

Cuando la población de linfocitos fue estudiada en detalle y por subpoblaciones, se observaron hallazgos significativos que son mostrados en la Tabla 15.

Tabla 15. Monitorización de las subpoblaciones de leucocitos, linfocitos, LT CD8+ y CD4+ y mDC antes de la infusión (Pre) y durante los primeros 150 días después del alo-TPH en función de las infecciones por CMV. Los resultados se expresan como mediana y rango.

Subpoblación celular	Días post-trasplante	No CMV n=18	Infección CMV n=17	p-valor
Linfocitos ($10^3/\mu\text{L}$)	Pre	0,15 (0,00-1,80)	0,20 (0,00-2,30)	0,506
	+30	0,80 (0,00-1,70)	0,20 (0,00-0,70)	0,008
	+90	0,80 (0,30-3,50)	0,80 (0,40-1,80)	0,873
	+150	0,90 (0,30-3,50)	1,40 (0,50-3,60)	0,077
LT CD4+ (cél/ μL)	Pre	961,43 (8,42-3344,19)	610,89 (11,55-2327,09)	0,343
	+30	584,52 (67,34-1963,42)	482,62 (40,16-2701,44)	0,318
	+90	633,94 (90,61-1739,18)	635,61 (345,98-2094,14)	0,732
	+150	826,93 (354,20-1805,96)	604,58 (282,20-1676,90)	0,031
LT CD8+ (cél/ μL)	Pre	658,30 (1,73-1827,78)	712,21 (11,83-2080,05)	0,556
	+30	535,11 (57,68-4462,76)	409,41 (169,75-1862,84)	0,369
	+90	571,39 (48,94-3608,22)	1752,55 (204,06-7278,22)	0,049
	+150	897,53 (185,09-3328,18)	2087,60 (602,32-5721,66)	0,028
Cociente CD4+/CD8+	Pre	1,82 (0,58-14,81)	1,16 (0,56-8,37)	0,580
	+30	0,62 (0,19-4,06)	1,08 (0,24-2,73)	0,546
	+90	1,02 (0,14-8,41)	0,26 (0,21-1,69)	0,008
mDC (cél/ μL)	Pre	16,05 (0,72-704,61)	10,90 (0,00-92,66)	0,274
	+30	158,47 (11,93-1872,75)	90,50 (1,48-479,63)	0,303
	+90	107,50 (6,84-406,35)	66,93 (2,90-107,53)	0,089
	+150	77,52 (0,78-652,93)	39,66 (6,06-312,59)	0,127

Tal y como se observa en la Tabla 15, el valor de LT CD4+ a los +150 días tras la infusión fue significativamente inferior en los pacientes que presentaron infección por CMV ($p=0,031$). Por el contrario, en los días +90 y +150 después del alo-TPH, estos mismos pacientes mostraron una concentración significativamente mayor de LT CD8+ ($p=0,049$ y $p=0,028$, respectivamente). Por lo tanto, cuando su cociente CD4+/CD8+ fue calculado a esos mismos días (+90 y +150), se observó una inversión del mismo respecto al mostrado en los sujetos sin infección por este virus ($p=0,008$ y $p<0,001$, respectivamente). Los resultados obtenidos para cada una de las subpoblaciones de LT analizadas y para el cociente CD4+/CD8+ en cada uno de los días post-TPH monitorizados y para cada uno de los dos grupos estudiados son mostrados en la Figura 18.

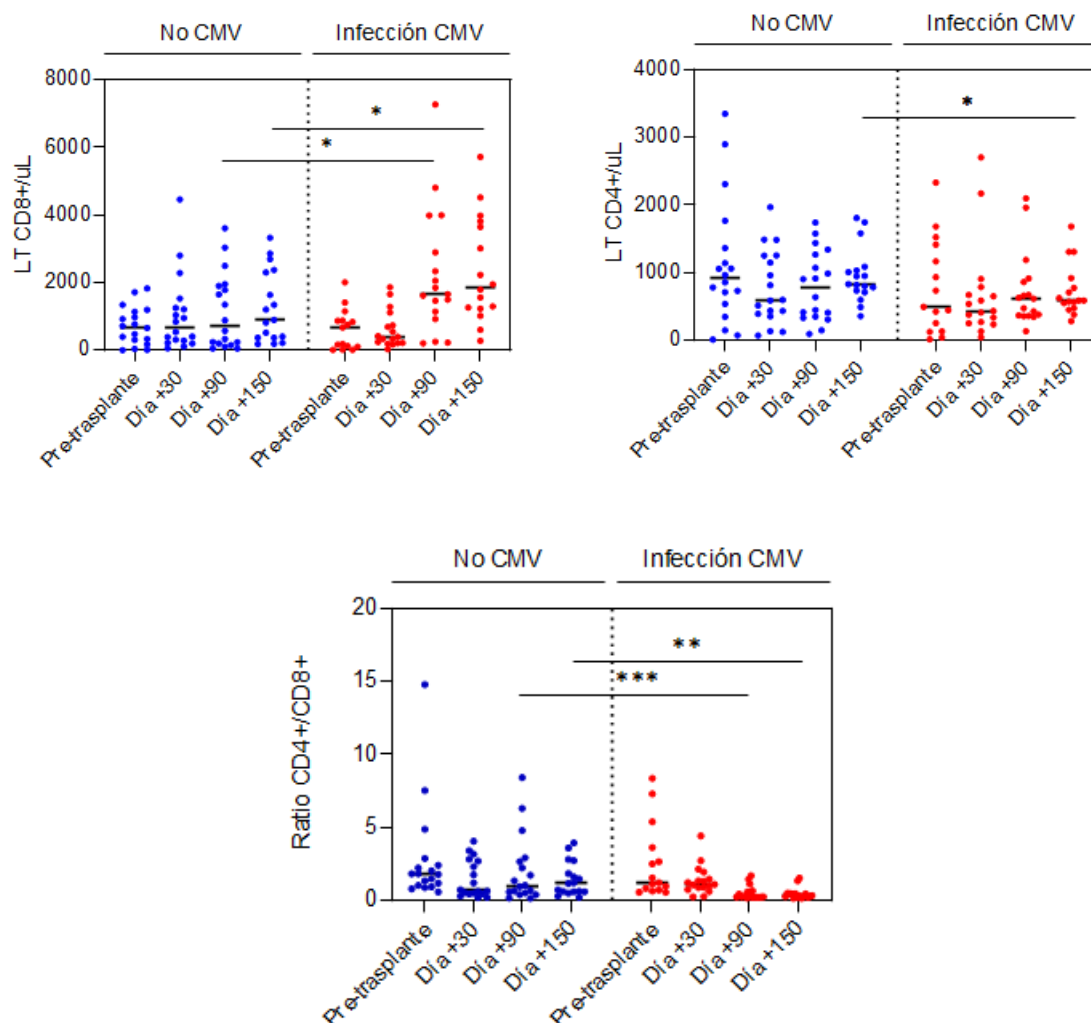


Figura 18. Análisis de la cinética de reconstitución inmunológica en pacientes con o sin infección por del CMV. El nivel de significación en el test ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$) se representa por una, dos o tres estrellas, respectivamente.

Por otro lado, a pesar de que el análisis global mostró una disminución de la concentración de mDC en los pacientes infectados por CMV, dichas diferencias no fueron encontradas cuando el análisis fue realizado en relación a cada uno de los días de monitorización (Tabla 15).

2.4.3 LT CD4+ y CD8+ memoria disfuncionales están presentes en pacientes que experimentan infección por CMV después del alo-TPH.

Además de conocer el comportamiento de las subpoblaciones de LT CD4+ y CD8+ después del alo-TPH, también se quiso comprobar la cinética de recuperación de las subpoblaciones funcionales de LT multivirales (CMV, VEB y AdV). En primer lugar, se examinó la producción de las citoquinas IFN- γ e IL-2 y la expresión de las moléculas

CD40L y CD107a por parte de los LT del paciente. Para ello CMN de los pacientes fueron simultáneamente estimulados *ex vivo* con los antígenos virales CMV, VEB y AdV. Posteriormente se estudió si existía relación entre la concentración de dichas subpoblaciones funcionales y los episodios de infección víricas más predominantes (CMV, VEB y virus BK) después del alo-TPH en nuestra cohorte de pacientes. Mientras que para VEB y virus BK no se encontraron diferencias, los sujetos que experimentaron infección por CMV (17/35) mostraron una concentración de LT (tanto CD4+ como CD8+) que producían IFN- γ , IL-2 o expresaban CD40L, CD107a inferiores a los que presentaban los que no tuvieron infección por CMV en los días +30, +90 y +150 después del alo-TPH. Estos resultados son mostrados en la Tabla 16 y en las Figuras 19 y 20.

A continuación, se evaluó la expresión simultánea de estos marcadores funcionales por parte de los LT, encontrando que los pacientes con infección por CMV tras el alo-TPH muestran una menor concentración de LT CD4+IL-2+CD107a+ en los días +30 y +90, a diferencia de los que no sufren esta infección ($p=0,032$ y $p=0,029$, respectivamente). Siguiendo la misma línea, los pacientes con CMV muestran una menor concentración de LT CD4+IFN- γ +CD40L+ en el día +150, cuando se comparan con los que no sufren esta infección viral ($p=0,037$).

Tabla 16. Producción de IFN- γ /IL-2 o expresión de CD40L/CD107a por parte de los LT CD4+ y CD8+ específicos de CMV/VEB/AdV en función de la infección por CMV después del alo-TPH. Los resultados se expresan como mediana y rango y corresponden a los datos obtenidos antes de la infusión (Pre) y durante los primeros 150 días después del alo-TPH.

Subpoblación celular (cél/ μ L)	Días post-trasplante	No CMV n=18	Infección CMV n=17	p-valor
CD4+IL-2+	Pre	2,17 (0,00-37,49)	0,62 (0,00-1,78)	0,001
	+30	1,82 (0,00-49,57)	0,60 (0,00-12,95)	0,003
	+90	2,39 (0,00-22,09)	0,26 (0,00-7,36)	<0,001
	+150	2,52 (0,00-38,06)	0,35 (0,00-2,48)	<0,001
CD4+IFN- γ +	Pre	1,83 (0,00-99,98)	0,43 (0,00-4,29)	0,086
	+30	2,27 (0,00-9,09)	1,06 (0,00-23,18)	0,219
	+90	2,89 (0,00-10,60)	0,34 (0,00-4,33)	0,001
	+150	4,96 (0,862-42,752)	0,06 (0,00-2,48)	<0,001
CD4+CD40L+	Pre	6,47 (0,00-115,30)	1,38 (0,00-15,37)	0,002
	+30	8,05 (0,23-22,48)	2,42 (0,00-103,96)	0,007
	+90	6,87 (0,95-95,70)	1,42 (0,08-11,56)	0,001
	+150	10,36 (0,57-161,91)	1,01 (0,00-9,91)	<0,001
CD4+CD107a+	Pre	66,30(0,00-362,45)	1,77 (0,00-23,63)	0,002
	+30	41,04(0,00-279,34)	2,52 (0,00-48,51)	0,001
	+90	15,02(0,96-390,64)	3,67 (0,00-61,00)	0,014
	+150	21,32(2,27-473,31)	3,67 (0,00-62,30)	0,004
CD8+IL-2+	Pre	6,40 (0,00-167,78)	0,97 (0,00-4,88)	0,006
	+30	6,50 (0,09-164,41)	1,69 (0,00-18,56)	0,003
	+90	7,65 (0,00-47,77)	0,63 (0,00-5,49)	0,001
	+150	6,47 (1,19-200,79)	1,15 (0,00-12,30)	<0,001
CD8+IFN- γ +	Pre	1,71 (0,00-49,57)	0,44 (0,00-11,53)	0,244
	+30	8,27 (0,00-38,30)	0,43 (0,00-46,39)	0,002
	+90	3,17 (0,00-92,85)	0,72 (0,00-117,61)	0,014
	+150	12,22 (0,30-72,18)	0,29 (0,00-26,07)	<0,001
CD8+CD40L+	Pre	5,79 (0,00-251,67)	2,95 (0,00-19,65)	0,202
	+30	14,45 (1,47-164,41)	3,59 (0,00-51,03)	0,002
	+90	14,05 (0,00-147,97)	2,41 (0,19-352,86)	0,010
	+150	24,69 (1,48-135,97)	2,16 (0,08-36,96)	0,001
CD8+CD107a+	Pre	62,48 (0,00-1076,51)	0,75 (0,00-13,02)	0,006
	+30	55,79 (0,00-396,04)	5,93 (0,00-35,87)	0,001
	+90	27,31 (0,00-1194,26)	0,84 (0,00-40,13)	0,003
	+150	43,59 (0,15-1180,83)	3,19 (0,00-27,41)	0,003

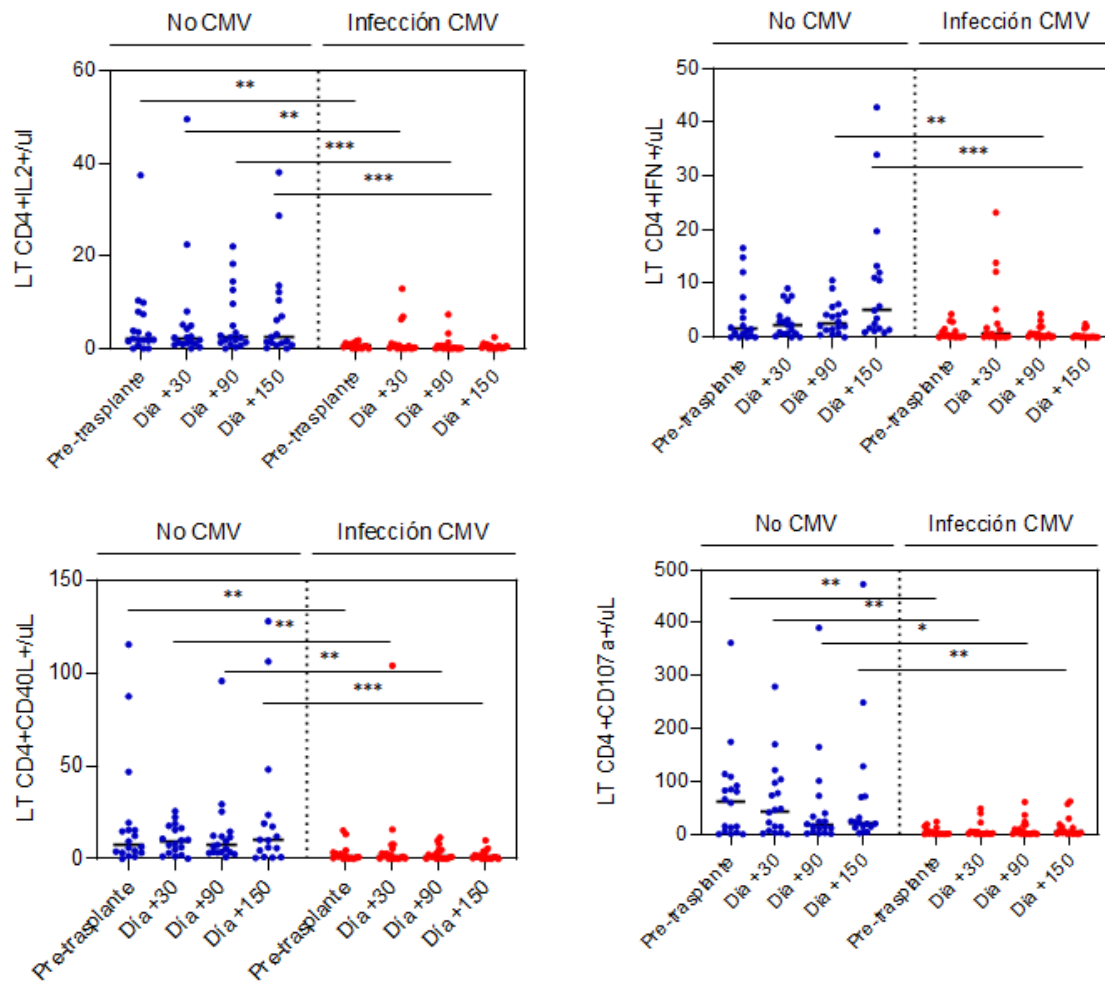


Figura 19. Análisis funcional de la cinética de reconstitución inmunológica de LT CD4+ tras activación antigénica específica de CMV/VEB/AdV en pacientes con o sin infección por CMV. El nivel de significación en el test ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$) se representa por una, dos o tres estrellas, respectivamente.

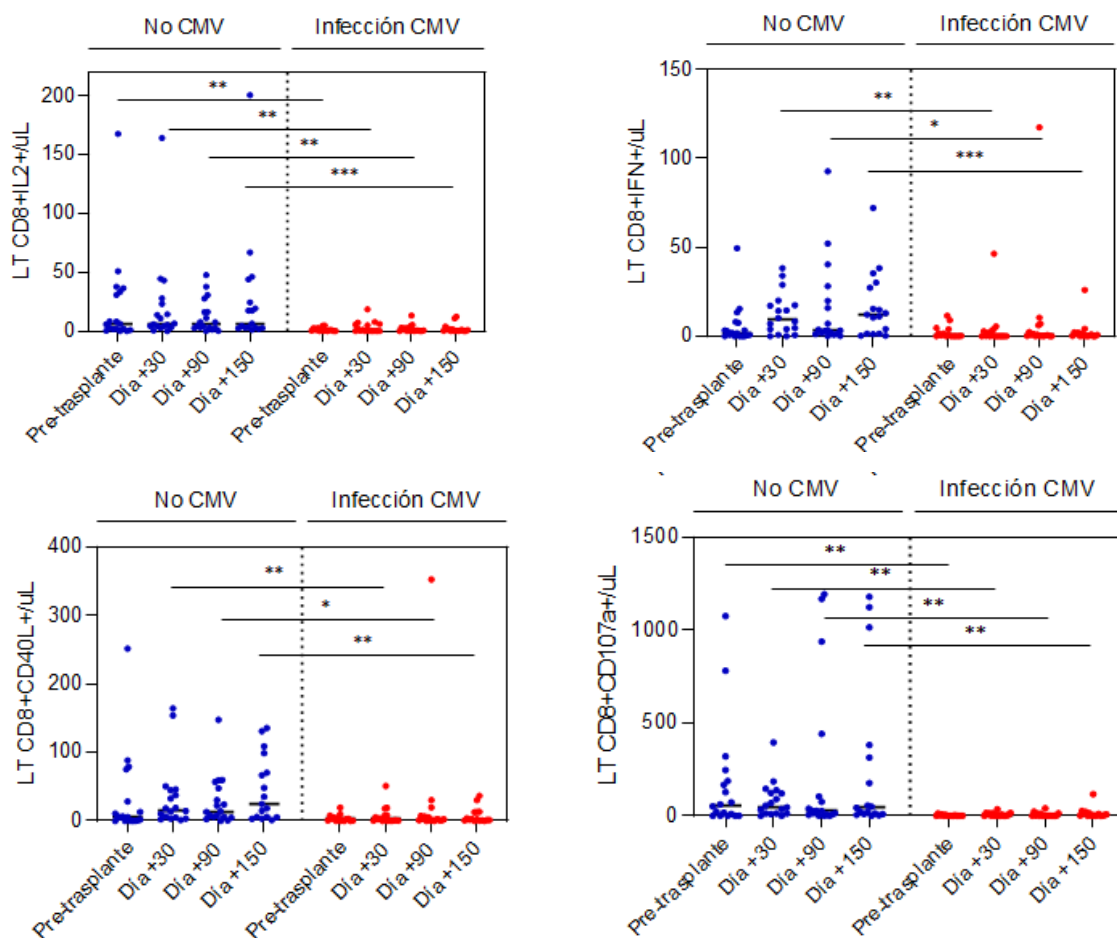


Figura 20. Análisis funcional de la cinética de reconstitución inmunológica de LT CD8+ tras activación antigénica específica de CMV/VEB/AdV en pacientes con o sin infección por CMV. El nivel de significación en el test ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$) se representa por una, dos o tres estrellas, respectivamente.

En segundo lugar, se emplearon los datos obtenidos en la evaluación de la funcionalidad linfocitaria T para identificar marcadores celulares pronósticos relevantes para una mejor definición del riesgo de infección por CMV. Para ello, se seleccionaron los resultados de producción de IFN- γ e IL-2 y de expresión de CD40L y CD107a tras el estímulo *ex vivo* con los antígenos virales en el día +30 tras la infusión de los PH. Este punto de análisis fue elegido por su proximidad a la mediana de días de aparición del primer episodio de infección por CMV encontrado en nuestra cohorte (+24 días). El punto de corte óptimo para predecir el riesgo de infección de CMV se seleccionó empleando el valor de la mediana de cada una de las subpoblaciones estudiadas obtenido a día +30 después del alo-TPH. En la Tabla 17 se muestran los resultados

obtenidos para las dos cohortes creadas (bajo riesgo y alto riesgo de infección de CMV) en función de los puntos de corte seleccionados.

Tabla 17. Medianas y rangos obtenidos de cada subpoblación de LT en función del punto de corte asignado para definir el riesgo de infección por CMV a día +30 post-TPH.

Subpoblación celular (cél/ μ L)	Alto riesgo de CMV	Bajo riesgo de CMV	p-valor
CD4+IL-2+	0,17 (0,00-1,04)	4,28 (1,11-49,56)	0,003
CD4+IFN- γ +	0,10 (0,00-0,93)	3,63 (1,35-23,18)	0,174
CD4+CD40L+	1,19 (0,00-3,19)	10,57 (4,96-103,96)	0,005
CD4+CD107a+	1,39 (0,00-4,34)	47,33 (5,17-279,34)	0,002
CD8+IL-2+	0,41 (0,00-4,49)	9,40 (4,56-164,41)	0,078
CD8+IFN- γ +	0,04 (0,00-2,76)	12,29 (3,18-46,39)	<0,001
CD8+CD40L+	1,46 (0,00-5,45)	19,13 (6,50-164,41)	0,020
CD8+CD107a +	0,95 (0,00-13,63)	50,66 (13,73-396,04)	0,014

A continuación, se calculó la incidencia acumulada de infección por CMV durante los primeros 180 días tras la infusión de los PH. La probabilidad de infección por CMV fue superior entre los individuos con una concentración inferior de LT CD4+ en relación a la producción de IL-2 o expresión de CD40L, CD107a a día +30 después del alo-TPH (punto de corte: 1,0 células/ μ L, 4,9 células/ μ L y 5,2 células/ μ L, respectivamente), ver Figura 21.

Del mismo modo, se encontraron resultados similares para LT CD8+, la probabilidad de infección por CMV de nuevo se asociaba a una concentración más baja de la subpoblación de LT citotóxicos que producían IFN- γ o expresan CD40L, CD107a a día +30 después del trasplante (punto de corte: 3,2 células/ μ L, 6,5 células/ μ L y 13,7 células/ μ L, respectivamente), tal y como se ilustra en la Figura 22.

En resumen, el uso de estos parámetros de funcionalidad linfocitaria T obtenidos en el día +30 de la monitorización, permiten clasificar correctamente a los pacientes en función del riesgo de sufrir infección por CMV durante los primeros 180 días después del alo-TPH (Figura 21 y 22).

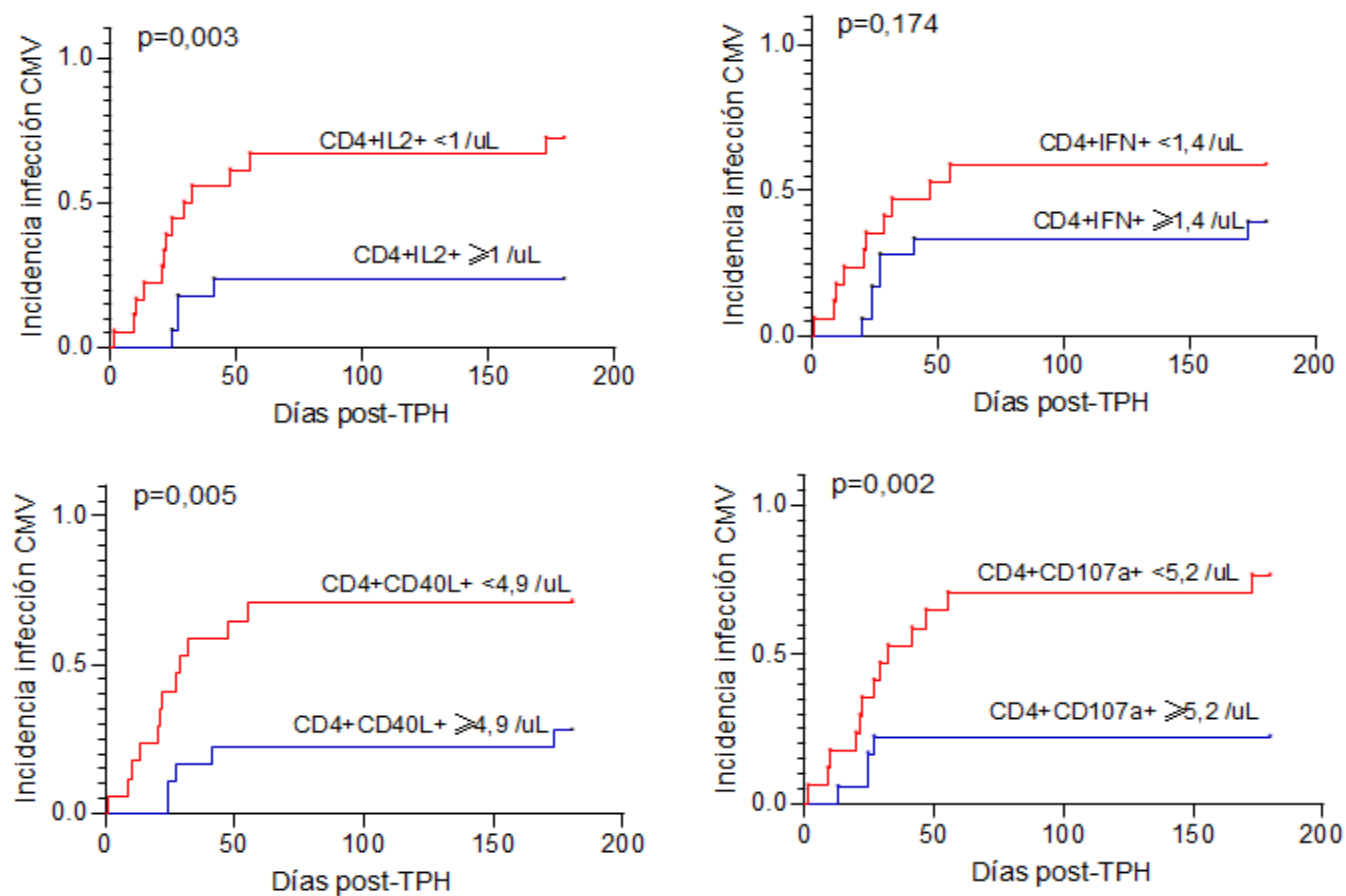


Figura 21. Incidencia acumulada de infección de CMV en los primeros días 180 tras el trasplante en función de los niveles de LT CD4+ que producen IFN- γ , IL-2 o expresan CD40L y CD107a. Los pacientes se clasifican en función del punto de corte asignado para cada subpoblación analizada.

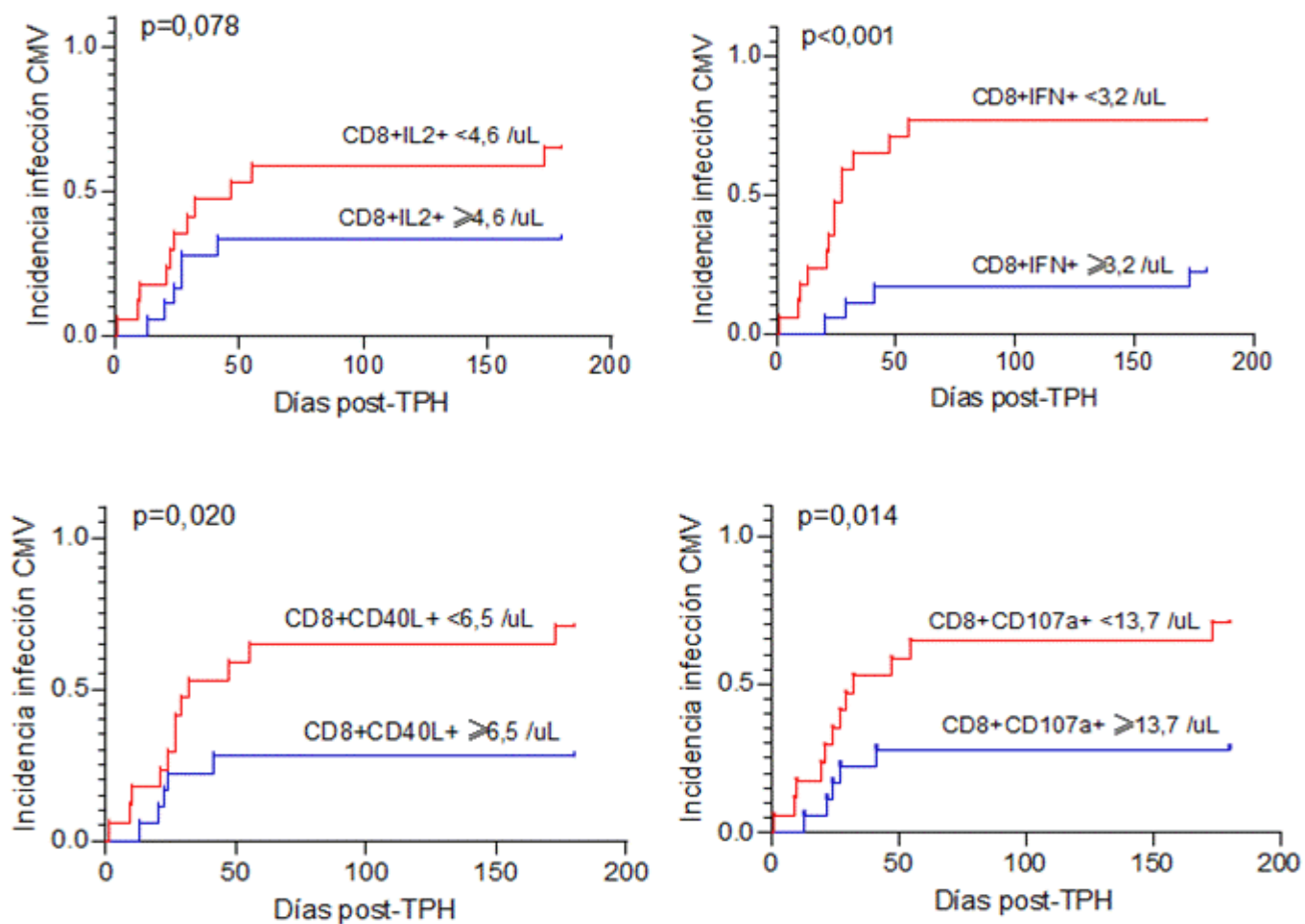


Figura 22. Incidencia acumulada de infección de CMV en los primeros días 180 tras el trasplante en función de los niveles de LT CD8+ que producen IFN- γ , IL-2 o expresan CD40L y CD107a. Los pacientes se clasifican en función del punto de corte asignado para cada subpoblación analizada.

Finalmente, se realizó un sub-análisis incluyendo únicamente los 17 sujetos que experimentaron infección por CMV después del alo-TPH. Estos 17 individuos se subdividieron en dos cohortes, pacientes que padecieron un único episodio vírico (n=8) y pacientes con recurrencia de infección por CMV (n=9). Este análisis reveló una disminución de la concentración de LT CD4+IFN- γ + en los pacientes que experimentaban recurrencia del CMV en el día +150 [0,36 células/ μ l (0,00-2,48) vs 0,00 células/ μ l (0,00-0,24), p=0,031]. Se encontraron resultados similares para LT CD8+IFN- γ + a el mismo día de monitorización [2,04 células/ μ L (0,02-26,07) vs 0,23 células/ μ L (0,00-1,32), p=0,012].

2.5 La presencia de bmGT y la administración de profilaxis anti-EICR basada en Cy-PT condiciona la reconstitución funcional de subpoblaciones de LT específicos de virus

Con la finalidad de evaluar el potencial papel patogénico de la GT como mecanismo inmunosupresor que contrarresta la respuesta inmune celular frente a los virus, se procesaron un total de 280 sueros pertenecientes a los 35 pacientes incluidos en el estudio en los siguientes días de análisis: pre-trasplante, +15, +30, +60, +90, +120, +150 y +180 post alo-TPH. En todas las muestras se analizaron los niveles de GT y bmGT, no encontrando ninguna muestra positiva para GT. Este mismo hallazgo fue descrito previamente por Domingo MP y col. quienes demostraron que la GT posee un tiempo de vida media corto lo que provoca que los niveles de GT en pacientes post-TPH sean transitorios (144). Por esta razón, en adelante, nos referiremos exclusivamente a los niveles detectados de bmGT.

De los 35 pacientes incluidos en el estudio, 23 (65,7%) mostraron niveles positivos para bmGT en algún punto de los días monitorizados. El paciente diagnosticado de probable AI en al día +43 post-TPH mostró niveles cuantificables de bmGT en los siguientes puntos del periodo de seguimiento: pre-transplante (14,21 μ g/mL), +120 (4,36 μ g/mL), +150 (5,27 μ g/mL) y +180 días (6,30 μ g/mL). Un resumen de los valores numéricos obtenidos del análisis de bmGT en nuestra cohorte es mostrado en la Tabla 18.

Tabla 18. Resultados obtenidos en el análisis de bmGT en los pacientes. Los resultados se expresan como mediana y rango.

Tiempo post-trasplante (días)	Nº de pacientes	Concentración de bmGT ($\mu\text{g/mL}$)
Pre-trasplante	21	5,68 (0,21-15,57)
+15	-	-
+30	3	2,61 (2,33-5,00)
+60	1	1,16
+90	6	2,65 (0,53-5,79)
+120	7	2,25 (0,41-8,67)
+150	11	3,71 (0,27-5,88)
+180	11	4,06 (0,77-6,30)

Con respecto al análisis de las variables clínicas, 14/21 pacientes (66,7%) con niveles de bmGT en la muestra de suero obtenida antes del trasplante recibieron un régimen de acondicionamiento mieloablativo en comparación con 7/21 (33,3%) pacientes que recibieron un régimen de intensidad reducida, OR: 7,33; IC 95%: 1,53-35,11; $p=0,015$. Además, 19/21 sujetos (90,5%) que tenían niveles cuantificables de bmGT en el punto de monitorización pre-trasplante recibieron Cy-PT, a diferencia de los que recibieron otros regímenes de profilaxis frente a EICR (OR: 23,75; IC 95%: 3,69-152,89; $p<0,001$). La relación encontrada entre la administración de este fármaco y el hallazgo de niveles detectados de bmGT en el momento pre-trasplante se representa a continuación en la Figura 23.

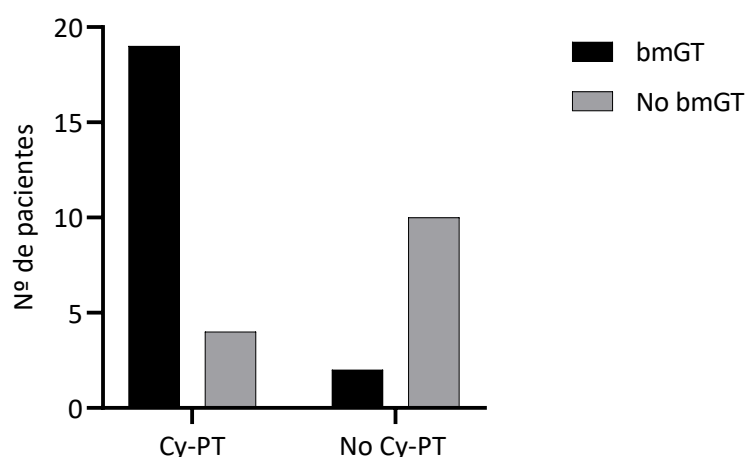


Figura 23. Relación entre la administración de Cy-PT y el hallazgo de niveles de bmGT en el momento pre-trasplante.

Otras variables clínicas (edad, tipo de donante, enfermedad hematológica, uso de ATG, EICR aguda y crónica) no se asociaron con la detección de niveles de bmGT.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el grupo de donantes sanos del Bloque I de estudio, evaluamos la contribución conjunta de la presencia de bmGT en la muestra anterior al trasplante y la administración de profilaxis farmacológica basada en Cy-PT a las infecciones por Herpesvirus. Para ello comparamos esta sub-cohorte de 19 pacientes que presentaban ambas características con los pacientes que no mostraron niveles detectados de bmGT y no recibieron dicho fármaco (n=10). Concretamente, 12/19 (63,2%) pacientes que recibieron Cy-PT y mostraron nivel de bmGT en el momento pre-trasplante mostraron una mayor incidencia de infección por CMV que aquellos (7/19, 36,8%) que recibieron otros regímenes de profilaxis frente a EICR y que no presentaban en suero bmGT (OR: 6,86; IC 95%: 1,12-41,83; p=0,05) (Figura 24).

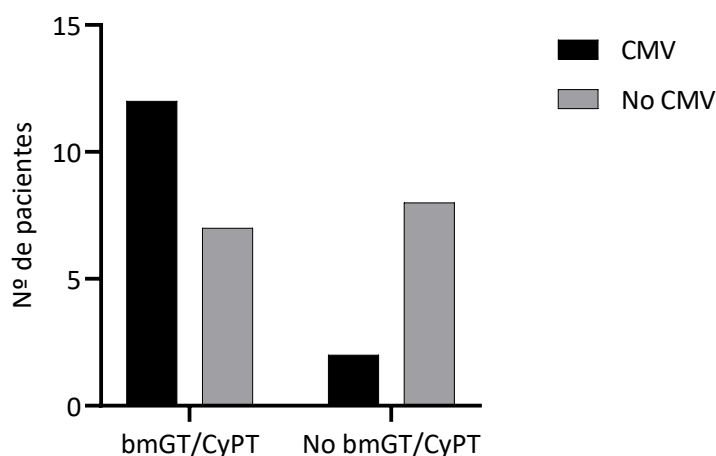


Figura 24. Relación entre la administración de Cy-PT y el hallazgo de niveles de bmGT en el momento pre-trasplante y la infección por CMV después del alo-TPH.

Finalmente, para determinar si el retraso inmunológico en los pacientes después del alo-TPH se podría deber a un efecto combinado del uso de profilaxis farmacológica basada en Cy-PT y a una infección subclínica causada por el hongo AF y que era demostrada por la identificación sérica de bmGT, se determinó la relación entre ambas variables y las concentraciones encontradas de cada una de las subpoblaciones inmunológicas estudiadas durante el periodo post-TPH. La Tabla 19 detalla la relación observada en este sub-análisis en nuestra cohorte.

Tabla 19. Subpoblaciones inmunológicas analizadas en pacientes con o sin presencia de bmGT en el momento previo al trasplante y que reciben sí o no farmacología profiláctica basada en Cy-PT. Los resultados se expresan como mediana y rango.

Subpoblación celular	Con bmGT y Cy-PT (n=19)	Sin bmGT ni Cy-PT (n=10)	p-valor
Linfocitos ($10^3/\mu\text{L}$)	0,70 (0,00-3,60)	0,80 (0,20-2,70)	0,131
LT CD4+ (cél/ μL)	585,96 (11,55-2327,09)	834,87 (121,64-3344,19)	0,024
CD4+IL-2+	0,51 (0,00-49,57)	1,84 (0,00-14,52)	<0,001
CD4+IFN- γ +	1,27 (0,00-99,98)	1,37 (0,00-16,59)	0,530
CD4+CD40L+	4,20 (0,00-161,91)	4,27 (0,23-115,30)	0,597
CD4+CD107a+	4,20 (0,00-362,45)	53,81 (0,31-473,31)	<0,001
LT CD8+ (cél/ μL)	1038,76 (7,26-7278,22)	749,76 (49,30-4462,76)	0,203
CD8+IL-2+	1,48 (0,00-167,78)	4,92 (0,09-164,41)	<0,001
CD8+IFN- γ +	1,36 (0,00-117,61)	2,24 (0,03-92,85)	0,031
CD8+CD40L+	4,55 (0,00-352,86)	7,70 (0,67-164,41)	0,058
CD8+CD107a+	5,53 (0,00-1015,20)	27,38 (0,35-1180,83)	<0,001
Cociente CD4+/CD8+	0,63 (0,14-14,81)	1,20 (0,44-6,30)	0,003
mDC (cél/ μL)	37,01 (0,00-653,89)	50,68 (0,52-1872,75)	0,072
Células NK	836,98 (21,89-4182,49)	698,01 (18,39-4583,70)	0,388
NK CD56 ^{dim} (cél/ μL)	676,65 (10,22-3431,68)	505,52 (13,91-4120,93)	0,198
NK CD56 ^{bright} (cél/ μL)	55,76 (0,00-2959,62)	55,05 (1,71-1355,11)	0,426
KIR2DS4 (%)	1,60 (0,00-51,23)	0,22 (0,01-10,96)	0,003
KIR3DL1 (%)	3,27 (0,00-20,82)	0,38 (0,02-10,01)	<0,001

De forma detallada, los pacientes con niveles detectables de bmGT y que reciben Cy-PT mostraron una menor concentración de LT CD4+ respecto al grupo de sujetos en donde esta toxina no estaba presente ni recibían este fármaco. Tal y como se indica en esta misma tabla 19, estos sujetos mostraron tras la estimulación *in vitro* con antígenos multivirales una concentración inferior de LT CD4+ y CD8+ productores de IL-2 o que expresaban CD107a. El análisis por días de monitorización de la expresión de CD107a por parte de los LT se representa en la Figura 25.

Respecto a la subpoblación de células NK, no se encontró asociación entre la recuperación inmunológica de los niveles de esta subpoblación después de alo-TPH y las variables analizadas. Sin embargo, la expresión de los receptores KIR fue superior en el grupo de pacientes con bmGT y Cy-PT ($p=0,003$ para KIR2DS4 y $p<0,001$ para KIR3DL1). El análisis detallado por días de monitorización se representa a continuación en la Figura 26.

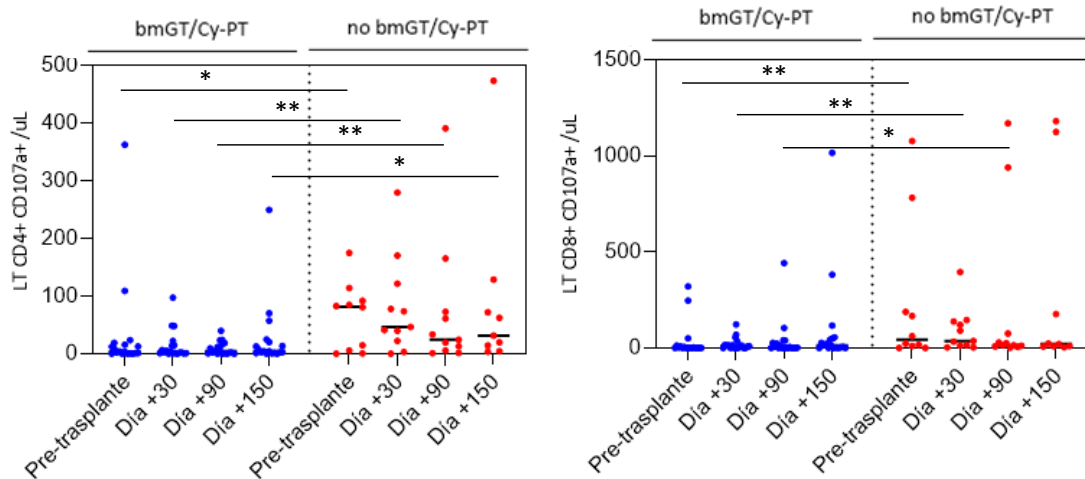


Figura 25. Análisis de la reconstitución de LT CD4+ y CD8+ CD107a+ tras activación antigénica específica de CMV/VEB/AdV en pacientes con o sin presencia de bmGT en el momento previo al trasplante y que reciben sí o no farmacología profiláctica basada en Cy-PT. El nivel de significación en el test ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$) se representa por una, dos o tres estrellas, respectivamente.

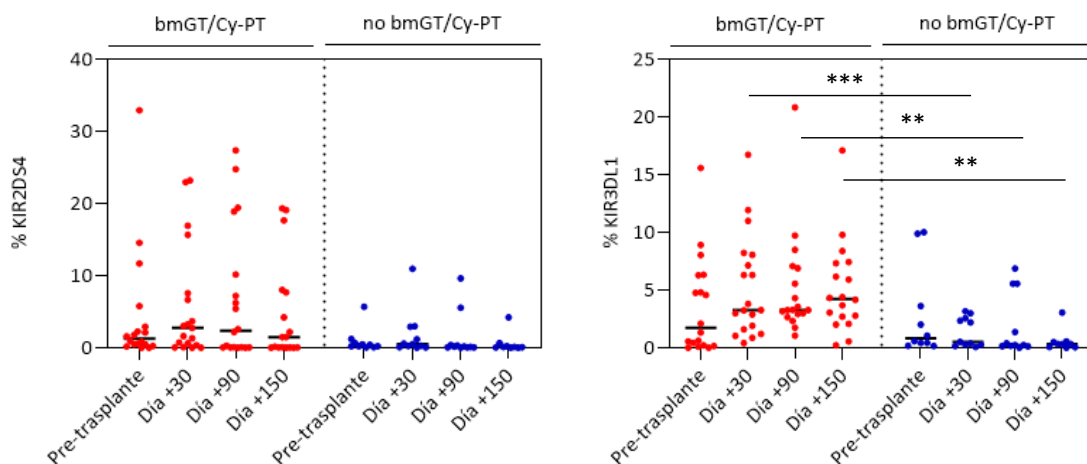


Figura 26. Análisis de la cinética de expresión de los receptores KIR2DS4 y KIR3DL1 por parte de las células NK en pacientes con o sin presencia de bmGT en el momento previo al trasplante y que reciben sí o no farmacología profiláctica basada en Cy-PT. El nivel de significación en el test ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$) se representa por una, dos o tres estrellas, respectivamente.

El análisis multivariante realizado que emplea como cofactor el tiempo de monitorización y la infección por CMV, confirma que la aparición de bmGT en el pre-trasplante es un factor independiente que influye de manera significativa en los niveles de CD107a+CD4+ después del alo-TPH ($p=0,032$) y que induce también una tendencia negativa en los niveles de CD107a+CD8+ ($p=0,076$). Este parámetro de funcionalidad

linfocitaria es el único que tuvo un impacto significativo en los resultados en el análisis multivariante.

3. Bloque III

3.1 Incidencia de infección por CMV post-TPH y factores de riesgo asociados

En este tercer bloque de estudio se incluyeron una cohorte de 90 pacientes que recibieron un alo-TPH de un hermano HLA-idéntico así como sus correspondientes 90 donantes. Cinco pacientes fueron excluidos del análisis como consecuencia de un seguimiento incompleto durante el periodo post-trasplante ya que fallecieron antes del día +180 post-TPH.

De los 85 pacientes finalmente incluidos en el análisis, cincuenta y un pacientes (60%) de la tercera cohorte de pacientes (n=85) utilizada en este proyecto, sufrieron al menos un episodio de infección primaria o reactivación por CMV en los primeros 180 días después del alo-TPH. De estos 51 pacientes, 24 (47,1%) experimentaron un único episodio de infección por CMV, 12 pacientes (23,5%) sufrieron dos episodios y 15 sujetos (29,4%) más de dos episodios en los 180 días posteriores a la infusión de PH.

Los episodios iniciales de infección de CMV tuvieron lugar a una mediana de 48 días (rango, 2-151) después del alo-TPH. Además, cuatro pacientes (4,4%) fueron diagnosticados de enfermedad por CMV, concretamente neumonía causada por el virus: tres de ellos tras un único episodio de infección y uno después de tres episodios recurrentes de infección por CMV. Tal y como se indica en la tabla 20, las variables clínicas analizadas (edad, sexo, fuente de PH, patología hematológica de base, régimen de acondicionamiento, irradiación corporal total (TBI), trasplante autólogo previo y estado serológico del CMV previo al TPH) no se asociaron con la infección por este virus post-trasplante.

En todos los pacientes, la profilaxis frente a la EICR fue similar y consistió en la administración de CsA y MTX. De los 85 pacientes incluidos en el estudio, 47 (55,3%) sufrieron EICR grado II-IV y 20 (23,5%) grado III-IV. 36 de los 47 pacientes (76,6%) diagnosticados de EICR grado II-IV experimentaron infección por CMV después del alo-TPH (OR: 5,0; IC 95%: 1,9-12,8; p=0,001). Además, 19 de los 20 pacientes (95%) con EICR grado III-IV sufrieron infección por CMV después del trasplante (OR: 19,6; IC 95%: 2,5-155,1; p<0,001). Por tanto, la aparición de EICR aguda constituyó el principal factor de riesgo de infección de CMV en nuestra cohorte.

Tabla 20. Características clínicas de pacientes y donantes incluidos en la tercera cohorte de estudio.

Parámetro	Total cohorte (n=85)	No CMV (n=34)	Infección CMV (n=51)	p-valor
Edad receptor, mediana (rango), años	44 (13-65)	44 (13-63)	46 (16-63)	0,199
Edad donante, mediana (rango), años	44 (11-73)	44 (15-64)	45 (11-73)	0,063
Sexo receptor (hombre/mujer)	55/30	23/11	32/19	0,817
Sexo donante (hombre/mujer)	45/40	19/15	25/26	0,658
Diagnóstico, nº de pacientes (%)				
LAM	27 (31,8)	12 (35,3)	15 (29,4)	0,638
LNH	24 (28,2)	8 (23,5)	16 (31,4)	0,471
LAL	16 (18,8)	6 (17,7)	10 (19,5)	1
SMD	8 (9,4)	2 (5,9)	6 (11,8)	0,467
MM	4 (4,7)	3 (8,8)	1 (2,0)	0,297
LH	2 (2,4)	1 (2,9)	1 (2,0)	1
Otros (anemia aplásica, LMC, LLC)	4 (4,7)	2 (5,9)	2 (3,9)	1
Fuente de PH, nº (%)				
SP	80 (94,1)	33 (97,1)	47 (92,2)	0,644
MO	5(5,9)	1 (2,9)	4 (7,8)	0,644
Serología CMV, nº (%)				
D+/R+	60 (70,6)	26 (76,5)	34 (66,7)	0,467
D-/R+	13 (15,3)	3 (8,8)	10 (19,6)	0,227
D+/R-	9 (10,6)	4 (11,8)	5 (9,8)	1
D-/R-	3 (3,5)	1 (2,9)	2 (3,9)	1
Régimen de acondicionamiento, nº (%)				
Mieloablatoivo	48 (56,5)	19 (55,9)	22 (43,1)	1
De intensidad reducida	37 (43,5)	15 (44,1)	29 (56,9)	1
TBI, nº (%)	15 (17,6)	5 (14,7)	10 (19,6)	0,772
Trasplante autólogo previo, nº (%)	10 (11,8)	4 (11,8)	6 (11,8)	1
EICR aguda, nº (%)				
Grado II/IV	47 (55,3)	11 (32,4)	36 (70,6)	0,001
Grado III/IV	20 (23,5)	1 (2,9)	19 (37,3)	<0,001
EICR crónica, nº (%)	25 (29,4)	13 (38,2)	12 (23,5)	0,155

A continuación, se analizó la asociación entre las variables clínicas y la aparición de episodios de infección por CMV con una frecuencia superior a 2 episodios en los 180 días posteriores a la infusión de PH. Por ello, en este sub-análisis se incluyeron los 15 pacientes que sufren más de 2 episodios de reactivación por CMV post-TPH. Doce de ellos (80%), sufrieron EICR grado II-IV después del alo-TPH (OR: 4,0; IC 95%: 1,0-15,4; p=0,045). Por otro lado, tal y como se indica en la tabla previa, 13 pacientes con serología positiva para CMV (R+) obtuvieron PH de un donante sin contacto previo con el virus (D-). De estos 13 pacientes, 6 experimentaron más de dos episodios de

reactivación vírica por CMV después del trasplante (OR: 6,0; IC 95%: 1,6- 21,9; p=0,009).

3.2 Análisis de variantes genómicas obtenidas por NGS

Utilizando los filtros bioinformáticos previamente definidos en el apartado de material y métodos, se analizaron un total de 213 polimorfismos (tanto SNPs como INDELS) en las 85 parejas de sujetos (donante-receptor) incluidos en el estudio (n=170). Las características más destacadas de estos 213 polimorfismos se especifican en el Anexo 1. Mientras que 210 variantes genómicas fueron analizadas tanto en los receptores como en sus donantes, un SNP se analizó únicamente en receptores (*TGF-β1* rs1989457) y dos en donantes (*LTA* rs1041981 y rs2229094). Por lo tanto, el número de variantes genómicas analizadas en la cohorte de receptores fue de 211 mientras que en la de donantes fue de 212. La Figura 27 muestra el algoritmo empleado para la filtración de variantes.

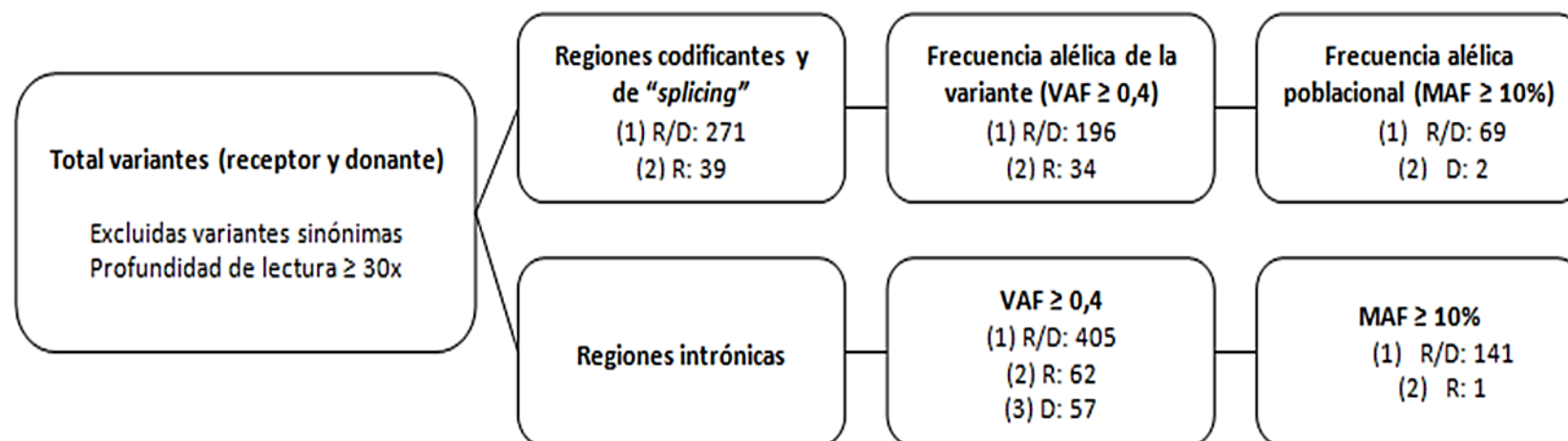


Figura 27. Algoritmo bioinformático para el análisis de las variantes genómicas obtenidas.

3.2.1 Asociación de polimorfismos en receptor y/o donante e infección por CMV post-TPH

En primer lugar, el análisis de los 213 polimorfismos seleccionados se correlacionó con el desarrollo de infección por CMV en los primeros 180 días después de la infusión de PH. Aunque 202 variantes genómicas estudiadas tanto en receptores como en donantes no tuvieron un impacto aparente en la infección por CMV, encontramos que 11 variantes de siete genes diferentes (*CXCL12*, *IL-12A*, *KIR3DL1*, *TGF- β 2*, *TNF- α* , *IL-1RN* y *CD48*) se asociaron significativamente con riesgo o protección frente a infección por CMV después del alo-TPH (Tabla 21).

Concretamente, la presencia de determinadas variantes alélicas en los genes *CXCL12* (rs2839695) y *KIR3DL1* (rs45542639, rs149123986, rs143159382, rs144994606) se relacionaron con un mayor riesgo de infección por CMV en nuestra cohorte de pacientes. Por el contrario, SNPs en *IL-12A* (rs7615589 y rs2243123), *TGF- β 2* (rs5781034) e *TNF- α* (rs3093662) se asociaron con protección frente a la infección por CMV en este mismo grupo.

Por otro lado, el análisis de los polimorfismos en la población de donantes mostró 3 SNPs relacionados con protección frente a esta infección vírica después del alo-TPH, específicamente *TNF- α* (rs3093662), *IL-1RN* (rs439154) y *CD48* (rs2295615). En concreto, el SNP encontrado en el gen de *TNF- α* se describe en nuestra cohorte asociado a un menor riesgo de infección de CMV tanto en receptores como en donantes.

La información de todos los SNPs descritos se detalla en la Tabla 21. La Figura 28 muestra la probabilidad de sufrir infección de CMV en función de cada uno de estos 11 SNPs.

Tabla 21. Efecto de los 11 SNPs analizados en la infección por CMV después del alo-TPH en la cohorte estudiada.

Gen	SNPs	Genotipo (Referencia/Variante)	Receptor/Donante	MAF	Efecto de la variante	Infección CMV (n=51)	No infección CMV (n=34)	p- valor	OR (IC 95%)																																																																																																																																			
CXCL12	rs2839695	AA	R	0,196	Variante intrónica	28	27	0,023	3,17 (1,17-8,59)																																																																																																																																			
		GG/GA				23	7			IL-12A	rs7615589	GG	R	0,248	Variante intrónica	41	18	0,009	0,27 (0,11-0,72)	AG/AA	10	16	rs2243123	TT	R	0,248	Variante intrónica	41	18	0,009	0,27 (0,11-0,72)	CT/CC	10	16	KIR3DL1	rs45542639	GG	R	0,248	Variante " missense"	32	29	0,028	3,44 (1,14-10,41)	AG/AA	19	5	rs149123986	AA	R	0,244	Variante " missense"	32	29	0,028	3,44 (1,14-10,41)	GA/GG	19	5	rs143159382	CC	R	0,242	Variante " missense"	33	29	0,047	3,16 (1,04-9,59)	TC/TT	18	5	rs144994606	GG	R	0,225	Variante " missense"	27	26	0,040	2,89 (1,10-7,58)	AG/AA	24	8	TGF-β2	rs5781034	CG	R	0,197	Variante intrónica	40	18	0,018	0,31 (0,12-0,80)	C-(delG)	11	16	TNF-α	rs3093662	AA	R	0,108	Variante intrónica	39	18	0,034	0,35 (0,14-0,88)	GA/GG	12	16	rs3093662	AA	D	0,108	Variante intrónica	40	18	0,018	0,31 (0,12-0,80)	GA/GG	11	16	IL-1RN	rs439154	GG	D	0,428	Variante intrónica	20	5	0,017	0,27 (0,09-0,81)	AG/AA	31	29	CD48	rs2295615	CC	D	0,105	Variante " missense"
IL-12A	rs7615589	GG	R	0,248	Variante intrónica	41	18	0,009	0,27 (0,11-0,72)																																																																																																																																			
		AG/AA				10	16				rs2243123	TT	R	0,248	Variante intrónica	41	18	0,009	0,27 (0,11-0,72)	CT/CC	10	16	KIR3DL1	rs45542639	GG	R	0,248	Variante " missense"	32	29	0,028	3,44 (1,14-10,41)	AG/AA	19		5	rs149123986	AA	R	0,244	Variante " missense"	32	29	0,028	3,44 (1,14-10,41)	GA/GG	19	5	rs143159382	CC	R	0,242	Variante " missense"	33	29	0,047	3,16 (1,04-9,59)	TC/TT	18	5	rs144994606	GG	R	0,225	Variante " missense"	27	26	0,040	2,89 (1,10-7,58)	AG/AA	24	8	TGF-β2	rs5781034	CG	R	0,197	Variante intrónica	40	18	0,018	0,31 (0,12-0,80)	C-(delG)	11	16	TNF-α	rs3093662	AA	R	0,108	Variante intrónica	39	18	0,034	0,35 (0,14-0,88)	GA/GG		12	16	rs3093662	AA	D	0,108	Variante intrónica	40	18	0,018	0,31 (0,12-0,80)	GA/GG	11	16	IL-1RN	rs439154	GG	D	0,428	Variante intrónica	20	5	0,017	0,27 (0,09-0,81)	AG/AA	31	29	CD48	rs2295615	CC	D	0,105	Variante " missense"	45	22	0,014	0,24 (0,08-0,74)	GC/GG	6	12			
	rs2243123	TT	R	0,248	Variante intrónica	41	18	0,009	0,27 (0,11-0,72)																																																																																																																																			
		CT/CC				10	16			KIR3DL1	rs45542639	GG	R	0,248	Variante " missense"	32	29	0,028	3,44 (1,14-10,41)	AG/AA	19	5		rs149123986	AA	R	0,244	Variante " missense"	32	29	0,028	3,44 (1,14-10,41)	GA/GG	19		5	rs143159382	CC	R	0,242	Variante " missense"	33	29	0,047	3,16 (1,04-9,59)	TC/TT	18	5	rs144994606	GG	R	0,225	Variante " missense"	27	26	0,040	2,89 (1,10-7,58)	AG/AA	24	8	TGF-β2	rs5781034	CG	R	0,197	Variante intrónica	40	18	0,018	0,31 (0,12-0,80)	C-(delG)	11	16	TNF-α	rs3093662	AA	R	0,108	Variante intrónica	39	18	0,034	0,35 (0,14-0,88)	GA/GG	12		16	rs3093662	AA	D	0,108	Variante intrónica	40	18	0,018	0,31 (0,12-0,80)	GA/GG	11	16	IL-1RN	rs439154	GG	D	0,428	Variante intrónica	20	5	0,017	0,27 (0,09-0,81)	AG/AA	31	29	CD48	rs2295615	CC	D	0,105	Variante " missense"	45	22	0,014	0,24 (0,08-0,74)	GC/GG	6	12															
KIR3DL1	rs45542639	GG	R	0,248	Variante " missense"	32	29	0,028	3,44 (1,14-10,41)																																																																																																																																			
		AG/AA				19	5				rs149123986	AA	R	0,244	Variante " missense"	32	29	0,028	3,44 (1,14-10,41)	GA/GG	19	5		rs143159382	CC	R	0,242	Variante " missense"	33	29	0,047	3,16 (1,04-9,59)	TC/TT	18	5	rs144994606	GG	R	0,225	Variante " missense"	27	26	0,040	2,89 (1,10-7,58)	AG/AA	24	8	TGF-β2	rs5781034	CG	R	0,197	Variante intrónica	40	18	0,018	0,31 (0,12-0,80)	C-(delG)	11	16	TNF-α	rs3093662	AA	R	0,108	Variante intrónica	39	18	0,034	0,35 (0,14-0,88)	GA/GG	12	16		rs3093662	AA	D	0,108	Variante intrónica	40	18	0,018	0,31 (0,12-0,80)	GA/GG	11	16	IL-1RN	rs439154	GG	D	0,428	Variante intrónica	20	5	0,017	0,27 (0,09-0,81)	AG/AA	31	29	CD48	rs2295615	CC	D	0,105	Variante " missense"	45	22	0,014	0,24 (0,08-0,74)	GC/GG	6	12																												
	rs149123986	AA	R	0,244	Variante " missense"	32	29	0,028	3,44 (1,14-10,41)																																																																																																																																			
		GA/GG				19	5				rs143159382	CC	R	0,242	Variante " missense"	33	29	0,047	3,16 (1,04-9,59)	TC/TT	18	5	rs144994606	GG	R	0,225	Variante " missense"	27	26	0,040	2,89 (1,10-7,58)	AG/AA	24	8	TGF-β2	rs5781034	CG	R	0,197	Variante intrónica	40	18	0,018	0,31 (0,12-0,80)	C-(delG)	11	16	TNF-α	rs3093662	AA	R	0,108	Variante intrónica	39	18	0,034	0,35 (0,14-0,88)	GA/GG	12	16		rs3093662	AA	D	0,108	Variante intrónica	40	18	0,018	0,31 (0,12-0,80)	GA/GG	11	16	IL-1RN	rs439154	GG	D	0,428	Variante intrónica	20	5	0,017	0,27 (0,09-0,81)	AG/AA	31	29	CD48	rs2295615	CC	D	0,105	Variante " missense"	45	22	0,014	0,24 (0,08-0,74)	GC/GG	6	12																																									
	rs143159382	CC	R	0,242	Variante " missense"	33	29	0,047	3,16 (1,04-9,59)																																																																																																																																			
		TC/TT				18	5			rs144994606	GG	R	0,225	Variante " missense"	27	26	0,040	2,89 (1,10-7,58)	AG/AA	24	8	TGF-β2	rs5781034	CG	R	0,197	Variante intrónica	40	18	0,018	0,31 (0,12-0,80)	C-(delG)	11	16	TNF-α	rs3093662	AA	R	0,108	Variante intrónica	39	18	0,034	0,35 (0,14-0,88)	GA/GG	12	16		rs3093662	AA	D	0,108	Variante intrónica	40	18	0,018	0,31 (0,12-0,80)	GA/GG	11	16	IL-1RN	rs439154	GG	D	0,428	Variante intrónica	20	5	0,017	0,27 (0,09-0,81)	AG/AA	31	29	CD48	rs2295615	CC	D	0,105	Variante " missense"	45	22	0,014	0,24 (0,08-0,74)	GC/GG	6	12																																																						
rs144994606	GG	R	0,225	Variante " missense"	27	26	0,040	2,89 (1,10-7,58)																																																																																																																																				
	AG/AA				24	8			TGF-β2	rs5781034	CG	R	0,197	Variante intrónica	40	18	0,018	0,31 (0,12-0,80)	C-(delG)	11	16	TNF-α	rs3093662	AA	R	0,108	Variante intrónica	39	18	0,034	0,35 (0,14-0,88)	GA/GG	12	16		rs3093662	AA	D	0,108	Variante intrónica	40	18	0,018	0,31 (0,12-0,80)	GA/GG	11	16	IL-1RN	rs439154	GG	D	0,428	Variante intrónica	20	5	0,017	0,27 (0,09-0,81)	AG/AA	31	29	CD48	rs2295615	CC	D	0,105	Variante " missense"	45	22	0,014	0,24 (0,08-0,74)	GC/GG	6	12																																																																			
TGF-β2	rs5781034	CG	R	0,197	Variante intrónica	40	18	0,018			0,31 (0,12-0,80)																																																																																																																																	
		C-(delG)				11	16		TNF-α	rs3093662		AA	R	0,108	Variante intrónica	39	18	0,034	0,35 (0,14-0,88)	GA/GG	12		16	rs3093662	AA	D	0,108	Variante intrónica	40	18	0,018	0,31 (0,12-0,80)	GA/GG	11	16	IL-1RN	rs439154	GG	D	0,428	Variante intrónica	20	5	0,017	0,27 (0,09-0,81)	AG/AA	31	29	CD48	rs2295615	CC	D	0,105	Variante " missense"	45	22	0,014	0,24 (0,08-0,74)	GC/GG	6	12																																																																															
TNF-α	rs3093662	AA	R	0,108	Variante intrónica	39	18	0,034			0,35 (0,14-0,88)																																																																																																																																	
		GA/GG				12	16			rs3093662		AA	D	0,108	Variante intrónica	40	18	0,018	0,31 (0,12-0,80)	GA/GG	11	16	IL-1RN	rs439154	GG	D	0,428	Variante intrónica	20	5	0,017	0,27 (0,09-0,81)	AG/AA	31	29	CD48	rs2295615	CC	D	0,105	Variante " missense"	45	22	0,014	0,24 (0,08-0,74)	GC/GG	6	12																																																																																												
	rs3093662	AA	D	0,108	Variante intrónica	40	18	0,018			0,31 (0,12-0,80)																																																																																																																																	
		GA/GG				11	16		IL-1RN	rs439154		GG	D	0,428	Variante intrónica	20	5	0,017	0,27 (0,09-0,81)	AG/AA	31	29	CD48	rs2295615	CC	D	0,105	Variante " missense"	45	22	0,014	0,24 (0,08-0,74)	GC/GG	6	12																																																																																																									
IL-1RN	rs439154	GG	D	0,428	Variante intrónica	20	5	0,017			0,27 (0,09-0,81)																																																																																																																																	
		AG/AA				31	29		CD48	rs2295615		CC	D	0,105	Variante " missense"	45	22	0,014	0,24 (0,08-0,74)	GC/GG	6	12																																																																																																																						
CD48	rs2295615	CC	D	0,105	Variante " missense"	45	22	0,014			0,24 (0,08-0,74)																																																																																																																																	
		GC/GG				6	12																																																																																																																																					

Probabilidad de infección por CMV

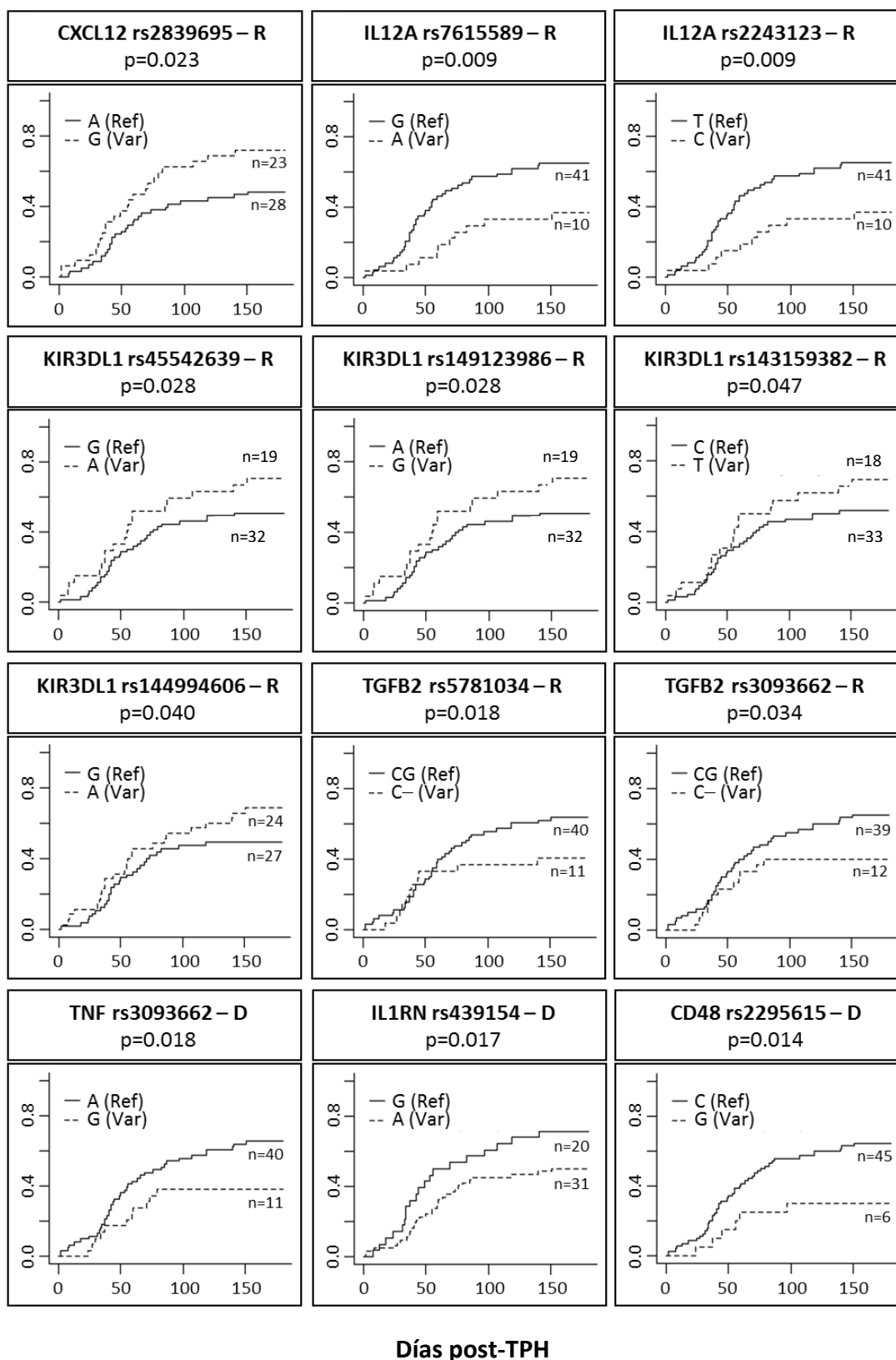


Figura 28. Influencia del genotipo en receptor y donante para los 11 SNPs seleccionados por su asociación con las infecciones por CMV en la tercera cohorte de estudio. *TNF- α* rs3093662 se analiza en receptores y donantes.

A continuación, se evaluó la asociación entre los 213 polimorfismos obtenidos en el análisis bioinformático y la aparición de más de dos episodios de CMV en los primeros 180 días después del alo-TPH. Los pacientes con determinados SNPs en *IL-6*: rs2069832, rs1800795, rs7802307, rs1474347, rs1554606 e rs2069845; tuvieron un riesgo menor de sufrir más de dos episodios de infección de CMV tras el TPH. Las características relevantes de estos SNPs se detallan en la Tabla 22.

Tabla 22. Efecto de los SNPs de *IL-6* en la frecuencia de episodios de infección por CMV después del alo-TPH.

SNPs	Genotipo (Referencia/Variante)	Receptor/Donante	MAF	Efecto de la variante	< 2 episodios CMV (n=70)	≥ 2 episodios CMV(n=15)	<i>p</i> -valor	OR (IC 95%)
rs2069832	AA	R	0,485	Variante	9	6	0,022	0,22 (0,06-0,77)
	GG/AG			intrónica	61	9		
rs1800795	CC	R	0,485	Variante	9	6	0,022	0,22 (0,06-0,77)
	GG/CG			intrónica	61	9		
rs7802307	TT	R	0,495	Variante	10	6	0,031	0,25 (0,07-0,86)
	AA/AT			intrónica	60	9		
rs1474347	CC	R	0,485	Variante	9	6	0,022	0,22 (0,06-0,77)
	AA/AC			intrónica	61	9		
rs1554606	TT	R	0,470	Variante	9	7	0,006	0,17 (0,05-0,58)
	GG/TG			intrónica	61	8		
rs2069845	GG	R	0,470	Variante	9	7	0,006	0,17 (0,05-0,58)
	AA/AG			intrónica	61	8		

3.2.2 Asociación de variantes genómicas en receptor y/o donante y enfermedad por CMV

Para valorar la asociación entre los 213 polimorfismos encontrados y la susceptibilidad a la enfermedad por CMV, se analizaron específicamente los 4 pacientes con diagnóstico de neumonía por CMV tras el trasplante. Los pacientes y donantes homocigotos o heterocigotos para la variante intrónica rs2071459 (TT/CT) del gen *IL1-RN* mostraron una asociación con la aparición de enfermedad por CMV: OR: 20,5; IC 95%: 1,82-230,52; $p = 0,015$ para el receptor y OR: 17,14; IC 95%: 1,55-189,24; $p = 0,021$, para el donante.

3.3 Elaboración de un score de riesgo genético para el manejo de la infección de CMV después del alo-TPH

Con el objetivo de elaborar un score genético de predicción de riesgo de infección por CMV después del trasplante alogénico, se construyeron diferentes modelos matemáticos con las combinaciones de SNPs seleccionados en el análisis previo.

Los parámetros utilizados para seleccionar el mejor modelo predictivo fueron el número de variables genéticas empleadas y el valor del AUC proporcionada por cada modelo. Los polimorfismos genéticos incluidos en cada modelo y su correspondiente AUC se indican en la Tabla 23.

Tabla 23. Resumen de los SNPs seleccionados para cada uno de los modelos elaborados para construir un modelo predictivo de infecciones de CMV después del alo-TPH.

Modelo	SNPs	AUC	Se (%)	Esp (%)
m1	rs2243123 (R)	0,637	80,4	47,1
m2	rs2243123 (R) rs3093662 (D)	0,708	80,4	47,1
m3	rs2839695 (R) rs144994606 (R) rs5781034 (R)	0,760	86,3	41,2
m4	rs2839695 (R) rs144994606 (R) rs5781034 (R) rs2295615 (D)	0,790	86,3	58,8
m5	rs2839695 (R) rs7615589(R) rs45542639(R) rs5781034(R) rs2295615(D)	0,814	82,4	67,6
m6	rs2839695(R) rs2243123(R) rs143159382(R) rs5781034(R) rs3093662(D) rs2295615(D)	0,824	84,3	58,8
m7	rs2839695(R) rs2243123(R) rs149123986(R) rs5781034(R) rs3093662(D) rs439154(D) rs2295615(D)	0,826	80,4	64,7
m8	rs2839695(R) rs2243123(R) rs45542639(R) rs144994606(R) rs5781034(R) rs3093662(D) rs439154(D) rs2295615(D)	0,830	82,4	61,8
m9	rs2839695(R) rs2243123(R) rs45542639(R) rs149123986(R) rs144994606(R) rs5781034(R) rs3093662(D) rs439154(D) rs2295615(D)	0,830	82,4	61,8
m10	rs2839695(R) rs2243123(R) rs149123986(R) rs143159382(R) rs144994606(R) rs5781034(R) rs3093662(R) rs3093662(D) rs439154(D) rs2295615(D)	0,832	80,4	67,6
m11	rs2839695(R) rs7615589(R) rs2243123(R) rs45542639(R) rs143159382(R) rs144994606(R) rs5781034(R) rs3093662(R) rs3093662(D) rs439154(D) rs2295615(D)	0,833	82,4	67,6
m12	rs2839695(R) rs7615589(R) rs2243123(R) rs45542639(R) rs149123986(R) rs143159382(R) rs144994606(R) rs5781034(R) rs3093662(R) rs3093662(D) rs439154(D) rs2295615(D)	0,833	82,4	67,6

Se: Sensibilidad; Esp: Especificidad.

A continuación, se seleccionó el modelo m5, construido en base a cinco polimorfismos genéticos (*CXCL12* rs2839695, *IL-12A* rs7615589, *KIR3DL1* rs4554639, *TGF-B2* rs5781034 para el receptor y *CD48* rs2295615 para el donante) que proporcionaba un AUC de 0,81401 (IC 95%: 0,71493-0,89020).

En la Figura 29 se muestra la curva ROC construida con el modelo predictivo que emplea 5 y 6 variantes genómicas (m5 y m6).

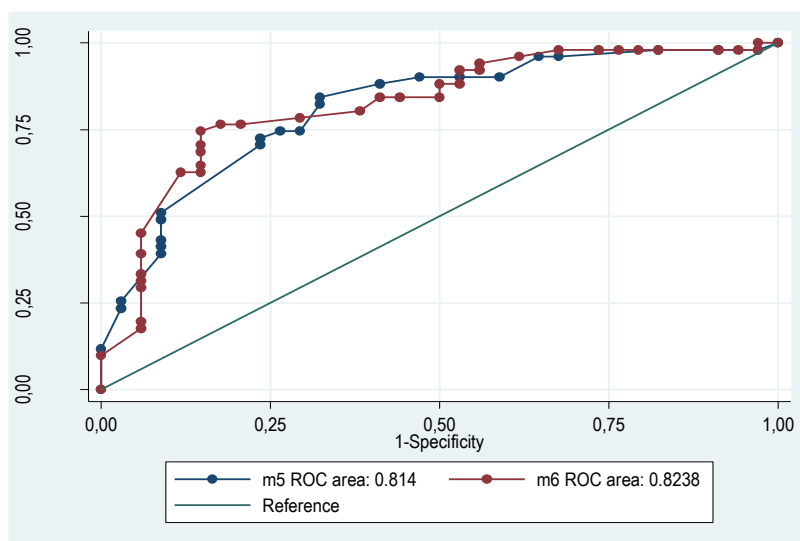


Figura 29. Análisis de la curva ROC para los modelos predictivos m5 y m6.

Para cada uno de los 5 SNPs seleccionados en el modelo m5, se asignó en función del genotipo su correspondiente valor score (0 o 1), OR y coeficiente, tal y como se muestra en la Tabla 24.

Tabla 24. Valor score, OR y coeficiente asignado a cada genotipo para cada uno de los SNPs incluidos en el modelo predictivo seleccionado (m5).

Gen	SNPs	R/ D	Genotipo (Referencia/ Variante)	Valor score	OR	IC 95%	Coeficiente
CXCL12	rs2839695	R	AA	1	3,10	0,97- 9,97	1,132
			GG/GA	0			
IL12A	rs7615589	R	GG	0	2,49	0,84- 7,38	0,914
			AG/AA	1			
KIR3DL1	rs45542639	R	GG	1	3,41	0,98- 1,84	1,228
			AG/AA	0			
TGF-B2	rs5781034	R	CG	0	4,33	1,41- 3,24	1,465
			C-	1			
CD48	rs2295615	D	CC	0	3,13	0,88- 11,15	1,140
			GG/GC	1			

En base a los valores asignados para cada genotipo establecidos en la tabla anterior y empleando modelos de regresión logística múltiple, se diseñó la siguiente ecuación de riesgo:

$$1 / [1 + \text{EXP} (-1,132 * \text{rs}2839695 - 0,914 * \text{rs}7615589 - 1,228 * \text{rs}4554639 - 1,465 * \text{rs}5781034 - 1,14 * \text{rs}229561 + 2,733)]$$

Una vez calculada dicha ecuación, el siguiente objetivo fue establecer el punto de corte óptimo para definir el riesgo de infección por CMV después del trasplante alogénico. El punto de corte óptimo para predecir dicho riesgo, se definió como 0,49, como se indica en la Tabla 25. La sensibilidad y especificidad del modelo predictivo con el *cut-off* de 0,49 fue de 84,3% (IC 95%: 72,0-91,8) y 67,6% (IC 95%: 50,8-80,9), respectivamente. El VPN fue del 74,2% y el VPP del 79,6%.

Tabla 25. Parámetros estadísticos calculados para cada valor punto de corte evaluado.

Punto de corte	Se (%)	Esp (%)	Ef (%)	IY (%)	RV+ (%)	RV- (%)	VPP (%)	VPN (%)
≥ 0,061059	100,0	0,0	60,0	0,0	1,00	,	60,00	,
≥ 0,139523	98,0	2,9	60,0	1	1,01	1,5	60,24	50,00
≥ 0,168986	98,0	8,8	62,4	6,9	1,08	4,50	61,73	75,00
≥ 0,219672	98,0	17,6	65,9	15,7	1,19	9,00	64,10	85,71
≥ 0,334667	96,1	32,4	70,6	28,4	1,42	8,25	68,06	84,62
≥ 0,336445	96,1	35,3	71,8	31,4	1,48	9,00	69,01	85,71
≥ 0,386814	90,2	41,2	70,6	31,4	1,53	4,20	69,70	73,68
≥ 0,409695	90,2	47,1	72,9	37,3	1,70	4,80	71,88	76,19
≥ 0,412432	90,2	52,9	75,3	43,1	1,92	5,40	74,19	78,26
≥ 0,468169	88,2	58,8	76,5	47,1	2,14	5,00	76,27	76,92
≥ 0,490008	84,3	67,6	77,6	52,0	2,61	4,31	79,63	74,19
≥ 0,611336	82,4	67,6	76,5	50,0	2,55	3,83	79,25	71,88
≥ 0,631919	74,5	70,6	72,9	45,1	2,53	2,77	79,17	64,86
≥ 0,633772	74,5	73,5	74,1	48,0	2,81	2,88	80,85	65,79
≥ 0,682846	72,5	76,5	74,1	49,0	3,08	2,79	82,22	65,00
≥ 0,687007	70,6	76,5	72,9	47,1	3,00	2,60	81,82	63,41
≥ 0,705512	51,0	91,2	67,1	42,2	5,78	1,86	89,66	55,36
≥ 0,731965	49,0	91,2	65,9	40,2	5,56	1,79	89,29	54,39
≥ 0,750281	43,1	91,2	62,4	34,3	4,89	1,60	88,00	51,67
≥ 0,842976	41,2	91,2	61,2	32,4	4,67	1,55	87,50	50,82
≥ 0,871945	39,2	91,2	60,0	30,4	4,44	1,50	86,96	50,00
≥ 0,881404	25,5	97,1	54,1	22,5	8,67	1,30	92,86	46,48
≥ 0,882235	23,5	97,1	52,9	20,6	8,00	1,27	92,31	45,83
≥ 0,958746	11,8	100,0	47,1	11,8		1,13	100,00	43,04
> 0,958746	0,0	100,0	40,0	0,0		1,00		40,00

Se: Sensibilidad; Esp: Especificidad; Ef: Eficacia; IY: Índice de Youden; RV: Razón de verosimilitud; VPP: Valor predictivo positivo; VPN: Valor predictivo negativo.

Con el punto de corte elegido (0,49), se clasificaron los pacientes como de bajo riesgo ($<0,49$) o de alto riesgo ($\geq 0,49$) de sufrir infección por CMV tras el alo-TPH.

Sin embargo, en este modelo predictivo pre-trasplante no se incluyeron variables clínicas. Tal y como hemos descrito previamente en nuestros resultados, la EICR aguda grado III-IV constituye el principal factor de riesgo asociado a la infección por CMV en nuestra cohorte. Por esta razón, se incluyó dicha variable clínica para re-estratificar a los pacientes clasificados como de bajo riesgo en base al modelo genético propuesto. Específicamente, cuatro pacientes clasificados como de bajo riesgo en función del score genético previo al trasplante propuesto ($<0,49$) sufrieron EICR grado III-IV y fueron re-estratificados como de alto riesgo.

Por último, en función del valor score obtenido con la ecuación descrita y la variable clínica EICR grado III-IV, se calculó el riesgo de infección por CMV para cada uno de los 85 pacientes incluidos en este bloque de estudio. De los 85 participantes, 58 (68,2%) fueron clasificados como de alto riesgo y 27 (31,8%) como de bajo riesgo. A los 100 días después del alo-TPH, el 70,7% de los pacientes con una puntuación de alto riesgo ($\geq 0,49$ o EICR grado III-IV) experimentaron infección por CMV en comparación con el 14,8% de aquellos con una puntuación de bajo riesgo, como se muestra en la Figura 30.

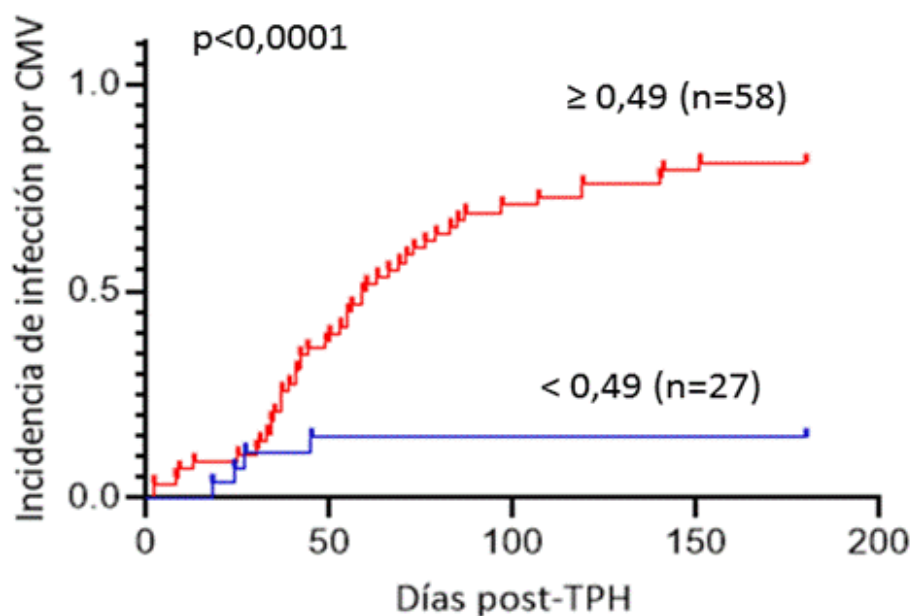


Figura 30. Análisis de los 85 pacientes estratificados en función del riesgo de infección de CMV. Para el cálculo de riesgo se ha empleado el punto de corte de 0,49.

En resumen, el modelo predictivo de estratificación de riesgo de infección por CMV post-TPH propuesto permite estratificar correctamente a los pacientes de acuerdo al riesgo de desarrollo de infección por CMV post-trasplante ($p < 0,0001$).

3.4 Elaboración de un score de riesgo genético para predecir múltiples episodios de infección por CMV después del alo-TPH

Con el objetivo de construir un score genético de predicción de múltiples episodios de infección por CMV después del trasplante alogénico, se construyeron modelos predictivos con los SNPs de *IL-6* identificados en el análisis previo (rs2069832, rs1800795, rs7802307, rs1474347, rs1554606, rs2069845). Los filtros utilizados fueron similares a los del modelo predictivo descrito anteriormente. Los polimorfismos genéticos incluidos y el AUC se indican en la Tabla 26.

Tabla 26. Resumen de los SNPs seleccionados para cada modelo elaborado para identificar pacientes que sufran más de dos episodios de infección de CMV después del alo-TPH.

Modelo	Polimorfismos IL6	AUC
m1	rs1554606 (R)	0,6357
m2	rs2243606 (R) rs2069845 (R)	0,6690

En la Figura 31, se muestra la curva ROC construida de las variantes genómicas analizadas (m1 y m2).

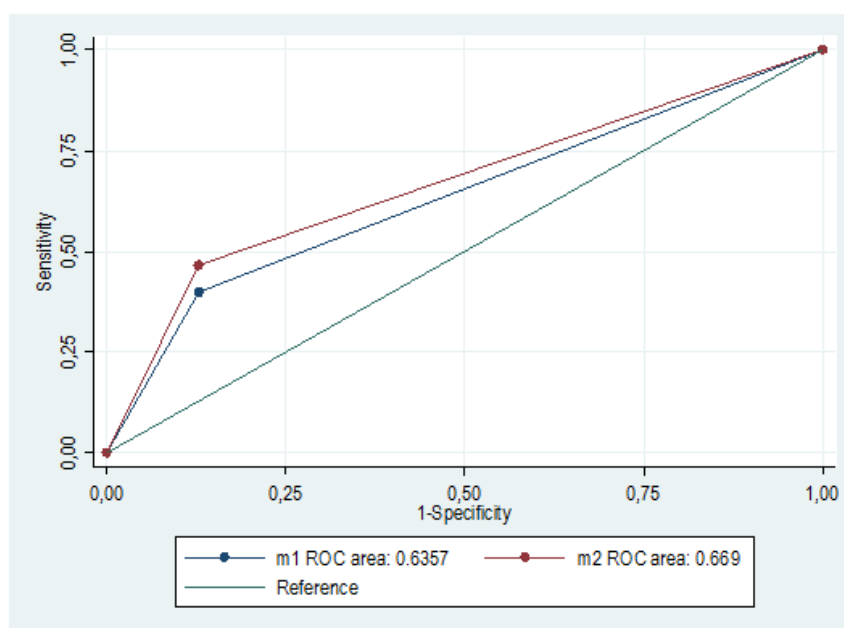


Figura 31. Análisis de la curva ROC para los modelos predictivos m1 y m2.

A continuación, se seleccionó el polimorfismo rs1554606 en *IL6* (m1) para clasificar a los pacientes de acuerdo con la frecuencia de los episodios de CMV después del trasplante; AUC: 0,6357 (Figura 31). Con el análisis pre-TPH de este polimorfismo, un 81,2% de los pacientes (69/85) con la variante alélica (GG/TG) experimentaron ≤ 2 episodios, en comparación con 18,8% de los pacientes (16/85) con el genotipo TT que sufrieron >2 episodios. Por tanto y tal como se muestra en la Figura 32, este polimorfismo fue capaz de estratificar correctamente a los pacientes que sufrirán más de dos episodios de CMV después de alo-TPH ($p < 0,001$).

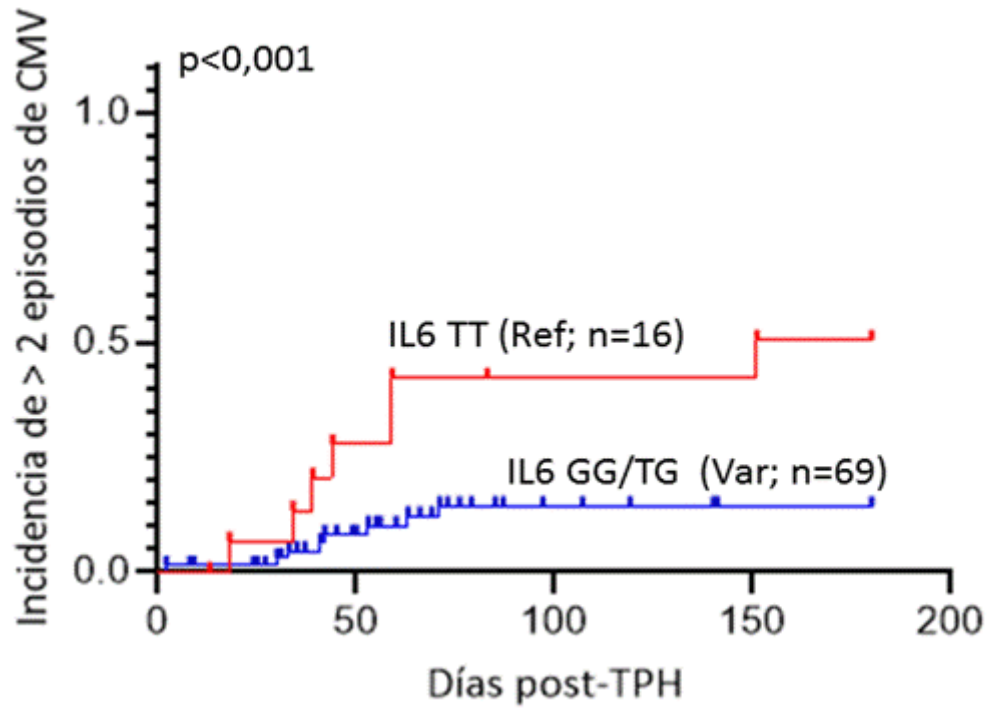


Figura 32. Riesgo de infección por CMV con una frecuencia superior a 2 episodios calculado de acuerdo al genotipo de *IL-6* rs1554606 en el receptor.

DISCUSIÓN

1. Bloque I

Tras un alo-TPH, la mayor parte de las complicaciones clínicas que se generan en el paciente se relacionan con los problemas inmunológicos derivados del aloinjerto o con la lesión tisular producida por los tratamientos empleados: quimioterapia, irradiación, y fármacos para la prevención y/o control de EICR. Desde que termina la fase de neutropenia tras el trasplante hasta aproximadamente el día +100, la aparición de EICR es el principal factor que provoca un retraso en la recuperación inmunológica, favoreciendo directamente la aparición de episodios de infecciones víricas. La EICR consiste en un grupo de manifestaciones clínicas e histológicas que aparecen como consecuencia de la reacción inflamatoria secundaria al reconocimiento y destrucción de autoantígenos en el receptor a cargo de los LT del donante (27). Por ello y debido al riesgo intrínseco que conlleva para el paciente esta complicación, una de las principales finalidades del tratamiento terapéutico administrado durante este periodo es evitar la aparición de las formas de presentación aguda de EICR, que son a su vez el principal factor de riesgo asociado al desarrollo posterior de EICR crónica.

Un factor clave para la prevención de la aparición de la EICR, es la profilaxis empleada después del trasplante. La pauta clásica de profilaxis consiste en la combinación de un inhibidor de calcineurina como CsA o TAC, cuya administración se mantiene varios meses tras el TPH y una pauta corta de MTX (30). Sin embargo, a pesar de que con dichos tratamientos se pretende evitar durante el periodo post-TPH la aparición de la EICR, no se consigue limitar que simultáneamente a la administración de estos fármacos, se produzcan las principales complicaciones infecciosas de origen vírico, causadas fundamentalmente por virus de la familia *Herpesviridae* como CMV o VEB.

Por lo tanto, al igual que la propia EICR, estos tratamientos y también la presencia de estos virus y otros microorganismos podrían modular el sistema inmunológico del paciente. Por ello, el objetivo de este Bloque I de estudio fue conocer mediante ensayos *in vitro* con células de donantes sanos como este microambiente farmacológico y/o patogénico puede condicionar el comportamiento *in vitro* de las subpoblaciones inmunitarias. Los ensayos experimentales de este bloque de estudio fueron realizados con los fármacos CsA y MTX que como ya hemos comentado previamente son utilizados en profilaxis tras el alo-TPH para evitar la aparición de EICR. Con el fin de simular también *in vitro* el microambiente causado por una infección oportunista, se

emplearon antígenos de CMV o VEB para inducir una activación antígeno-específica. Concretamente, se emplearon un conjunto de péptidos que cubren la secuencia completa de la proteína pp65 de CMV y de la proteína EBNA-1 de VEB. Ambas proteínas son capaces de generar en el ser humano una respuesta inmunodominante (LT CD4+ y CD8+) que es dirigida específicamente contra CMV y VEB.

En primer lugar, se analizó el efecto del tratamiento profiláctico anti-EICR sobre las diferentes subpoblaciones inmunológicas analizadas. El papel fundamental de la CsA es la inhibición de la síntesis de IL-2 evitando la activación de los LT CD8+ y, como consecuencia, disminuyendo la reacción inmunológica responsable del rechazo. En la misma línea, Widmann y col. demostraron de forma más específica que el tratamiento con CsA produce también la reducción significativa de la producción de IFN- γ , IL-2 y TNF- α por parte de LT CD8+ específicos de CMV, mostrando una reducción funcional dosis-dependiente relacionada con un mayor riesgo de infección por CMV después del alo-TPH (121, 189). Sin embargo, tal y como describieron Strauss y col. este fármaco no era capaz de bloquear la proliferación de LT específicos de antígeno ni de inducir su apoptosis (123). Por su parte, MTX, un antagonista del ácido fólico que tiene capacidad citotóxica a altas dosis, es capaz de producir un efecto inmunomodulador atenuando la funcionalidad de los LT. Sathe y col. observaron que MTX, a la misma dosis que la empleada en nuestro ensayo, inhibía la proliferación de la subpoblación de LT aloreactivos, manteniendo intacta su capacidad de respuesta a antígenos virales como CMV (190). En consonancia a Sathe y col. nuestros resultados mostraron, en células procedentes de sujetos sanos, que la combinación de CsA y MTX a dosis terapéuticas no disminuye el valor absoluto de los LT tras el cultivo ni bloquea su capacidad proliferativa tras la activación viral. Sin embargo, es necesario un análisis más exhaustivo en el futuro de cómo la capacidad efectora frente a virus de la subpoblación T podría verse afectada por la presencia simultánea de ambos fármacos.

Por su parte, las células NK son potentes efectores de la inmunidad innata ya que ejercen una citotoxicidad directa sobre sus células diana sin sensibilización previa, por lo que el análisis de la modulación que ejercen este tipo de fármacos sobre esta subpoblación es prioritario en el contexto de una infección viral post-TPH. Los resultados descritos por Wang y col. y Ohata y col. mostraron como la presencia de CsA y MTX en el medio de cultivo condicionaba la función, el fenotipo y la proliferación de las células NK en individuos sanos (124, 125). En línea con estas afirmaciones, nuestros

hallazgos revelaron que la presencia de CsA y MTX a dosis terapéuticas reducía de manera significativa la frecuencia de células NK CD56^{dim}. Por el contrario, las mDC no mostraron perjuicio alguno. Nuestros datos complementan a los observados por Matsue y col. quienes demostraron que la exposición a CsA reducía la expresión en esta subpoblación de células presentadoras de antígeno de los marcadores de activación CD86 y CD40, bloqueando con ello la transducción de señales entre la DC y el LT (191). Esta subpoblación tiene un papel esencial en la iniciación y regulación de la respuesta inmunitaria, ya que son elementos claves para que se inicie una respuesta de LT dirigida específicamente contra el antígeno.

En el contexto clínico que se sitúa este estudio, la aparición del hongo AF constituye la causa más frecuente de IFI, con una incidencia después del alo-TPH del 5-15% y una tasa de mortalidad cercana al 90% (129). La GT es la micotoxina que mayoritariamente producen las cepas de AF. Diferentes autores han demostrado mediante ensayos *in vitro* como la síntesis de GT afecta a la virulencia de AF ya que media la supresión de la respuesta inmune innata y adaptativa del sujeto. Específicamente, estos estudios han descrito como la GT afecta a la funcionalidad de la subpoblación de neutrófilos y de macrófagos, concretamente a la fagocitosis, la degranulación y la actividad mieloperoxidasa (132, 192-194). Stanzani y col. observaron que la GT inducía la muerte celular de la subpoblación de monocitos y de células T, mostrando un aumento tiempo-dependiente de la frecuencia de las subpoblaciones que expresaban caspasa-3. Además, demostraron que, tras exponer subpoblaciones de LT CD4⁺ y CD8⁺ memoria específicos de CMV a diferentes concentraciones de GT (0-500ng/mL), existía una disminución de la funcionalidad de estas subpoblaciones valorada en términos de expresión de IFN- γ , TNF- α y CD69 (134). Los estudios de Johannessen y col. y Wichmann y col. complementaron el estudio de Stanzani y col. demostrando que la presencia de GT en el medio de cultivo se correlacionaba con una fuerte reducción de la producción de citoquinas (TNF- α , IL-12 e IFN- γ) por parte de los LT y con ello una inhibición del perfil Th1, lo cual generaba una menor protección frente al AF (135, 136).

Nuestros resultados de acuerdo con los de Stanzani y col. demostraron mediante ensayos *in vitro* que, en primer lugar, la presencia de GT disminuía el valor absoluto de LT, tanto CD4⁺ como CD8⁺; y en segundo lugar, que tras exponer CMN a diferentes dosis de GT y teñirlas con Anexina V y IP el mecanismo que mediaba la disminución

del valor numérico de LT era apoptótico dosis-dependiente (162). Entre las concentraciones testadas en nuestro ensayo, se demostró que el índice apoptótico de la concentración de GT (400ng/mL) que es encontrada en el suero de pacientes con AI era del $25,34 \pm 12,66\%$. En este sentido, Pardo y col. describieron como GT inducía la apoptosis de fibroblastos embrionarios de ratón mediante la activación directa de Bak, molécula proapoptótica perteneciente a la familia Bcl-2. Tras activarse Bak, se desencadena en la célula la liberación de factores apoptogénicos mitocondriales, principalmente citocromo C. La liberación del citocromo C es dependiente de la dosis de GT empleada (10-50 μM). Como consecuencia de ello, el citocromo C, una vez en el citosol, activa directamente a la caspasa-9, que a su vez activa a caspasas efectoras como la caspasa-3 llevando a la apoptosis celular (141, 195).

En un contexto clínico en el que tras el alo-TPH la posibilidad de la coexistencia de una infección vírica y fúngica es un hecho probado, otro de los objetivos de este bloque de estudio fue demostrar en células sanas cómo la función inmunosupresora de la GT podía ser condicionada por la presencia en el entorno de antígenos virales. Nuestros resultados mostraron que el efecto perjudicial de la GT observado sobre el compartimento CD4+ estaba condicionado por el tipo de virus que estaba presente en el ensayo. Concretamente, los resultados encontrados al exponer las células a esta micotoxina en presencia de CMV fueron más potentes que cuando las células eran expuestas a GT y VEB. Estos datos están en consonancia con los encontrados por Zallio y col. quienes demuestran que en un contexto post-TPH, a diferencia del VEB, el CMV es capaz de modular una respuesta inmunológica (196). A diferencia de lo que sucede con el CMV, estos son los primeros datos que existen en la literatura sobre cómo los LT son modulados por la micotoxina fúngica tras activarlos con VEB. Nuestros ensayos por lo tanto corroboran, que la función inmunomoduladora de la GT sobre la subpoblación CD4+ está condicionada si hay un virus presente.

Además del efecto de la GT sobre la frecuencia de las subpoblaciones inmunológicas, se estudió el potencial anti-proliferativo de la GT sobre los LT también en presencia de ambos virus (CMV y VEB). A diferencia de la respuesta celular obtenida en los ensayos previos, esta micotoxina indujo una reducción similar de la proliferación tanto en la subpoblación de LT CD4+ como en la CD8+, aun estando expuestos a VEB. Este hecho hace pensar que la disminución observada en los valores absolutos de LT en los ensayos previos, fue debida no sólo a la inducción de apoptosis sino a una inhibición de la

proliferación celular. Sin embargo, a diferencia del efecto anti-proliferativo, el efecto apoptótico era más potente sobre la subpoblación CD4⁺ cuando el CMV estaba presente.

Respecto a otros componentes del sistema inmunológico, se desconocen en gran medida los efectos de la GT sobre las subpoblaciones de células NK y mDC. Como ya ha sido comentado previamente, cuando en pacientes sometidos a alo-TPH la inmunidad linfocitaria T está ausente, estas subpoblaciones pertenecientes a la inmunidad innata desempeñan un papel significativo en la defensa contra las infecciones virales (197). Estudios recientes han demostrado *in vitro* la capacidad de las células NK para reconocer y responder al AF. Schmidt y col. demostraron que los niveles de IFN- γ y GM-CSF producidos por las células NK pre-estimuladas con IL-2 se reducían significativamente cuando éstas eran incubadas con AF. Este estudio también demostró en sus ensayos con los colorantes XTT e IP, el efecto inmunosupresor que causaba el AF sobre la subpoblación de NK, inhibiendo la proliferación, citotoxicidad y viabilidad de estas células (198). Aportando nuevos datos a los estudios previos, nuestros resultados mostraron como la GT reducía la frecuencia de células NK CD56^{dim}, sugiriendo que la presencia de esta micotoxina podría ser la responsable del efecto inmunosupresor causado por AF en los ensayos realizados por Schmidt y col.

Respecto a las mDC, Kupfahl y col. describieron que la GT causa una reducción de la producción de citoquinas (TNF- α e IL-12) en esta subpoblación, limitando su capacidad de presentar los antígenos de forma óptima a los LT (142). Sin embargo, en nuestros ensayos no se observó una disminución de la frecuencia y por consiguiente ningún evento relacionado con la inducción de un efecto apoptótico. Nuestros resultados complementan los obtenidos por Kupfahl y col. ya que al no existir una disminución de la frecuencia de las mDC lleva a pensar que la GT induce una disfuncionalidad de esta subpoblación tal y como observaron Kupfahl y col. más que una inducción de la apoptosis. La presencia de CMV o VEB no modificó el comportamiento de esta subpoblación celular en presencia de esta micotoxina.

Habitualmente, los episodios de AI ocurren en los primeros 100 días después del alo-TPH. Dicho periodo coincide con la ventana temporal en la que el paciente recibe profilaxis farmacológica anti-EICR y tiene un alto riesgo de desarrollar infecciones víricas. Hasta el momento, se han publicado resultados contradictorios sobre el papel que ejercen los fármacos inmunosupresores sobre la actividad patogénica de la GT. En

este sentido, en ratones inmunocomprometidos con CY y corticosteroides, Kupfahl y col. no observaron diferencias de virulencia entre las cepas de AF productoras de GT y las deficitarias de esta micotoxina (199). Resultados opuestos fueron descritos por Sugui y col. y Spikes y col. quienes observan que en ratones inmunodeprimidos solo con hidrocortisona, las cepas de AF deficientes en GT muestran una virulencia atenuada (137, 200). Dicho hallazgo fue justificado por estos autores, al considerar que Kupfahl y col. testaron un régimen inmunosupresor excesivamente potente, que no permitía evaluar correctamente la virulencia de la GT. Sin embargo, todos los autores concluyeron que el régimen específico de inmunosupresión tenía un papel importante en la regulación del potencial patogénico de la GT. Actualmente, no hay estudios *in vitro* que hayan identificado como la inmunosupresión profiláctica frente a EICR puede regular la patogenicidad de la micotoxina. Nuestros hallazgos no solo han establecido una relación entre los fármacos inmunosupresores y la GT sino que han descrito como la presencia de GT potencia el efecto inmunosupresor de los tratamientos profilácticos frente a EICR incluso después de que las células hayan sido expuestas a los antígenos virales. De nuevo, fueron las subpoblaciones celulares NK CD56^{dim} y LT las principalmente afectadas en nuestro ensayo tras exponerlas a GT, CsA y MTX. Además, pudimos observar, que la combinación de GT con CsA y MTX producía una reducción significativa de la proliferación de los LT tras el estímulo antigénico.

Hasta la fecha, este es el primer estudio que realiza una evaluación *in vitro* del efecto que tiene la GT sobre subpoblaciones inmunológicas del ser humano que han entrado en contacto con antígenos de CMV o VEB y han estado expuestas a los fármacos que habitualmente se usan como profilaxis para EICR. Nuestros datos indicaron que la frecuencia de células NK CD56^{dim} y de LT, así como la capacidad proliferativa de estos últimos, se vio notablemente disminuida por la presencia de la micotoxina GT y de los fármacos anti-EICR. Además, habiendo estado todas las células sometidas al mismo microambiente experimental, este efecto inhibitorio fue significativamente más potente sobre LT que sobre células NK CD56^{dim}.

Una vez demostrado especialmente sobre la subpoblación de LT el efecto deletéreo de la combinación de la farmacología profiláctica dirigida al tratamiento de la EICR y la presencia de GT, el siguiente paso fue definir el tipo de interacción establecida entre los agentes farmacológicos y la micotoxina. En 1996, Pahl y col. describieron por primera vez el mecanismo de acción por el cual la GT ejerce su efecto inmunosupresor sobre

células Jurkat, línea celular inmortalizada de LT. En dicho trabajo, se describió como la GT inhibe la activación de estas células a través de la interrupción de la vía NF- κ B, provocando con ello la apoptosis celular (139, 140). Con el objetivo de definir los mecanismos moleculares que explicarían el tipo de interacción establecida entre los fármacos y la GT, se analizó esta vía de señalización empleando una matriz de proteínas diseñada específicamente para el estudio de dicha ruta molecular.

En condiciones fisiológicas, la ruta clásica de activación de la vía NF- κ B se produce a través de receptores específicos: receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), receptor de interleuquina 1 (IL-1R), TLR, receptor de células B, el TCR y el CD40, entre otros. El factor de transcripción NF- κ B del cual proviene el nombre de la vía, se encuentra habitualmente en forma inactiva en el citoplasma unido en forma de heterodímero p50-p65, también denominado NF- κ B1-RelA, a proteínas inhibitoras (I κ B). Existen múltiples mediadores que inducen la activación de esta vía, destacando los siguientes: citoquinas inflamatorias (IL-1, TNF- α , etc.) o agentes infecciosos como lipopolisacárido bacteriano o antígenos virales. Todas estas cascadas de señalización que se desencadenan tras la activación de los diferentes receptores a través de sus mediadores convergen en la fosforilación, ubiquitinación y degradación por el proteosoma de las proteínas inhibitoras I κ B, permitiendo así la liberación del heterodímero p50-p65 que se transloca al núcleo donde regula varios procesos fisiológicos mediante el control transcripcional de diferentes genes. Un ejemplo de éstos son los genes anti-apoptóticos, más concretamente los miembros de la familia Bcl-2 (201).

En el estudio previamente comentado realizado por Pahl y col. se describió como la GT inhibe específicamente la activación de la vía NF- κ B a diferentes niveles, destacando la inhibición de la degradación de I κ B α así como la inhibición de la expresión de genes dependientes de la vía, como ICAM-1 (139, 140). En 2015, Sakamoto y col. ampliaron el conocimiento del mecanismo de acción de esta micotoxina. Específicamente, describieron en células Jurkat como la GT inhibe la translocación del heterodímero p50-p65 al núcleo, como consecuencia de la inhibición de la fosforilación y la degradación de I κ B α . Mediante este mecanismo, se impide la activación de la cascada de señalización, provocando que no se transcriban los genes anti-apoptóticos y la célula entre en apoptosis (140). En la línea de estos resultados, nuestros hallazgos revelaron sobre la subpoblación de LT como la presencia de la proteína fúngica GT reducía

significativamente los niveles de seis proteínas que participan en la vía de señalización NF- κ B. Más concretamente, la presencia de la micotoxina regulaba negativamente la disponibilidad en la membrana del IL1-R1, y de las proteínas intracelulares I κ B α e I κ B ϵ así como otras moléculas co-estimuladoras de la vía como Metadherin/AEG-1 y BCL10. Además, también se demostraba una disminución de la expresión de la proteína STING, que además de ser una molécula mediadora de la activación de la vía NF- κ B, induce la producción de IFN-I, generando en las células una potente respuesta antiviral (202). En conjunto, estos datos explican como la inhibición de la activación de la vía NF- κ B es el mecanismo celular responsable de la susceptibilidad que tienen las células T de sufrir apoptosis tras ser expuestas a la GT (141, 142).

Respecto a los fármacos testados, estudios previos describieron como CsA y MTX emplean como “target” la misma vía de transcripción que la GT. Du y col. demostraron que la CsA inhibía fuertemente la activación de IL-2R y NF- κ B en las células T (203). Majumdar y col. formularon la hipótesis de que el MTX también suprimía la activación de la misma vía (204). Específicamente, la regulación negativa de NF- κ B por el MTX basaba su acción en la inhibición de la degradación de I κ B α mientras que CsA y TAC se relacionaron con una inhibición específica de la subunidad p65, que forma parte del heterodímero p50-p65 (203-206). En línea con los resultados de los ensayos celulares anteriormente descritos, donde describimos como la presencia de CsA y MTX no afectaba ni a la frecuencia de la subpoblación de LT ni a su capacidad proliferativa, este ensayo mostró que las proteínas de esta vía de señalización no se veían afectadas por estos fármacos. Estos datos, por lo tanto, contrarrestan los descritos por Du y col. y Majumdar y col, quienes a diferencia de nuestros ensayos en el que empleamos células de donantes sanos, analizaron la inhibición de la vía NF- κ B en diferentes líneas celulares tanto humanas (T-Jurkat, HeLa and U937) como de origen animal, previamente activadas con TNF- α e IL-1 β . Además, en el estudio realizado por Du y col. se testaron concentraciones de CsA (1-20 μ g/mL) superiores a las encontradas en pacientes sometidos a alo-TPH.

Cuando los fármacos y la micotoxina fueron testadas de manera combinada sobre el array de proteínas, nuestros resultados demostraron una regulación negativa de 26 proteínas en la vía de señalización NF- κ B pero únicamente en los LT. Dichos datos revelaron que el efecto observado tanto en los experimentos previos donde las células fueron expuestas de manera combinada a la GT y los fármacos profilácticos como los

provenientes de este último ensayo, son debidos al efecto sinérgico generado entre ambos tipos de agentes. Por definición, se habla de efecto sinérgico cuando, la acción conjunta de dos o más elementos genera un efecto significativamente mayor que aquel que podría haberse alcanzado con la suma de sus efectos individuales. En nuestros resultados observamos que, a diferencia de los agentes profilácticos o la GT por sí sola, en los que ninguna o sólo seis proteínas de la vía de señalización NF- κ B estaban reguladas negativamente, la exposición combinada a ambos factores reguló significativamente a la baja 26 proteínas de esta vía molecular.

Concretamente, la inhibición de la vía NF- κ B en presencia de CsA, MTX y GT fue realizada a diferentes niveles de la cascada de señalización. En primer lugar, a nivel de membrana varios receptores responsables de la activación de la vía se vieron regulados negativamente junto con sus moléculas de señalización intracelular: TNFR-1A, TNFR-1B, complejo IL1 asociado a las proteínas IRAK1, MYD88, IRF5 e IRF8 y receptores como IL-17RA, IL-18R1, TLR-2, que han demostrado ser cruciales para activar la vía canónica NF- κ B. En segundo lugar y ya a nivel intracelular, tras el análisis de nuestros datos también observamos que el heterodímero p50-p65 estaría regulado negativamente así como otras moléculas co-estimuladoras de la vía: ASC, cIAP1/BIRC2 y Metadherin/AEG-1. En tercer lugar, el tratamiento administrado con GT, CsA y MTX sobre la subpoblación de LT suprimió de manera sinérgica la expresión de proteínas que participan en diferentes vías de señalización que están a su vez relacionadas con la vía NF- κ B: p53 (molécula pro-apoptótica), STAT1 y STAT2 (vía JAK-STAT) y la proteína STING. Por lo tanto, el efecto concomitante de la administración de fármacos anti-EICR y GT, causó una regulación negativa importante de la vía de señalización NF- κ B que incluso incluyó a cuatro proteínas fosforiladas (p65-pS529, STAT1-pY701, STAT2-pY689, p53-pS46). En la Figura 33 se representan las principales proteínas influenciadas por la presencia combinada de CsA, MTX y GT.

Aunque la vía NF- κ B está bien caracterizada en la subpoblación de LT (207), hay pocos datos sobre el empleo de esta vía por parte de las células NK. Mami-Chouaib y col. describieron que la célula NK no emplea la inhibición de la vía NF- κ B como mecanismo de acción para controlar su respuesta citotóxica (207, 208). Esta afirmación explicaría, por un lado, que al analizar la subpoblación de células NK ninguna proteína se vio influenciada por la presencia de los tratamientos y; por otro lado, que la combinación simultánea de los fármacos profilácticos anti-EICR y la GT fue

significativamente más potente inhibiendo a las células T en comparación con las células NK CD56^{dim}. Sin embargo, la presencia de GT en el medio celular sí había conllevado una disminución de la frecuencia de esta subpoblación. Ello fue probablemente debido a que la GT usa otras vías de señalización molecular para regular la funcionalidad de las células NK y que, por lo tanto, deben ser en el futuro estudiadas.

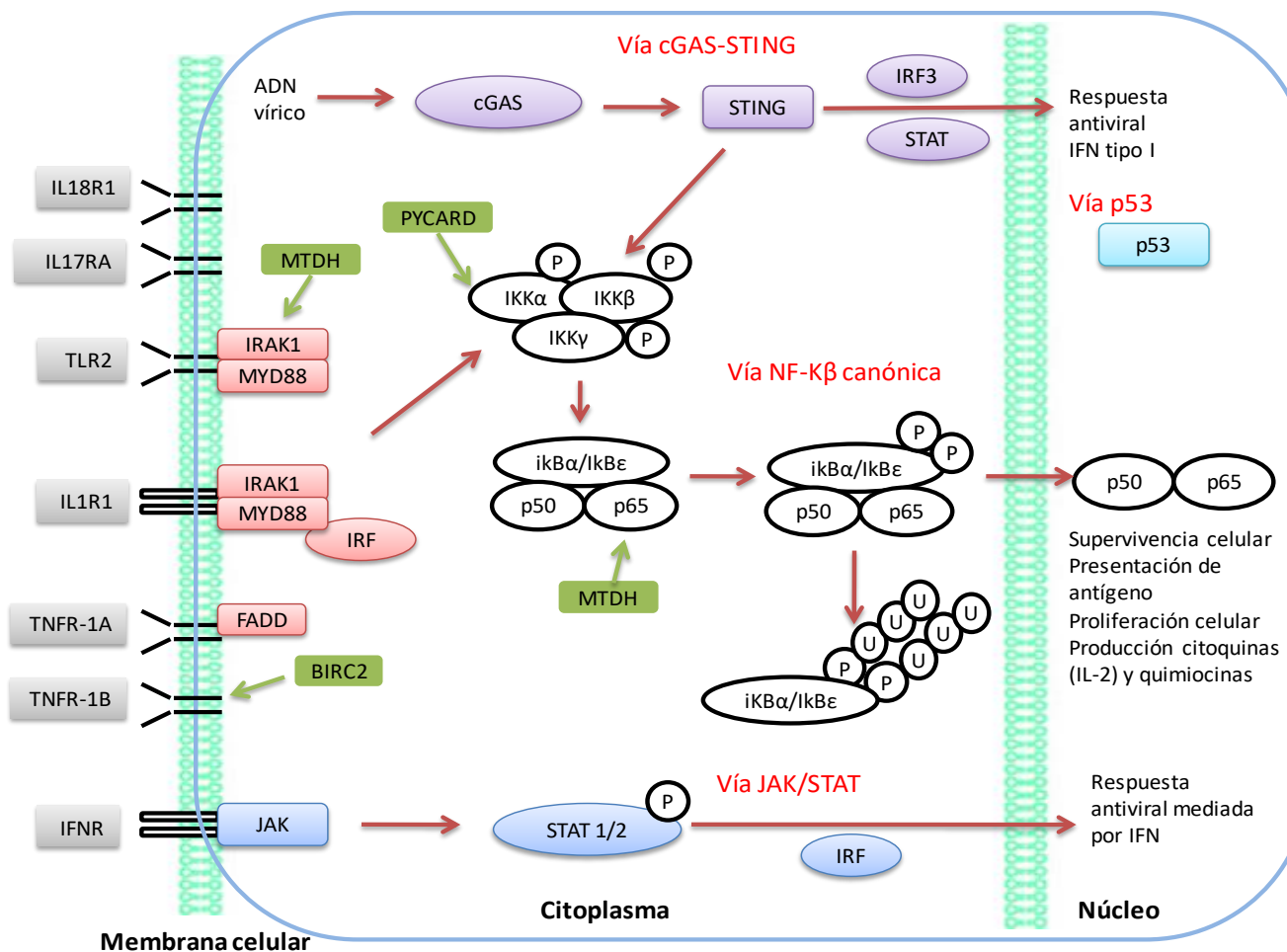


Figura 33. Principales proteínas de la vía NF-κB y otras vías relacionadas influenciadas por las condiciones experimentales estudiadas.

Los hallazgos de este Bloque I de estudio definieron como los fármacos profilácticos frente a EICR y la GT son elementos reguladores de la respuesta inmunitaria. Más concretamente, hemos descrito que tras exponer células sanas a GT y a los fármacos utilizados como profilaxis para la EICR se desencadena un mecanismo de acción sinérgico sobre los LT que induce la inhibición de su proliferación celular y la apoptosis. Este mecanismo molecular se fundamenta en la supresión de la vía de señalización NF- κ B a través de la inhibición de múltiples proteínas asociadas. Por lo tanto, la producción de GT por parte de AF constituye un novedoso mecanismo inmunosupresor capaz de inhibir la respuesta inmunológica y ser condicionado por la presencia de herpesvirus.

2. Bloque II

Durante las dos últimas décadas se ha puesto de manifiesto que el desarrollo de inmunidad específica frente al CMV desempeña un papel crucial en el control de este virus y, por tanto, su monitorización después del alo-TPH está demostrando la capacidad de predecir qué pacientes tienen más riesgo de desarrollar infección/enfermedad por CMV. En este contexto, el reciente desarrollo de tecnologías que permiten la monitorización de la respuesta de LT CD4+ y CD8+ específicos de virus ha permitido conocer los valores numéricos asociados a una respuesta protectora en los pacientes sometidos a alo-TPH (97, 111, 112, 209). Sin embargo, no se ha establecido un valor umbral que pueda ser utilizado de manera estandarizada en la práctica clínica. Además, no están aún definidos los parámetros biológicos y/o clínicos que condicionan la susceptibilidad de sufrir una mayor tasa de infecciones víricas o la capacidad del organismo de aclarar el virus sin necesidad de tratamientos anti-virales complementarios durante el periodo post-TPH. En este contexto, el objetivo de este segundo bloque fue en pacientes que reciben un alo-TPH, caracterizar el estado funcional del sistema inmunológico que protegería a los pacientes frente a una infección por CMV, VEB o AdV así como los principales parámetros que lo modularían. Para ello, se han tenido en cuenta las conclusiones alcanzadas en el primer bloque de estudio.

La infección viral más predominante en nuestra cohorte fue causada por el CMV, presente en casi la mitad de los pacientes sometidos a alo-TPH. Estos datos están en concordancia con los publicados por otros autores como Fayard y col. siendo el virus más frecuentemente asociado a infección tras este tipo de procedimiento terapéutico (210). Respecto a los factores de riesgo asociados a dicha infección, el estado serológico D-/R+ y la aparición de EICR aguda y/o crónica constituyen los principales factores de riesgo (38, 187). En nuestra cohorte, mientras que el estado serológico sí constituyó un factor de riesgo clínico asociado al virus, el desarrollo de EICR no tuvo un efecto sobre el riesgo de infección por CMV, debido previsiblemente al bajo tamaño muestral y a la heterogeneidad de los pacientes incluidos.

En relación a otras infecciones víricas, se detectaron únicamente dos pacientes que sufrieron episodios de reactivación de VEB en el periodo post-TPH, mostrando una incidencia similar a otros autores (211). Estos dos pacientes coincidieron con los que presentaron un mayor número de episodios de infección por CMV. En consonancia con

esta afirmación, Aalto y col. y Zallio y col. estudiaron la relación entre ambos virus, mostrando como la aparición de una infección por CMV induce la proliferación del VEB siendo, a su vez, el principal factor de riesgo asociado a infección por VEB tras el alo-TPH (196, 212). Paralelamente, tres pacientes sufrieron cistitis hemorrágica como consecuencia de infección por virus BK. Sobre las infecciones causadas por este virus se ha publicado recientemente un aumento de su incidencia tras la introducción del trasplante haploidéntico en la práctica clínica (18). Por último, únicamente un paciente sufrió infección por AdV, coincidiendo su baja incidencia con la notificada por estudios previos (213).

La infección por CMV después del alo-TPH provoca cambios dinámicos en la reconstitución de las subpoblaciones de células NK y LT CD8+

Tal y como ha sido descrito anteriormente por otros autores, el retraso en la reconstitución inmunológica después del alo-TPH influye directamente en la aparición de complicaciones víricas después del alo-TPH (214, 215). Debido a que la reconstitución del repertorio de LT comienza meses después del alo-TPH, la rápida expansión de otras subpoblaciones celulares como las células NK y las mDC, tiene un importante papel en el desarrollo de infecciones en el período temprano después del alo-TPH. Habitualmente, la reconstitución de la subpoblación de células NK tiene lugar en el primer mes post-TPH. Kheav y col. han descrito en 439 pacientes sometidos a alo-TPH como, la existencia de una menor concentración de células NK CD56^{dim} a los 3 meses del alo-TPH, se relacionaba con una mayor incidencia de infecciones por CMV (72). De acuerdo con esta afirmación y con los resultados descritos también por Minculescu y col. (74) en nuestra cohorte encontramos recuentos inferiores de células NK en pacientes que sufrieron infecciones virales post-TPH, específicamente por CMV, VEB y virus BK.

Nuestros hallazgos han encontrado mayores concentraciones de células NK, tanto de las subpoblaciones NK CD56^{dim} como NK CD56^{bright} en aquellos sujetos que experimentaron un único episodio vírico respecto a los pacientes que sufrieron varios episodios de reactivación de CMV. Esta afirmación está en la línea de los resultados mostrados recientemente por Jin F y col. apoyando la hipótesis de que la aparición de un episodio de infección por CMV modula la expansión de la subpoblación de células NK, específicamente CD56^{dim}, lo que contribuye al control de la infección y a frenar la aparición de recurrencia en los pacientes después del alo-TPH (216, 217). En este

mismo trabajo, se ha resaltado como la infección por CMV es responsable también de la modulación del repertorio KIR de estas células NK. Este hallazgo fue avalado por Béziat y col., que confirman que las células NK responden a la infección por CMV aumentando la expresión de sus receptores KIR (218). De acuerdo con el análisis del repertorio KIR, nuestros datos han revelado un aumento de la expresión del receptor KIR2DS4 en pacientes con recurrencia de CMV en todos los días monitorizados. Específicamente, altos niveles de expresión de KIR2DS2 y KIR2DS4 se han asociado por Gallez-Hawkins y col. con un riesgo siete veces aumentado de infección por CMV después del alo-TPH (116). Estos autores muestran que, a pesar de que factores como la fuente de PH o la aparición de EICR influye en la expresión de receptores KIR después del alo-TPH, es la infección por CMV el mayor estímulo para la expresión de estos receptores activadores de la célula NK.

Respecto a la subpoblación de mDC, Wikstrom y col. demostraron que el desarrollo de EICR induce un defecto funcional en la DC que conduce a un fracaso en la generación de LT específicos de CMV funcionales (117). Este mismo estudio concluyó que la reconstitución de DC favorece una mejor generación de una respuesta inmunológica frente al virus lo que va en consonancia con nuestros resultados, en los que describimos que los pacientes con infección por CMV mostraron una menor concentración de mDC en el período pos-TPH. Sin embargo, el desarrollo de EICR no tuvo un efecto significativo sobre la reconstitución de esta subpoblación, debido previsiblemente al bajo tamaño muestral.

La monitorización de la funcionalidad de LT CD4+ y CD8+ permite identificar marcadores celulares pronósticos que definen el riesgo de infección por CMV

Respecto a la reconstitución de la subpoblaciones de LT, de acuerdo con Suessmuth y col. (96), nuestros resultados han descrito como los pacientes con infección por CMV desarrollan una expansión de la subpoblación de LT CD8+ después del alo-TPH que se mantiene posterior a la infusión de PH. Existe, por tanto, una relación bidireccional entre la reconstitución de LT CD8+ y la viremia (68). Por un lado, aquellos pacientes con peor reconstitución de esta subpoblación tanto en términos de recuentos totales como en funcionalidad van a tener más probabilidades de desarrollar infección por CMV. Por otro lado, esta infección vírica así como los tratamientos que conlleva para su resolución van a deteriorar la capacidad de recuperación de esta población linfocítica después del trasplante. La rápida expansión de estos LT CD8+ observada en los

pacientes después de la infección por CMV no se observó en pacientes con otras infecciones víricas, lo que sugiere que la expansión de esta subpoblación es un fenómeno exclusivamente causado por el CMV. Esta afirmación va en consonancia con lo descrito por Drylewicz y col. donde describen que, a diferencia del CMV, el VEB no tiene un efecto significativo sobre la reconstitución inmunológica (93). Sin embargo, aunque el número de LT CD8+ después de la infección por CMV fue elevado, esto podría dar lugar a una falsa percepción de la reconstitución de esta subpoblación. El análisis general de la reconstitución inmunológica de las subpoblaciones analizadas, ha mostrado como la subpoblación de LT CD8+ sigue una cinética de reconstitución durante el periodo post-TPH independiente del resto de subpoblaciones estudiadas.

Con el fin de analizar la funcionalidad de esta subpoblación de LT específicos de virus, en nuestro análisis empleamos antígenos de CMV, EBV y AdV con el objetivo de inducir una activación antígeno-específica. Concretamente, se emplearon un conjunto de péptidos que cubren la secuencia completa de las proteínas pp65 de CMV, EBNA-1 de VEB y Hexon de AdV. Estas proteínas son todas ellas capaces de generar en el ser humano respuestas inmunodominantes (LT CD4+ y CD8+), siendo capaces de eliminar a los virus. El hecho de que los pacientes de alo-TPH presentaran linfopenia, llevó a que el número de CMN disponibles para nuestros ensayos fuera extremadamente bajo. Un análisis individual de cada una de las subpoblaciones específicas de CMV, EBV o AdV y el uso de un mayor número de paneles de anticuerpos monoclonales han sido las principales consecuencias negativas de este hecho. Por lo tanto, el diseño experimental de nuestro estudio fue basado en el análisis simultáneo de la respuesta funcional frente a CMV/VEB/AdV.

Profundizando en esta respuesta funcional linfocitaria T frente a estos virus, estudios previos desarrollados principalmente con CMV han demostrado que, para tener bajo control dicha infección post-TPH, se requiere la reconstitución de la actividad funcional de estas subpoblaciones de LT específicas (16, 112). Clásicamente para la evaluación de la funcionalidad de los LT, se han empleado moléculas con capacidad efectora como perforina, IFN- γ , TNF- α o IL-2 (219). Otros autores como Ozdemir y col. y Krol y col. han ampliado este repertorio de moléculas de interés, creando la necesidad de evaluar la expresión de moléculas como CD40L, CD107a, MIP-1 β (CCL4) (101, 111, 112, 220). Tras el análisis individual de las subpoblaciones de LT IFN- γ +, IL-2+, CD40L+ o CD107a+, nuestros resultados confirmaron que LT multivirales funcionales están

presentes en los pacientes que no sufren infección por CMV después del alo-TPH. Por su parte, Ciaurriz y col. describieron dos hechos: diferentes patrones cinéticos de recuperación de LT CD8+ específicos de CMV existían después del alo-TPH; la presencia de LT funcionales específicos de CMV se correlacionaba con una menor incidencia de infecciones por CMV y un menor tiempo de viremia (99). En la misma línea que nuestros hallazgos, Lilleri y col. demostraron que los pacientes que controlaban la infección por CMV post-TPH mostraban concentraciones superiores de LT CD8+ específicos de CMV productores de IFN- γ y IL-2 (221). Sin embargo, estos estudios basan sus conclusiones en la presencia o ausencia de estas células funcionales, sin establecer un valor umbral que pueda ser utilizado de manera estandarizada en la práctica clínica.

Nuestros hallazgos demuestran que el uso de estos parámetros de funcionalidad linfocitaria T obtenidos en el día +30 de la monitorización post-TPH resultaron útiles para la identificación de pacientes de alto riesgo de experimentar infección por CMV después del alo-TPH. Concretamente, se muestra una mayor probabilidad de infección por CMV en pacientes con concentraciones de LT citotóxicos que producen IFN- γ o expresan CD40L, CD107a a día +30 después del alo-TPH inferiores a 3,2 células/ μ L, 6,5 células/ μ L y 13,7 células/ μ L, respectivamente. En un estudio publicado en 2019, Camargo y col. dividieron los LT CD8+ específicos de CMV en dos grupos funcionales a día +30 post-TPH: niveles altos de LT CD8+ con fenotipo “no protector” (IL-2-IFN- γ +TNF- α -MIP-1 β +) y niveles bajos del fenotipo “protector” (IL-2+IFN- γ +TNF- α +MIP-1 β +) se asocia con una incidencia de infección por CMV de un 35% (111). Sin embargo, no se establece un valor umbral que pueda ser aplicado a otras cohortes ni corroboran estos hallazgos en la subpoblación de LT CD4+. Por el contrario, Pelak y col., si establecen un valor umbral de LT CD4+ productores de IFN- γ (>0,6%) o productores de IL-2, IFN- γ y CD107a (>0,06%) para clasificar a los pacientes que no presentan recurrencia de infección por CMV (112). Nuestros hallazgos también indican que la probabilidad de infección por CMV es superior entre los pacientes con una concentración inferior de LT CD4+ en relación a la producción de IL-2 o expresión de CD40L, CD107a a día +30 después del alo-TPH (punto de corte: 1.0 células/ μ L, 4.9 células/ μ L y 5.2 células/ μ L, respectivamente). En resumen, nuestros hallazgos han corroborado los estudios previos descritos sobre como la actividad funcional de los LT

específicos de virus prevalece sobre su número, en lo que se refiere a generar protección frente a las infecciones por virus en el paciente (70, 87, 99, 101, 111).

La presencia de la toxina fúngica de *Aspergillus* y la administración de profilaxis anti-EICR basada en Cy-PT condicionan la reconstitución funcional de subpoblaciones de LT específicos de CMV

Con el objetivo de verificar los resultados encontrados en el Bloque I en relación a si la profilaxis farmacológica anti-EICR influye en la reconstitución inmunológica antígeno-específica después del alo-TPH, se evaluaron los diferentes regímenes de profilaxis empleados en nuestra cohorte. En los últimos años, el empleo de Cy-PT como parte de la profilaxis frente a EICR ha revolucionado el trasplante haploidéntico ya que elimina selectivamente LT aloreactivos permitiendo la infusión segura de injertos no manipulados (35). La administración de Cy-PT los días +3 y +4 post-TPH va acompañada de la pauta clásica de profilaxis anti-EICR como es la combinación de CsA/Tac y MTX.

Sin embargo, dada su reciente implantación en la práctica clínica habitual, aún son escasas las publicaciones sobre su influencia en la reconstitución inmunológica específica de virus post-trasplante. En nuestra cohorte, el 65,7% de los pacientes incluidos recibieron este fármaco como parte del régimen profiláctico frente a EICR. Este sub-grupo de pacientes mostraron una incidencia nueve veces mayor de infección por CMV que los pacientes que recibieron otros regímenes profilácticos estándar. Esta afirmación coincide con lo comunicado recientemente por el grupo de Symons y col. del Hospital John Hopkins (222), quienes ha descrito que el uso de este fármaco genera una recuperación de la subpoblación de CD4+ subóptima condicionando la alta tasa de reactivación de CMV y de cistitis hemorrágica de origen viral que aparecen asociado al uso de Cy-PT (210). Por otro lado, el uso de los regímenes estándar, CsA + MMF o Tac + MTX, no se asociaron con un mayor o menor número de infecciones víricas post-TPH. Estos resultados concuerdan con lo afirmado en el Bloque I de estudio, en el que el uso de CsA y MTX *in vitro* no influía en la frecuencia y proliferación de las subpoblaciones celulares analizadas en sujetos sanos.

La observación de que un 65,2% de los 23 pacientes de nuestra cohorte que reciben el mismo régimen inmunosupresor basado en Cy-PT después del alo-TPH desarrollan infección viral por CMV, demuestra que otros factores biológicos aún no definidos

contribuyen a la susceptibilidad a las mismas. Uno de estos factores podría ser la presencia en el paciente de una co-infección fúngica originada por AF. A pesar de no haber sido establecido aún el papel que desempeña la infección fúngica en el desarrollo de las infecciones virales post-TPH, Yong y col. demostraron el efecto contrario como la infección por CMV en el periodo post-trasplante se asocia con un riesgo 4 veces mayor de desarrollar AI de inicio tardío (24). Para el diagnóstico de AI, habitualmente se emplea el test del GM, cuya validez ha sido cuestionada en los pacientes hematológicos debido a los falsos positivos y negativos encontrados. En este sentido, la GT y la bmGT, metabolito secundario y de mayor estabilidad que la GT, han sido detectados en el suero de pacientes con AI documentada (probada o probable) y constituyen un marcador más sensible y específico que el GM sérico en el diagnóstico de AI (144, 145). Por dicho motivo, en cada uno de los días que fueron monitorizados los pacientes se analizaron también los niveles de GM, GT y bmGT.

En nuestra cohorte, sólo un paciente sufrió probable AI según las definiciones proporcionadas por EORTC/MSG (130). En este paciente, se detectó la presencia del hongo AF en el BAL. Sin embargo, la determinación de GM en el suero de este paciente arrojó resultados negativos para todos los días monitorizados. Este paciente mostró niveles cuantificables de bmGT en cuatro de los puntos del periodo de seguimiento. Respecto a los niveles de GT, no se encontró ninguna muestra positiva para GT en nuestra cohorte. Este mismo hallazgo fue descrito previamente por Domingo MP y col. quienes demostraron que la GT posee un tiempo de vida media corto, lo que provoca que los niveles de GT en pacientes con IA sean transitorios (143, 144).

A pesar de que únicamente un paciente sufrió probable AI en nuestra cohorte, más de la mitad de los pacientes experimentaron niveles de bmGT, principalmente en la muestra recogida previamente a la infusión de PH. Todos estos pacientes mostraron niveles de GM negativos por lo que la bmGT se postula como un biomarcador más sensible para detectar una infección subclínica por AF. Las concentraciones de bmGT encontradas en nuestra cohorte fueron comparables a las descritas por Domingo y col. en pacientes post-TPH empleando la misma metodología (HPTLC) (144). Nuestros datos mostraron que los resultados positivos de bmGT fueron encontrados principalmente en pacientes que recibieron régimen de acondicionamiento mieloablativo y/o Cy-PT como profilaxis de EICR. Por ello, cabe pensar que la potente inmunosupresión inducida por el uso de

regímenes mieloablativos previos al trasplante podría influir en la aparición de infecciones subclínicas causadas por AF que podían ser detectadas por niveles cuantificables de bmGT. Además, once pacientes de los 35 incluidos en el estudio han mostrado niveles cuantificables de bmGT en los días +150 y +180 post-TPH. Este hecho coincide con la retirada del tratamiento administrado específicamente para prevenir la aparición de infecciones fúngicas.

Nuestros datos han descrito, por primera vez, una estrecha relación entre la presencia de niveles de bmGT y el empleo de fármacos anti-EICR como Cy-PT. En base a las conclusiones alcanzadas en el grupo de sujetos sanos del Bloque I de estudio, evaluamos la influencia conjunta de la presencia de bmGT y la administración de profilaxis farmacológica basada en Cy-PT sobre la reconstitución de la respuesta inmune celular frente a los virus post-TPH. Los pacientes que experimentaron niveles de bmGT en el momento pre-trasplante y recibieron Cy-PT mostraron una menor concentración de LT CD4+ además de una menor concentración de LT CD4+ y CD8+ funcionales (productores de IL-2 o que expresan CD107a). Como consecuencia de la disfuncionalidad de las subpoblaciones inmunológicas T, estos pacientes tuvieron una probabilidad mayor de sufrir infección por CMV después del alo-TPH. Nuestros hallazgos han descrito, por primera vez, que la presencia de una AI subclínica conlleva la presencia de niveles cuantificables de bmGT. La presencia de ésta en la misma ventana temporal en la que el paciente recibe profilaxis farmacológica anti-EICR basada en la Cy-PT, provoca una afectación funcional de la subpoblación de LT específica de virus. Yang y col. han descrito en un modelo de ratón como la infusión de CY regula negativamente la expresión de Dectina-1. Dectina-1 es un receptor que se expresa principalmente en células mieloides y cuyo ligando es el β -Glucano presente en la pared del AF. *In vitro*, los niveles de Dectina-1 aumentan en presencia de AF ya que está involucrada en la generación de la respuesta frente al hongo. En este trabajo, se indica como la infusión de CY incrementa la susceptibilidad a infecciones fúngicas, al disminuir la expresión de Dectina-1 (223).

Respecto a otros componentes del sistema inmunológico, se desconocen también los efectos de la bmGT y la administración de Cy-PT sobre las subpoblaciones de células NK y mDC. En el grupo de pacientes que experimentaron niveles de bmGT en el momento pre-trasplante y recibieron Cy-PT, nuestros resultados mostraron una mayor expresión de receptores de células NK (KIR2DS4 y KIR3DL1) después del alo-TPH.

Aunque no se ha descrito aún la interacción entre estos receptores y AF, las células NK podrían ser también capaces de modular su expresión KIR, aumentando su expresión en respuesta a la infección fúngica. Este hecho sería similar al descrito en pacientes con infección por CMV post-TPH (116, 224, 225) y al demostrado en nuestra cohorte de estudio, en donde el aumento de la expresión de KIR2DS4 se correlacionaba como un aumento en el número de reactivaciones por CMV. Por lo tanto, nuestros hallazgos han demostrado, al igual que sucedía con los ensayos *in vitro* del primer bloque de estudio, que el valor patogénico de la GT, más concretamente de la bmGT, proviene de su presencia concomitante con los fármacos profilácticos para la EICR.

En resumen, este es el primer trabajo que ha descrito en una cohorte de pacientes sometidos a alo-TPH, que la presencia de bmGT en combinación con el régimen profiláctico anti-EICR basado en Cy-PT modula la respuesta inmunitaria específica frente a virus, lo que condiciona la susceptibilidad a las infecciones oportunistas en los receptores de alo-TPH, principalmente por CMV. Por tanto, se ha demostrado como la monitorización de los niveles de bmGT después del alo-TPH constituye un parámetro clave para una definición más precisa de los pacientes con alto riesgo de tener infecciones virales oportunistas post-TPH, postulándose, además, como un biomarcador más sensible que el GM para detectar infección subclínica por AF. Por último, nuestros resultados han corroborado como la implantación de la evaluación de la funcionalidad de la subpoblación de LT específicos de virus podría ser de utilidad para predecir la infección por CMV después del alo-TPH.

3. Bloque III

El rápido desarrollo en los últimos años de las denominadas tecnologías de NGS ha permitido obtener millones de secuencias de ADN a una velocidad sin precedentes y a un coste cada vez más reducido. Empleando esta metodología y en el contexto del alo-TPH, ha sido posible determinar la contribución de las variantes genéticas en el desarrollo de complicaciones clínicas después del TPH, un ejemplo de ello son la EICR aguda y las infecciones (226). Concretamente, estudios recientes han demostrado como la presencia de determinados SNPs en genes relacionados con el sistema inmunológico influyen en el curso y en el desarrollo de infecciones víricas post-TPH (146, 176, 227, 228). El objetivo de este tercer bloque de estudio consistió en identificar, mediante NGS, polimorfismos genéticos que pudieran tener un papel importante en la modulación de la respuesta inmunológica específica frente a virus oportunistas durante el periodo post-TPH.

El análisis mediante NGS de variantes genómicas predice el desarrollo de infección por CMV post-TPH

Como se ha descrito en la introducción de este trabajo, un polimorfismo genético es una variante alélica que existe de forma estable en una población, y puede estar localizada tanto en regiones codificadoras como no codificadoras del genoma. Cuando el SNP ocurre dentro de la región codificadora del gen, o exón, la probabilidad de que altere la función biológica de la proteína es mayor, pudiendo condicionar la respuesta inmunológica que se genera ante distintas enfermedades. Sin embargo, mucho más frecuentes son los SNPs que afectan a regiones no codificantes (regiones reguladoras e intrones) que pueden también afectar a la expresión de su correspondiente proteína, dando origen a una alteración funcional. Por ejemplo, un SNP en la región promotora de un gen puede alterar la afinidad por la unión con factores de transcripción, variando de esta forma los niveles de transcripción del gen y produciéndose, como consecuencia, cambios en los niveles de proteína. Otro ejemplo son los SNP en las regiones 5'UTR y 3'UTR que pueden alterar la estabilidad del ARNm, afectando de nuevo su traducción a proteína. Por todo ello, los SNPs pueden tener implicaciones funcionales sobre los niveles de expresión génica, la estabilidad del ARNm así como la producción y la actividad biológica de la proteína resultante.

Las citoquinas y las quimiocinas son la primera línea de defensa contra las infecciones virales por lo que la presencia de SNPs en genes que codifican estas moléculas producen diferencias interindividuales en su expresión, concentración y actividad funcional, lo cual, supone un peso importante para el control de dichas infecciones (181). Concretamente, en nuestro estudio nos centramos en el impacto que diversas variantes genómicas tenían en la modulación de la respuesta inmunológica generada frente al CMV después del alo-TPH, ya que un 60% de los pacientes incluidos en este bloque de estudio sufrieron al menos un episodio de infección primaria o reactivación por este virus durante el periodo posterior al trasplante, frecuencia similar a la descrita por otros autores (220). Específicamente, la presencia de SNPs en regiones reguladoras de genes de citoquinas, quimiocinas y sus receptores han demostrado una asociación significativa con la aparición de infecciones por CMV en pacientes que han sido sometidos a un alo-TPH (146). Sin embargo, aún es escasa la bibliografía existente sobre el papel de estos SNPs y la mayoría de ellos han sido analizados en pequeñas cohortes de pacientes sometidos a alo-TPH. Por ello, a la hora de realizar el diseño del panel de NGS se incluyeron los genes, para los cuales, existía bibliografía previa de cómo éstos podían modular el sistema inmunológico después del alo-TPH: *IFN- γ* , *CCR5*, *FOXP3*, *TNF- α* , *IL-10*, receptores *KIR*, entre otros (148-153).

Tal y como se muestra en nuestros resultados, encontramos once variantes de siete genes diferentes (*CXCL12*, *IL-12A*, *KIR3DL1*, *TGF- β 2*, *TNF- α* , *IL-1RN* y *CD48*) que se asocian en nuestra cohorte de pacientes con riesgo o protección frente a infección por CMV después del alo-TPH. En particular, nuestros datos han mostrado que la presencia del genotipo GA/GG del SNP rs3093662 en el gen *TNF- α* , tanto en receptor como en donante se asocia con protección frente a la infección por CMV después del alo-TPH. Kroeger y col. describieron como la presencia del nucleótido G en esta posición se asociaba con un aumento de la actividad transcripcional y una alta producción *in vitro* de *TNF- α* (186, 229). *TNF- α* actúa directamente sobre las células infectadas impidiendo la replicación viral por lo que la presencia de la variante intrónica rs3093662 en este gen se relaciona con una mayor producción de esta citoquina y, como consecuencia de ello, con un mejor aclaramiento del virus tras el alo-TPH. Esto explica los hallazgos clínicos encontrados en nuestra cohorte de estudio.

Del mismo modo que *TNF- α* , durante la infección por CMV, se ha descrito un incremento de la producción de otras citoquinas proinflamatorias como *IL-12* (230). *IL-*

12 desempeña un papel crucial en la respuesta inmune anti-infecciosa, especialmente al estimular la producción de IFN- γ . Nuestros resultados han demostrado una asociación entre los SNPs rs7615589 y rs2243123 del gen *IL-12A* en el receptor y un menor riesgo de infección de CMV por lo que cabría pensar que, al igual que sucede con TNF- α , estos polimorfismos se podrían asociar a una mayor concentración de IL-12A. En consonancia con esta hipótesis, Hoffmann y col. investigaron el SNPs rs3212227 de *IL-12B* mostrando que una menor producción de esta citoquina explica un vínculo patogénico entre el genotipo de *IL-12B* y la replicación del CMV (179).

La proteína TGF- β suprime la proliferación celular y la diferenciación de muchos linajes de células inmunes, incluyendo las subpoblaciones T y B. Cano y col. han descrito como la presencia en homocigosis de C y G en las posiciones +869 (rs1982037) y +915 (rs1800471) del exón 1, respectivamente del gen *TGF- β 1* estaban significativamente asociadas con la reactivación del CMV en pacientes con cáncer (182). Ambos SNPs conducen a una mayor producción de TGF- β 1 que resulta desfavorable para un control eficiente de CMV. Nuestros datos en el contexto del alo-TPH, sin embargo, han sugerido un riesgo significativamente menor de infección por CMV en pacientes con delección del nucleótido G, característica del rs5781034 en el gen *TGF- β 2*. Sin embargo, la repercusión de esta variante del intrón 3 sobre la funcionalidad de la proteína que codifica aún no se han establecido.

Por otro lado, los resultados encontrados han mostrado que los donantes con el genotipo GC/GG del SNP rs2295615 en el gen *CD48* así como AG/AA del SNP rs439154 de *IL-1RN* (receptor antagonista de la IL-1) se han asociado con protección frente a la infección por CMV en nuestra cohorte. CD48 se expresa en las CPA y su acoplamiento al CD2 del LT contribuye a la activación de este subtipo celular (231). Sin embargo, el mecanismo molecular, a través del cual, el SNP descrito ejerce su actividad no está establecido. Respecto al gen *IL1-RN*, Hurme y col. han publicado que el número de repeticiones en tándem de 86 pb en el intrón 2 del este gen se asocia con mayores niveles de IL-1 *in vitro*, una mayor respuesta inflamatoria frente a la infección vírica y, consecuentemente, protección frente a CMV (153). Nuestros datos, además, han descrito la asociación entre la presencia de otra variante alélica en el mismo intrón (AG/AA) rs439154 en nuestra cohorte de donantes y protección frente a la infección por CMV post-TPH. Sin embargo, nuestros hallazgos también han dado a conocer un efecto opuesto, donantes o pacientes portadores de la variante alélica TT/CT del SNP

rs2071459 en este mismo gen, sufren enfermedad por CMV. En nuestra cohorte, únicamente sólo cuatro pacientes (4,7%) de los 85 incluidos en la cohorte fueron diagnosticados de enfermedad por CMV, por lo que es necesario validar la implicación de este polimorfismo en una cohorte más amplia.

Como se ha descrito, estos SNPs regulan directamente la producción de citoquinas, al producir variaciones individuales en la expresión, concentración y actividad funcional de estas moléculas. Todos los datos previamente comentados han sugerido que la presencia de determinados polimorfismos en genes que codifican citoquinas como TNF- α , IL-12A, TGF- β 2 e IL-1RN o en moléculas asociadas a la activación del LT como CD48; pueden culminar, en el contexto de una infección por CMV, en la activación de un repertorio de citoquinas pro-inflamatorias, lo que reduciría y controlaría la replicación viral siendo beneficioso frente a la infección por CMV después del alo-TPH. Esta afirmación ha sido descrita por Jaskula y col. para otras citoquinas como IFN- γ , donde han descrito como la presencia del nucleótido T en la posición +1874 del gen que codifica esta proteína, potencia su ratio de transcripción generando, como consecuencia, un microambiente que favorece la eliminación del agente vírico (232).

Por el contrario, nuestros datos también han descrito en los pacientes que el nucleótido G para el SNP rs2839695 del gen *CXCL12* se relaciona con un mayor riesgo de infección por CMV. *CXCL12* es una quimiocina cuya función principal es estimular la migración de los monocitos y los LT al sitio de infección a través del receptor CXCR4. En concordancia con esta afirmación, Tu y col. han demostrado que una mayor expresión de *CXCL12* promovía respuestas que inducen la replicación del CMV desencadenando así la reactivación del mismo (174).

La infección por CMV involucra varios cambios fenotípicos en la célula NK, incluida la expansión y diferenciación del repertorio de sus receptores KIR (159). La interacción de los receptores KIR con sus ligandos HLA, resulta en una inhibición o activación de los mecanismos efectoros de las células NK sobre la célula diana. En este sentido, el receptor inhibitorio KIR3DL1 podría desempeñar un papel importante durante la reactivación del CMV en pacientes inmunodeprimidos. De Rham y col. exploraron la expresión de KIR3DL1 en células NK durante la infección por CMV demostrando altos niveles de expresión de este receptor, lo que implica que podría estar involucrado en la eliminación de la infección por CMV (160). Este receptor es considerado “inhibidor”, ya que mantiene suprimida la actividad lítica de la célula NK respetando las células

propias que expresan niveles normales de CMH-I y atacando únicamente células modificadas por virus que carecen, expresan niveles bajos de CMH-I. Este receptor es específico para las moléculas HLA de clase I que portan el epítipo Bw4. El receptor KIR3DL1 es altamente polimórfico, lo cual, puede condicionar que variantes genómicas en este gen influyan en la funcionalidad de estas células NK. En nuestro análisis el estudio de la correlación entre los genotipos del gen *KIR3DL1* y la infección por CMV mostró un riesgo significativamente mayor de infección en los pacientes que presentaban (AG/AA) rs45542639, (GA/GG) rs149123986, (AG/AA) rs144994606 o (TC/TT) rs143159382. Específicamente, Pando y col. y Alicata y col. demostraron como este último SNP rs143159382 en el exón 3 (c.320C>T) conlleva la sustitución de una Ser por una Leu en la posición 86. Este hecho ocasiona que KIR3DL1 una vez sintetizado se retenga en el interior de la célula impidiendo que se detecte en la superficie de la célula NK y desarrolle correctamente su función, tal y como se ha descrito. Los haplotipos del gen *KIR3DL1* son un ejemplo de cómo la presencia de SNPs en el gen que codifica este receptor puede conllevar a una disfuncionalidad de las células NK y con ello al desarrollo final de infección por CMV (233, 234).

La IL-6 es una glucoproteína de acción pro-inflamatoria secretada por LT, macrófagos y células endoteliales, entre otros, y cuya liberación está inducida por IL-1. Es un potente inductor de la respuesta de fase aguda. Según Wujcicka y col. y Bennermo y col. los individuos con el SNP rs1800795 en la región promotora del gen *IL-6*, han mostrado cambios en los niveles de expresión de esta citoquina. Concretamente, ambos grupos han propuesto que la presencia de este SNP, situado en la posición -174G>C, afecta la transcripción del gen *IL-6*, induciendo una mayor producción de esta citoquina (235). La presencia del nucleótido G en esta posición se ha asociado con mayor producción de IL-6 como respuesta a estímulos de origen infeccioso, conllevando un mayor efecto como mediador de la respuesta de fase aguda (180, 236).

Wujcicka y col. y Schluter y col. han descrito como el aumento de la concentración de IL-6 ocasionada por la presencia del nucleótido G en este SNP es beneficioso para el paciente en caso de una infección aguda. Más específicamente provocando una menor incidencia de CMV congénito en mujeres embarazadas o una mejor supervivencia en pacientes con sepsis (180). Nuestros datos, en consonancia con Wujcicka y col. han reflejado que los pacientes con rs1800795 en el gen *IL-6*, además de rs2069832, rs7802307, rs1474347, rs1554606 e rs2069845; han mostrado un riesgo menor de sufrir

más de dos episodios de infección de CMV tras el alo-TPH (237). Por tanto, nuestros hallazgos han confirmado el efecto protector de estas variantes genómicas de *IL-6* frente a los episodios recurrentes de infección por CMV. Específicamente, se seleccionó el polimorfismo rs1554606 en *IL6* tras el análisis de las curvas ROC para clasificar a los pacientes de acuerdo con la frecuencia de los episodios de CMV después del trasplante. Por lo tanto, el análisis individual de este SNP ha demostrado utilidad para identificar a los pacientes que sufrirán más de dos episodios por CMV después del alo-TPH. Sin embargo, no se han observado diferencias entre los pacientes con o sin infección por CMV en función de la presencia de estos SNPs de *IL-6*. Sería necesario un estudio más amplio para dilucidar como afectan las variantes genéticas de este gen sobre las infecciones por CMV.

La aplicación de un score de riesgo genético ayuda a identificar pacientes de alto riesgo de infección por CMV después del alo-TPH

Finalmente, con el objetivo de incrementar la utilidad clínica de nuestros resultados, los estudios experimentales de este bloque de estudio han permitido construir un modelo predictivo de infección por CMV post-TPH. Para la elaboración de dicho modelo predictivo, se incluyeron cinco SNPs: *CXCL12* rs2839695, *IL-12A* rs7615589, *KIR3DL1* rs4554639, *TGF- β 2* rs5781034 para el receptor y *CD48* rs2295615 para el donante. Del análisis de las curvas ROC, se definió un punto de corte óptimo, que proporcionaba una sensibilidad del 84,3% y una especificidad del 67,6%. Respecto a las variables clínicas, la aparición de EICR aguda constituyó el principal factor de riesgo de sufrir infección por CMV en nuestra cohorte, tal y como describen otros autores (29). Por ello, los pacientes con EICR grado III-IV fueron considerados de alto riesgo de sufrir infección por CMV, independientemente del análisis genómico.

Hasta la fecha, este es el primer estudio que ha proporcionado una ecuación de cálculo de riesgo de infección por CMV después del alo-TPH y una puntuación práctica para identificar a los pacientes de alto riesgo de experimentar infección por CMV después del alo-TPH. Éste es el único trabajo existente en el que se describe una ecuación de cálculo de riesgo en base al análisis de polimorfismos genéticos, ya que, hasta el momento, los estudios realizados se han centrado en el análisis de SNPs de manera individual. Además, a diferencia de los anteriormente publicados, nuestros resultados analizan las variantes genómicas encontradas tanto en pacientes como en donantes. El modelo propuesto puede ser fácilmente aplicado por otros centros empleando la

ecuación y el punto de corte definido. No obstante, los SNPs utilizados para el diseño de este modelo deben ser validados en una cohorte mayor de pacientes y con otros tipos de trasplante de PH, como el trasplante haploidéntico que se emplea en la actualidad junto con profilaxis de EICR basada en Cy-PT.

Nuestros hallazgos han demostrado que la evaluación de determinadas variantes genéticas en pacientes y donantes en el momento previo al trasplante ayudaría a predecir el riesgo individual del desarrollo de la infección y enfermedad por CMV después de un trasplante alogénico de hermano HLA-idéntico. Este enfoque facilitaría el manejo clínico del paciente, adaptando dicho manejo al riesgo de que éstos se sometieran a un alo-TPH. Por tanto, estos resultados permitirían: identificar de manera precoz pacientes con alto riesgo de sufrir infección por CMV después del alo-TPH; administrar fármacos novedosos como el Letemovir, único fármaco indicado para la profilaxis de la infección por CMV en adultos seropositivos para el virus; así como infundir tratamientos de Inmunoterapia adoptiva con LT específicos de CMV.

CONCLUSIONES

1. La toxina fúngica GT producida por *Aspergillus fumigatus* inhibe la funcionalidad de las subpoblaciones de células NK CD56^{dim} y de LT que han sido previamente activadas por CMV o VEB, afectando en mayor medida a esta última.
2. En un cultivo *in vitro*, la presencia combinada de GT y de fármacos inmunosupresores profilácticos frente a EICR basados en CsA y MTX suprime la ruta de señalización molecular NF-κB en la subpoblación de LT, modulando negativamente su viabilidad.
3. La presencia de LT específicos de virus disfuncionales se asocia a infección por CMV después de un alo-TPH.
4. La cuantificación de LT CD4+ y CD8+ funcionales permite establecer valores umbrales que identifiquen pacientes con alto riesgo de sufrir infección por CMV.
5. La detección de bmGT después de un alo-TPH se postula como un biomarcador más sensible que el GM para detectar infección subclínica por AF.
6. La presencia de bmGT en el paciente induce un mecanismo inmunosupresor que condiciona la reconstitución de la subpoblación funcional de LT CD4+CD107a+ específica de virus después de un alo-TPH.
7. La funcionalidad de la subpoblación de LT específicos de virus después de un alo-TPH está deteriorada por la presencia combinada de bmGT y la administración de profilaxis anti-EICR basada en Cy-PT, lo cual, condiciona la susceptibilidad del paciente de sufrir infección por CMV post-TPH.
8. El análisis de los siguientes polimorfismos genéticos: *CXCL12* rs2839695, *IL-12A* rs7615589, *KIR3DL1* rs4554639, *TGF-β2* rs5781034 para el receptor y *CD48* rs2295615 para el donante; predice el desarrollo de infección por CMV en pacientes que han sido sometidos a un alo-TPH.
9. Los pacientes que presentan el polimorfismo genético rs1554606 del gen *IL-6* muestran un riesgo inferior de sufrir más de dos episodios de infección por CMV tras un alo-TPH.
10. La aplicación de un score de riesgo genético o el desarrollo de EICR aguda de grado III/IV, permite identificar pacientes de alto riesgo de experimentar una infección por CMV después de un alo-TPH.

BIBLIOGRAFÍA

1. 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;257(11):491-6.
2. Passweg JR, Baldomero H, Basak GW, Chabannon C, Corbacioglu S, Duarte R, et al. The EBMT activity survey report 2017: a focus on allogeneic HCT for nonmalignant indications and on the use of non-HCT cell therapies. *Bone Marrow Transplant.* 2019.
3. 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;124(3):334-43.
4. Granata A, Fürst S, Bramanti S, Legrand F, Sarina B, Harbi S, et al. Peripheral blood stem cell for haploidentical transplantation with post-transplant high dose cyclophosphamide: detailed analysis of 181 consecutive patients. *Bone Marrow Transplant.* 2019.
5. Ringdén O, Labopin M, Ciceri F, Velardi A, Bacigalupo A, Arcese W, et al. Is there a stronger graft-versus-leukemia effect using HLA-haploidentical donors compared with HLA-identical siblings? *Leukemia.* 2016;30(2):447-55.
6. Jethava YS, Sica S, Savani B, Socola F, Jagasia M, Mohty M, et al. Conditioning regimens for allogeneic hematopoietic stem cell transplants in acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 2017;52(11):1504-11.
7. Klerk CP, Lam KH. Graft-versus-leukemia in the bone marrow. *Blood.* 2014;123(4):470.
8. Mahmoud HK, Elhaddad AM, Fahmy OA, Samra MA, Abdelfattah RM, El-Nahass YH, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for non-malignant hematological disorders. *J Adv Res.* 2015;6(3):449-58.
9. Muffly L, Pasquini MC, Martens M, Brazauskas R, Zhu X, Adekola K, et al. Increasing use of allogeneic hematopoietic cell transplantation in patients aged 70 years and older in the United States. *Blood.* 2017;130(9):1156-64.
10. Dalle JH, Giralt SA. Hepatic Venous Occlusive Disease after Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Risk Factors and Stratification, Prophylaxis, and Treatment. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016;22(3):400-9.
11. Junghanss C, Marr KA. Infectious risks and outcomes after stem cell transplantation: are nonmyeloablative transplants changing the picture? *Curr Opin Infect Dis.* 2002;15(4):347-53.
12. Bacigalupo A, Sormani MP, Lamparelli T, Gualandi F, Occhini D, Bregante S, et al. Reducing transplant-related mortality after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2004;89(10):1238-47.
13. Celebi H, Akan H, Akcaglayan E, Ustun C, Arat M. Febrile neutropenia in allogeneic and autologous peripheral blood stem cell transplantation and conventional chemotherapy for malignancies. *Bone Marrow Transplant.* 2000;26(2):211-4.
14. Blennow O, Remberger M, Törlén J, Szakos A, Ljungman P, Mattsson J. Risk Factors for Invasive Mold Infections and Implications for Choice of Prophylaxis after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016;22(9):1684-9.
15. Omrani AS, Almaghrabi RS. Complications of hematopoietic stem cell transplantation: Bacterial infections. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2017;10(4):228-32.
16. Mehta RS, Rezvani K. Immune reconstitution post allogeneic transplant and the impact of immune recovery on the risk of infection. *Virulence.* 2016;7(8):901-16.
17. Seo HM, Kim YS, Bang CH, Lee JH, Lee JY, Lee DG, et al. Antiviral prophylaxis for preventing herpes zoster in hematopoietic stem cell transplant recipients: A systematic review and meta-analysis. *Antiviral Res.* 2017;140:106-15.
18. Pello OM, Innes AJ, Bradshaw A, Finn SA, Uddin S, Bray E, et al. BKV-specific T cells in the treatment of severe refractory haemorrhagic cystitis after HLA-haploidentical haematopoietic cell transplantation. *Eur J Haematol.* 2017;98(6):632-4.
19. Papadopoulou A, Gerdemann U, Katari UL, Tzannou I, Liu H, Martinez C, et al. Activity of broad-spectrum T cells as treatment for AdV, EBV, CMV, BKV, and HHV6 infections after HSCT. *Sci Transl Med.* 2014;6(242):242ra83.

20. Abudayyeh A, Hamdi A, Abdelrahim M, Lin H, Page VD, Rondon G, et al. Poor immune reconstitution is associated with symptomatic BK polyomavirus viremia in allogeneic stem cell transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* 2017;19(1).
21. Parody R, Martino R, Sánchez F, Subirá M, Hidalgo A, Sierra J. Predicting survival in adults with invasive aspergillosis during therapy for hematological malignancies or after hematopoietic stem cell transplantation: Single-center analysis and validation of the Seattle, French, and Strasbourg prognostic indexes. *Am J Hematol.* 2009;84(9):571-8.
22. Rovira M, Camps IR. [Infections in stem cell transplantation]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007;25(7):477-86.
23. Mariotti J, De Philippis C, Bramanti S, Sarina B, Tordato F, Pocaterra D, et al. Caspofungin for primary antifungal prophylaxis after T-cell-replete haploidentical stem cell transplantation with post-transplant cyclophosphamide. *Eur J Haematol.* 2019;102(4):357-67.
24. Yong MK, Ananda-Rajah M, Cameron PU, Morrissey CO, Spencer A, Ritchie D, et al. Cytomegalovirus Reactivation Is Associated with Increased Risk of Late-Onset Invasive Fungal Disease after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Multicenter Study in the Current Era of Viral Load Monitoring. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2017;23(11):1961-7.
25. Kim R, Koh Y, Shin DY, Choe PG, Kim NJ, Yoon SS, et al. The limited role of serum galactomannan assay in screening for invasive pulmonary aspergillosis in allogeneic stem cell transplantation recipients on micafungin prophylaxis: a retrospective study. *Blood Res.* 2017;52(4):300-6.
26. Vidal-García M, Sánchez-Chueca P, Domingo MP, Ballester C, Roc L, Ferrer I, et al. Disseminated aspergillosis in an immunocompetent patient with detectable bis(methylthio)gliotoxin and negative galactomannan. *Rev Iberoam Micol.* 2017;34(1):49-52.
27. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hovs J, et al. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant.* 1995;15(6):825-8.
28. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005;11(12):945-56.
29. Flowers ME, Inamoto Y, Carpenter PA, Lee SJ, Kiem HP, Petersdorf EW, et al. Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. *Blood.* 2011;117(11):3214-9.
30. Ruutu T, Gratwohl A, Niederwieser D, de Witte T, van der Werf S, van Biezen A, et al. The EBMT-ELN working group recommendations on the prophylaxis and treatment of GVHD: a change-control analysis. *Bone Marrow Transplant.* 2017;52(3):357-62.
31. Torlen J, Ringden O, Garming-Legert K, Ljungman P, Winiarski J, Remes K, et al. A prospective randomized trial comparing cyclosporine/methotrexate and tacrolimus/sirolimus as graft-versus-host disease prophylaxis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2016;101(11):1417-25.
32. Bolaños-Meade J, Reshef R, Fraser R, Fei M, Abhyankar S, Al-Kadhimi Z, et al. Three prophylaxis regimens (tacrolimus, mycophenolate mofetil, and cyclophosphamide; tacrolimus, methotrexate, and bortezomib; or tacrolimus, methotrexate, and maraviroc) versus tacrolimus and methotrexate for prevention of graft-versus-host disease with haemopoietic cell transplantation with reduced-intensity conditioning: a randomised phase 2 trial with a non-randomised contemporaneous control group (BMT CTN 1203). *Lancet Haematol.* 2019;6(3):e132-e43.
33. Nakane T, Nakamae H, Yamaguchi T, Kurosawa S, Okamura A, Hidaka M, et al. Use of mycophenolate mofetil and a calcineurin inhibitor in allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation from HLA-matched siblings or unrelated volunteer donors: Japanese multicenter phase II trials. *Int J Hematol.* 2017;105(4):485-96.

34. Baron F. Unrelated donor haemopoietic stem-cell transplantation: ATG or not? *Lancet Haematol.* 2017;4(6):e252-e3.
35. Al-Homsi AS, Roy TS, Cole K, Feng Y, Duffner U. Post-transplant high-dose cyclophosphamide for the prevention of graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21(4):604-11.
36. Bacigalupo A, Dominiotto A, Ghiso A, Di Grazia C, Lamparelli T, Gualandi F, et al. Unmanipulated haploidentical bone marrow transplantation and post-transplant cyclophosphamide for hematologic malignancies following a myeloablative conditioning: an update. *Bone Marrow Transplant.* 2015;50 Suppl 2:S37-9.
37. Ozdemir ZN, Civriz Bozdog S. Graft failure after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transfus Apher Sci.* 2018;57(2):163-7.
38. Dziedzic M, Sadowska-Krawczenko I, Styczynski J. Risk Factors for Cytomegalovirus Infection After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation in Malignancies: Proposal for Classification. *Anticancer Res.* 2017;37(12):6551-6.
39. Ljungman P, Brand R, Einsele H, Frassonni F, Niederwieser D, Cordonnier C. Donor CMV serologic status and outcome of CMV-seropositive recipients after unrelated donor stem cell transplantation: an EBMT megafile analysis. *Blood.* 2003;102(13):4255-60.
40. Borchers S, Luther S, Lips U, Hahn N, Kotsendorn J, Stadler M, et al. Tetramer monitoring to assess risk factors for recurrent cytomegalovirus reactivation and reconstitution of antiviral immunity post allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis.* 2011;13(3):222-36.
41. Hakki M, Riddell SR, Storek J, Carter RA, Stevens-Ayers T, Sudour P, et al. Immune reconstitution to cytomegalovirus after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: impact of host factors, drug therapy, and subclinical reactivation. *Blood.* 2003;102(8):3060-7.
42. Styczynski J. Who Is the Patient at Risk of CMV Recurrence: A Review of the Current Scientific Evidence with a Focus on Hematopoietic Cell Transplantation. *Infect Dis Ther.* 2018;7(1):1-16.
43. Boeckh M, Ljungman P. How we treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood.* 2009;113(23):5711-9.
44. Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2002;34(8):1094-7.
45. Marty FM, Ljungman P, Chemaly RF, Maertens J, Dadwal SS, Duarte RF, et al. Letemovir Prophylaxis for Cytomegalovirus in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med.* 2017;377(25):2433-44.
46. Robin C, Hémerly F, Dindorf C, Thillard J, Cabanne L, Redjoul R, et al. Economic burden of preemptive treatment of CMV infection after allogeneic stem cell transplantation: a retrospective study of 208 consecutive patients. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):747.
47. Heslop HE. How I treat EBV lymphoproliferation. *Blood.* 2009;114(19):4002-8.
48. Uhlin M, Wikell H, Sundin M, Blennow O, Maeurer M, Ringden O, et al. Risk factors for Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2014;99(2):346-52.
49. Rouce RH, Louis CU, Heslop HE. Epstein-Barr virus lymphoproliferative disease after hematopoietic stem cell transplant. *Curr Opin Hematol.* 2014;21(6):476-81.
50. Wagner HJ, Cheng YC, Huls MH, Gee AP, Kuehnle I, Krance RA, et al. Prompt versus preemptive intervention for EBV lymphoproliferative disease. *Blood.* 2004;103(10):3979-81.
51. Styczynski J, van der Velden W, Fox CP, Engelhard D, de la Camara R, Cordonnier C, et al. Management of Epstein-Barr Virus infections and post-transplant lymphoproliferative disorders in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Sixth European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-6) guidelines. *Haematologica.* 2016;101(7):803-11.
52. Xu LP, Zhang CL, Mo XD, Zhang XH, Chen H, Han W, et al. Epstein-Barr Virus-Related Post-Transplantation Lymphoproliferative Disorder after Unmanipulated Human Leukocyte

- Antigen Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Incidence, Risk Factors, Treatment, and Clinical Outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(12):2185-91.
53. Bian Z, Liu J, Xu LP, Chang YJ, Wang Y, Zhang XH, et al. Association of Epstein-Barr virus reactivation with the recovery of CD4/CD8 double-negative T lymphocytes after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2017;52(2):264-9.
54. Ison MG. Adenovirus infections in transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 2006;43(3):331-9.
55. Robin M, Marque-Juillet S, Scieux C, Peffault de Latour R, Ferry C, Rocha V, et al. Disseminated adenovirus infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: incidence, risk factors and outcome. *Haematologica*. 2007;92(9):1254-7.
56. Lindemans CA, Leen AM, Boelens JJ. How I treat adenovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Blood*. 2010;116(25):5476-85.
57. Chakrabarti S, Mautner V, Osman H, Collingham KE, Fegan CD, Klapper PE, et al. Adenovirus infections following allogeneic stem cell transplantation: incidence and outcome in relation to graft manipulation, immunosuppression, and immune recovery. *Blood*. 2002;100(5):1619-27.
58. Hiwarkar P, Gaspar HB, Gilmour K, Jagani M, Chiesa R, Bennett-Rees N, et al. Impact of viral reactivations in the era of pre-emptive antiviral drug therapy following allogeneic haematopoietic SCT in paediatric recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48(6):803-8.
59. Zandvliet ML, Falkenburg JH, van Liempt E, Veltrop-Duits LA, Lankester AC, Kalpoe JS, et al. Combined CD8+ and CD4+ adenovirus hexon-specific T cells associated with viral clearance after stem cell transplantation as treatment for adenovirus infection. *Haematologica*. 2010;95(11):1943-51.
60. Bordignon P, Carret AS, Venard V, Witz F, Le Faou A. Treatment of adenovirus infections in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis*. 2001;32(9):1290-7.
61. Alho AC, Kim HT, Chammas MJ, Reynolds CG, Matos TR, Forcade E, et al. Unbalanced recovery of regulatory and effector T cells after allogeneic stem cell transplantation contributes to chronic GVHD. *Blood*. 2016;127(5):646-57.
62. Auletta JJ, Lazarus HM. Immune restoration following hematopoietic stem cell transplantation: an evolving target. *Bone Marrow Transplant*. 2005;35(9):835-57.
63. Storek J, Dawson MA, Storer B, Stevens-Ayers T, Maloney DG, Marr KA, et al. Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood*. 2001;97(11):3380-9.
64. Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P, Wagner JE, Zhang MJ, Champlin RE, et al. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med*. 2004;351(22):2265-75.
65. Fallen PR, McGreavey L, Madrigal JA, Potter M, Ethell M, Prentice HG, et al. Factors affecting reconstitution of the T cell compartment in allogeneic haematopoietic cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2003;32(10):1001-14.
66. Jiménez M, Ercilla G, Martínez C. Immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning regimens. *Leukemia*. 2007;21(8):1628-37.
67. Ugarte-Torres A, Hoegh-Petersen M, Liu Y, Zhou F, Williamson TS, Quinlan D, et al. Donor serostatus has an impact on cytomegalovirus-specific immunity, cytomegalovirus disease incidence, and survival in seropositive hematopoietic cell transplant recipients. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17(4):574-85.
68. Itzykson R, Robin M, Moins-Teisserenc H, Delord M, Busson M, Xhaard A, et al. Cytomegalovirus shapes long-term immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2015;100(1):114-23.
69. Vukicevic M, Chalandon Y, Helg C, Matthes T, Dantin C, Huard B, et al. CD56bright NK cells after hematopoietic stem cell transplantation are activated mature NK cells that expand in patients with low numbers of T cells. *Eur J Immunol*. 2010;40(11):3246-54.

70. Ullah MA, Hill GR, Tey SK. Functional Reconstitution of Natural Killer Cells in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol.* 2016;7:144.
71. Nguyen S, Kuentz M, Vernant JP, Dhedin N, Bories D, Debré P, et al. Involvement of mature donor T cells in the NK cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Leukemia.* 2008;22(2):344-52.
72. Kheav VD, Busson M, Scieux C, Peffault de Latour R, Maki G, Haas P, et al. Favorable impact of natural killer cell reconstitution on chronic graft-versus-host disease and cytomegalovirus reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2014;99(12):1860-7.
73. Chen C, Busson M, Rocha V, Appert ML, Lepage V, Dulphy N, et al. Activating KIR genes are associated with CMV reactivation and survival after non-T-cell depleted HLA-identical sibling bone marrow transplantation for malignant disorders. *Bone Marrow Transplant.* 2006;38(6):437-44.
74. Minculescu L, Marquart HV, Friis LS, Petersen SL, Schiødt I, Ryder LP, et al. Early Natural Killer Cell Reconstitution Predicts Overall Survival in T Cell-Replete Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016;22(12):2187-93.
75. Horváth R, Budinský V, Kayserová J, Kalina T, Formánková R, Starý J, et al. Kinetics of dendritic cells reconstitution and costimulatory molecules expression after myeloablative allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: implications for the development of acute graft-versus host disease. *Clin Immunol.* 2009;131(1):60-9.
76. Ringhoffer S, Rojewski M, Döhner H, Bunjes D, Ringhoffer M. T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation: assessment by measurement of the sjTREC/βTREC ratio and thymic naive T cells. *Haematologica.* 2013;98(10):1600-8.
77. Chaudhry MS, Velardi E, Malard F, van den Brink MR. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Time To T Up the Thymus. *J Immunol.* 2017;198(1):40-6.
78. Hu Y, Cui Q, Ye Y, Luo Y, Tan Y, Shi J, et al. Reduction of Foxp3+ T cell subsets involved in incidence of chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Hematol Oncol.* 2017;35(1):118-24.
79. Kennedy-Nasser AA, Ku S, Castillo-Caro P, Hazrat Y, Wu MF, Liu H, et al. Ultra low-dose IL-2 for GVHD prophylaxis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation mediates expansion of regulatory T cells without diminishing antiviral and antileukemic activity. *Clin Cancer Res.* 2014;20(8):2215-25.
80. Williams KM, Gress RE. Immune reconstitution and implications for immunotherapy following haematopoietic stem cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2008;21(3):579-96.
81. Marie-Cardine A, Divay F, Dutot I, Green A, Perdrix A, Boyer O, et al. Transitional B cells in humans: characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Immunol.* 2008;127(1):14-25.
82. Abdel-Azim H, Elshoury A, Mahadeo KM, Parkman R, Kapoor N. Humoral Immune Reconstitution Kinetics after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Children: A Maturation Block of IgM Memory B Cells May Lead to Impaired Antibody Immune Reconstitution. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2017;23(9):1437-46.
83. Clave E, Busson M, Douay C, Peffault de Latour R, Berrou J, Rabian C, et al. Acute graft-versus-host disease transiently impairs thymic output in young patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2009;113(25):6477-84.
84. Leen AM, Heslop HE, Brenner MK. Antiviral T-cell therapy. *Immunol Rev.* 2014;258(1):12-29.
85. Kaeuferle T, Krauss R, Blaeschke F, Willier S, Feuchtinger T. Strategies of adoptive T - cell transfer to treat refractory viral infections post allogeneic stem cell transplantation. *J Hematol Oncol.* 2019;12(1):13.

86. Kallay K, Kassa C, Reti M, Karaszi E, Sinko J, Goda V, et al. Early Experience With CliniMACS Prodigy CCS (IFN-gamma) System in Selection of Virus-specific T Cells From Third-party Donors for Pediatric Patients With Severe Viral Infections After Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *J Immunother.* 2018;41(3):158-63.
87. 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.
88. Borchers S, Bremm M, Lehrnbecher T, Dammann E, Pabst B, Wölk B, et al. Sequential anti-cytomegalovirus response monitoring may allow prediction of cytomegalovirus reactivation after allogeneic stem cell transplantation. *PLoS One.* 2012;7(12):e50248.
89. Cwynarski K, Ainsworth J, Cobbold M, Wagner S, Mahendra P, Apperley J, et al. Direct visualization of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation. *Blood.* 2001;97(5):1232-40.
90. Gratama JW, Boeckh M, Nakamura R, Cornelissen JJ, Brooimans RA, Zaia JA, et al. Immune monitoring with iTAg MHC Tetramers for prediction of recurrent or persistent cytomegalovirus infection or disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: a prospective multicenter study. *Blood.* 2010;116(10):1655-62.
91. Varanasi PR, Ogonek J, Luther S, Dammann E, Stadler M, Ganser A, et al. Cytomegalovirus-specific CD8+ T-cells are associated with a reduced incidence of early relapse after allogeneic stem cell transplantation. *PLoS One.* 2019;14(3):e0213739.
92. Raeiszadeh M, Pachnio A, Begum J, Craddock C, Moss P, Chen FE. Characterization of CMV-specific CD4+ T-cell reconstitution following stem cell transplantation through the use of HLA Class II-peptide tetramers identifies patients at high risk of recurrent CMV reactivation. *Haematologica.* 2015;100(8):e318-22.
93. Drylewicz J, Schellens IM, Gaiser R, Nanlohy NM, Quakkelaar ED, Otten H, et al. Rapid reconstitution of CD4 T cells and NK cells protects against CMV-reactivation after allogeneic stem cell transplantation. *J Transl Med.* 2016;14(1):230.
94. Pourghesari B, Piper KP, McLarnon A, Arrazi J, Bruton R, Clark F, et al. Early reconstitution of effector memory CD4+ CMV-specific T cells protects against CMV reactivation following allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2009;43(11):853-61.
95. Tormo N, Solano C, Benet I, Nieto J, de la Cámara R, Garcia-Noblejas A, et al. Kinetics of cytomegalovirus (CMV) pp65 and IE-1-specific IFN γ CD8+ and CD4+ T cells during episodes of viral DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients: potential implications for the management of active CMV infection. *J Med Virol.* 2010;82(7):1208-15.
96. Suesmuth Y, Mukherjee R, Watkins B, Koura DT, Finstermeier K, Desmarais C, et al. CMV reactivation drives posttransplant T-cell reconstitution and results in defects in the underlying TCR β repertoire. *Blood.* 2015;125(25):3835-50.
97. Yong MK, Cameron PU, Slavin M, Morrissey CO, Bergin K, Spencer A, et al. Identifying Cytomegalovirus (CMV) complications using the Quantiferon-CMV assay after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *J Infect Dis.* 2017.
98. Blyth E, Clancy L, Simms R, Ma CK, Burgess J, Deo S, et al. Donor-derived CMV-specific T cells reduce the requirement for CMV-directed pharmacotherapy after allogeneic stem cell transplantation. *Blood.* 2013;121(18):3745-58.
99. Ciáurriz M, Beloki L, Zabalza A, Bandrés E, Mansilla C, Pérez-Valderrama E, et al. Functional specific-T-cell expansion after first cytomegalovirus reactivation predicts viremia control in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* 2017;19(6).
100. Moins-Teisserenc H, Busson M, Scieux C, Bajzik V, Cayuela JM, Clave E, et al. Patterns of cytomegalovirus reactivation are associated with distinct evolutive profiles of immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Infect Dis.* 2008;198(6):818-26.

101. Krol L, Stuchly J, Hubacek P, Keslova P, Sedlacek P, Stary J, et al. Signature profiles of CMV-specific T-cells in patients with CMV reactivation after hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2011;46(8):1089-98.
102. Meij P, van Esser JW, Niesters HG, van Baarle D, Miedema F, Blake N, et al. Impaired recovery of Epstein-Barr virus (EBV)--specific CD8+ T lymphocytes after partially T-depleted allogeneic stem cell transplantation may identify patients at very high risk for progressive EBV reactivation and lymphoproliferative disease. *Blood.* 2003;101(11):4290-7.
103. Icheva V, Kayser S, Wolff D, Tuve S, Kyzirakos C, Bethge W, et al. Adoptive transfer of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 1-specific T cells as treatment for EBV reactivation and lymphoproliferative disorders after allogeneic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol.* 2013;31(1):39-48.
104. D'Aveni M, Aïssi-Rothé L, Venard V, Salmon A, Falenga A, Decot V, et al. The clinical value of concomitant Epstein Barr virus (EBV)-DNA load and specific immune reconstitution monitoring after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Immunol.* 2011;24(4):224-32.
105. Cobbold M, Khan N, Pourgheysari B, Tauro S, McDonald D, Osman H, et al. Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *J Exp Med.* 2005;202(3):379-86.
106. Annels NE, Kalpoe JS, Bredius RG, Claas EC, Kroes AC, Hislop AD, et al. Management of Epstein-Barr virus (EBV) reactivation after allogeneic stem cell transplantation by simultaneous analysis of EBV DNA load and EBV-specific T cell reconstitution. *Clin Infect Dis.* 2006;42(12):1743-8.
107. Calarota SA, Chiesa A, Zelini P, Comolli G, Minoli L, Baldanti F. Detection of Epstein-Barr virus-specific memory CD4+ T cells using a peptide-based cultured enzyme-linked immunospot assay. *Immunology.* 2013;139(4):533-44.
108. Feuchtinger T, Lücke J, Hamprecht K, Richard C, Handgretinger R, Schumm M, et al. Detection of adenovirus-specific T cells in children with adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 2005;128(4):503-9.
109. Guérin-El Khourouj V, Dalle JH, Pédrón B, Yakouben K, Bensoussan D, Cordeiro DJ, et al. Quantitative and qualitative CD4 T cell immune responses related to adenovirus DNAemia in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011;17(4):476-85.
110. Feucht J, Opherck K, Lang P, Kayser S, Hartl L, Bethge W, et al. Adoptive T-cell therapy with hexon-specific Th1 cells as a treatment of refractory adenovirus infection after HSCT. *Blood.* 2015;125(12):1986-94.
111. Camargo JF, Wieder ED, Kimble E, Benjamin CL, Kolonias DS, Kwon D, et al. Deep functional immunophenotyping predicts risk of cytomegalovirus reactivation after hematopoietic cell transplantation. *Blood.* 2019;133(8):867-77.
112. Pelák O, Stuchlý J, Król L, Hubáček P, Keslová P, Sedláček P, et al. Appearance of cytomegalovirus-specific T-cells predicts fast resolution of viremia post hematopoietic stem cell transplantation. *Cytometry B Clin Cytom.* 2017;92(5):380-8.
113. Huenecke S, Cappel C, Esser R, Pfirrmann V, Salzmann-Manrique E, Betz S, et al. Development of Three Different NK Cell Subpopulations during Immune Reconstitution after Pediatric Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Prognostic Markers in GvHD and Viral Infections. *Front Immunol.* 2017;8:109.
114. Cichocki F, Cooley S, Davis Z, DeFor TE, Schlums H, Zhang B, et al. CD56dimCD57+NKG2C+ NK cell expansion is associated with reduced leukemia relapse after reduced intensity HCT. *Leukemia.* 2016;30(2):456-63.
115. Bouzani M, Ok M, McCormick A, Ebel F, Kurzai O, Morton CO, et al. Human NK cells display important antifungal activity against *Aspergillus fumigatus*, which is directly mediated by IFN- γ release. *J Immunol.* 2011;187(3):1369-76.

116. Gallez-Hawkins GM, Franck AE, Li X, Thao L, Oki A, Gendzekhadze K, et al. Expression of activating KIR2DS2 and KIR2DS4 genes after hematopoietic cell transplantation: relevance to cytomegalovirus infection. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17(11):1662-72.
117. Wikstrom ME, Fleming P, Kuns RD, Schuster IS, Voigt V, Miller G, et al. Acute GVHD results in a severe DC defect that prevents T-cell priming and leads to fulminant cytomegalovirus disease in mice. *Blood*. 2015;126(12):1503-14.
118. Greyer M, Whitney PG, Stock AT, Davey GM, Tebartz C, Bachem A, et al. T Cell Help Amplifies Innate Signals in CD8(+) DCs for Optimal CD8(+) T Cell Priming. *Cell Rep*. 2016;14(3):586-97.
119. Schmid ET, Pang IK, Carrera Silva EA, Bosurgi L, Miner JJ, Diamond MS, et al. AXL receptor tyrosine kinase is required for T cell priming and antiviral immunity. *Elife*. 2016;5.
120. Fuhrmann S, Lachmann R, Streitz M, Hetzer R, Volk HD, Lehmkuhl H, et al. Cyclosporin A and tacrolimus reduce T-cell polyfunctionality but not interferon- γ responses directed at cytomegalovirus. *Immunology*. 2012;136(4):408-13.
121. Zhan X, Brown B, Slobod KS, Hurwitz JL. Inhibition of ex vivo-expanded cytotoxic T-lymphocyte function by high-dose cyclosporine. *Transplantation*. 2003;76(4):739-40.
122. Giacomelli R, Cipriani P, Matucci Cerinic M, Fulminis A, Barattelli G, Pingiotti E, et al. Combination therapy with cyclosporine and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis soon inhibits TNF α production without decreasing TNF α mRNA levels. An in vivo and in vitro study. *Clin Exp Rheumatol*. 2002;20(3):365-72.
123. Strauss G, Osen W, Debatin KM. Induction of apoptosis and modulation of activation and effector function in T cells by immunosuppressive drugs. *Clin Exp Immunol*. 2002;128(2):255-66.
124. Wang H, Grzywacz B, Sukovich D, McCullar V, Cao Q, Lee AB, et al. The unexpected effect of cyclosporin A on CD56+CD16- and CD56+CD16+ natural killer cell subpopulations. *Blood*. 2007;110(5):1530-9.
125. Ohata K, Espinoza JL, Lu X, Kondo Y, Nakao S. Mycophenolic acid inhibits natural killer cell proliferation and cytotoxic function: a possible disadvantage of including mycophenolate mofetil in the graft-versus-host disease prophylaxis regimen. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17(2):205-13.
126. Pelák O, Stuchlý J, Król L, Hubáček P, Keslová P, Sedláček P, et al. Appearance of CMV specific T-cells predicts fast resolution of viremia post hematopoietic Stem cell transplantation. *Cytometry B Clin Cytom*. 2015.
127. Torok-Storb B, Boeckh M, Hoy C, Leisenring W, Myerson D, Gooley T. Association of specific cytomegalovirus genotypes with death from myelosuppression after marrow transplantation. *Blood*. 1997;90(5):2097-102.
128. Marr KA. Delayed opportunistic infections in hematopoietic stem cell transplantation patients: a surmountable challenge. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:265-70.
129. Thursky K, Byrnes G, Grigg A, Szer J, Slavin M. Risk factors for post-engraftment invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2004;34(2):115-21.
130. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis*. 2008;46(12):1813-21.
131. Stuehler C, Kuenzli E, Jaeger VK, Baettig V, Ferracin F, Rajacic Z, et al. Immune Reconstitution After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Association With Occurrence and Outcome of Invasive Aspergillosis. *J Infect Dis*. 2015;212(6):959-67.

132. Orciuolo E, Stanzani M, Canestraro M, Galimberti S, Carulli G, Lewis R, et al. Effects of *Aspergillus fumigatus* gliotoxin and methylprednisolone on human neutrophils: implications for the pathogenesis of invasive aspergillosis. *J Leukoc Biol.* 2007;82(4):839-48.
133. Yamada A, Kataoka T, Nagai K. The fungal metabolite gliotoxin: immunosuppressive activity on CTL-mediated cytotoxicity. *Immunol Lett.* 2000;71(1):27-32.
134. Stanzani M, Orciuolo E, Lewis R, Kontoyiannis DP, Martins SL, St John LS, et al. *Aspergillus fumigatus* suppresses the human cellular immune response via gliotoxin-mediated apoptosis of monocytes. *Blood.* 2005;105(6):2258-65.
135. Johannessen LN, Nilsen AM, Løvik M. The mycotoxins citrinin and gliotoxin differentially affect production of the pro-inflammatory cytokines tumour necrosis factor- α and interleukin-6, and the anti-inflammatory cytokine interleukin-10. *Clin Exp Allergy.* 2005;35(6):782-9.
136. Wichmann G, Herbarth O, Lehmann I. The mycotoxins citrinin, gliotoxin, and patulin affect interferon-gamma rather than interleukin-4 production in human blood cells. *Environ Toxicol.* 2002;17(3):211-8.
137. Sugui JA, Pardo J, Chang YC, Zarembek KA, Nardone G, Galvez EM, et al. Gliotoxin is a virulence factor of *Aspergillus fumigatus*: gliP deletion attenuates virulence in mice immunosuppressed with hydrocortisone. *Eukaryot Cell.* 2007;6(9):1562-9.
138. Sugui JA, Rose SR, Nardone G, Swamydas M, Lee CR, Kwon-Chung KJ, et al. Host immune status-specific production of gliotoxin and bis-methyl-gliotoxin during invasive aspergillosis in mice. *Sci Rep.* 2017;7(1):10977.
139. Pahl HL, Krauss B, Schulze-Osthoff K, Decker T, Traenckner EB, Vogt M, et al. The immunosuppressive fungal metabolite gliotoxin specifically inhibits transcription factor NF- κ B. *J Exp Med.* 1996;183(4):1829-40.
140. Sakamoto H, Egashira S, Saito N, Kirisako T, Miller S, Sasaki Y, et al. Gliotoxin suppresses NF- κ B activation by selectively inhibiting linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC). *ACS Chem Biol.* 2015;10(3):675-81.
141. Zhou X, Zhao A, Goping G, Hirszel P. Gliotoxin-induced cytotoxicity proceeds via apoptosis and is mediated by caspases and reactive oxygen species in LLC-PK1 cells. *Toxicol Sci.* 2000;54(1):194-202.
142. Kupfahl C, Geginat G, Hof H. Gliotoxin-mediated suppression of innate and adaptive immune functions directed against *Listeria monocytogenes*. *Med Mycol.* 2006;44(7):591-9.
143. Vidal-García M, Domingo MP, De Rueda B, Roc L, Delgado MP, Revillo MJ, et al. Clinical validity of bis(methylthio)gliotoxin for the diagnosis of invasive aspergillosis. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;100(5):2327-34.
144. Domingo MP, Colmenarejo C, Martínez-Lostao L, Müllbacher A, Jarne C, Revillo MJ, et al. Bis(methyl)gliotoxin proves to be a more stable and reliable marker for invasive aspergillosis than gliotoxin and suitable for use in diagnosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;73(1):57-64.
145. Cerqueira LB, de Francisco TM, Gasparetto JC, Campos FR, Pontarolo R. Development and validation of an HPLC-MS/MS method for the early diagnosis of aspergillosis. *PLoS One.* 2014;9(4):e92851.
146. Wojtowicz A, Bochud PY. Risk stratification and immunogenetic risk for infections following stem cell transplantation. *Virulence.* 2016;7(8):917-29.
147. McSharry BP, Avdic S, Slobedman B. Human cytomegalovirus encoded homologs of cytokines, chemokines and their receptors: roles in immunomodulation. *Viruses.* 2012;4(11):2448-70.
148. Annibali O, Piccioni L, Tomarchio V, Circhetta E, Sarlo C, Franceschini L, et al. Impact of IFN λ 3/4 single nucleotide polymorphisms on the cytomegalovirus reactivation in autologous stem cell transplant patients. *PLoS One.* 2018;13(7):e0200221.
149. Bravo D, Solano C, Giménez E, Remigia MJ, Corrales I, Amat P, et al. Effect of the IL28B Rs12979860 C/T polymorphism on the incidence and features of active cytomegalovirus infection in allogeneic stem cell transplant patients. *J Med Virol.* 2014;86(5):838-44.

150. Lisboa LF, Egli A, Fairbanks J, O'Shea D, Manuel O, Husain S, et al. CCL8 and the Immune Control of Cytomegalovirus in Organ Transplant Recipients. *Am J Transplant.* 2015;15(7):1882-92.
151. Piao Z, Kim HJ, Choi JY, Hong CR, Lee JW, Kang HJ, et al. Effect of FOXP3 polymorphism on the clinical outcomes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric acute leukemia patients. *Int Immunopharmacol.* 2016;31:132-9.
152. Karimi MH, Motazedian M, Geramizadeh B, Nikeghbalian S, Yaghobi R, Abedi F, et al. Association of the Co-stimulatory Molecules Polymorphisms with CMV Infection in Liver Transplant Recipients. *Int J Organ Transplant Med.* 2011;2(4):171-7.
153. Hurme M, Helminen M. Resistance to human cytomegalovirus infection may be influenced by genetic polymorphisms of the tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 receptor antagonist genes. *Scand J Infect Dis.* 1998;30(5):447-9.
154. Carvalho A, Cunha C, Carotti A, Aloisi T, Guarrera O, Di Ianni M, et al. Polymorphisms in Toll-like receptor genes and susceptibility to infections in allogeneic stem cell transplantation. *Exp Hematol.* 2009;37(9):1022-9.
155. Corrales I, Giménez E, Solano C, Amat P, de la Cámara R, Nieto J, et al. Incidence and dynamics of active cytomegalovirus infection in allogeneic stem cell transplant patients according to single nucleotide polymorphisms in donor and recipient CCR5, MCP-1, IL-10, and TLR9 genes. *J Med Virol.* 2015;87(2):248-55.
156. Bogunia-Kubik K, Jaskula E, Lange A. The presence of functional CCR5 and EBV reactivation after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2007;40(2):145-50.
157. Bogunia-Kubik K, Mlynarczewska A, Jaskula E, Lange A. The presence of IFNG 3/3 genotype in the recipient associates with increased risk for Epstein-Barr virus reactivation after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 2006;132(3):326-32.
158. Wu X, Yao Y, Bao X, Zhou H, Tang X, Han Y, et al. KIR2DS4 and Its Variant KIR1D Are Associated with Acute Graft-versus-Host Disease, Cytomegalovirus, and Overall Survival after Sibling-Related HLA-Matched Transplantation in Patients with Donors with KIR Gene Haplotype A. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016;22(2):220-5.
159. Béziat V, Liu LL, Malmberg JA, Ivarsson MA, Sohlberg E, Björklund AT, et al. NK cell responses to cytomegalovirus infection lead to stable imprints in the human KIR repertoire and involve activating KIRs. *Blood.* 2013;121(14):2678-88.
160. de Rham C, Hadaya K, Bandelier C, Ferrari-Lacraz S, Villard J. Expression of killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) by natural killer cells during acute CMV infection after kidney transplantation. *Transpl Immunol.* 2014;31(3):157-64.
161. Foley BA, De Santis D, Van Beelen E, Lathbury LJ, Christiansen FT, Witt CS. The reactivity of Bw4+ HLA-B and HLA-A alleles with KIR3DL1: implications for patient and donor suitability for haploidentical stem cell transplantations. *Blood.* 2008;112(2):435-43.
162. Lewis RE, Wiederhold NP, Chi J, Han XY, Komanduri KV, Kontoyiannis DP, et al. Detection of gliotoxin in experimental and human aspergillosis. *Infect Immun.* 2005;73(1):635-7.
163. Hoyt R, Ritchie DS, Roberts AW, Macgregor L, Curtis DJ, Szer J, et al. Cyclosporin, methotrexate and prednisolone for graft-versus-host disease prophylaxis in allogeneic peripheral blood progenitor cell transplants. *Bone Marrow Transplant.* 2008;41(7):651-8.
164. Della Chiesa M, Falco M, Muccio L, Bertaina A, Locatelli F, Moretta A. Impact of HCMV Infection on NK Cell Development and Function after HSCT. *Front Immunol.* 2013;4:458.
165. Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods.* 2016;13(9):731-40.
166. Ljungman P, Boeckh M, Hirsch HH, Josephson F, Lundgren J, Nichols G, et al. Definitions of Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Patients for Use in Clinical Trials. *Clin Infect Dis.* 2017;64(1):87-91.

167. Manz R, Assenmacher M, Pflüger E, Miltenyi S, Radbruch A. Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cell-surface affinity matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(6):1921-5.
168. Assenmacher M, Löhning M, Scheffold A, Richter A, Miltenyi S, Schmitz J, et al. Commitment of individual Th1-like lymphocytes to expression of IFN-gamma versus IL-4 and IL-10: selective induction of IL-10 by sequential stimulation of naive Th cells with IL-12 and IL-4. *J Immunol*. 1998;161(6):2825-32.
169. Kim DH, Jung HD, Lee NY, Sohn SK. Single nucleotide polymorphism of CC chemokine ligand 5 promoter gene in recipients may predict the risk of chronic graft-versus-host disease and its severity after allogeneic transplantation. *Transplantation*. 2007;84(7):917-25.
170. Corrales I, Gimenez E, Solano C, Amat P, de la Camara R, Nieto J, et al. Incidence and dynamics of active cytomegalovirus infection in allogeneic stem cell transplant patients according to single nucleotide polymorphisms in donor and recipient CCR5, MCP-1, IL-10, and TLR9 genes. *J Med Virol*. 2015;87(2):248-55.
171. Loeffler J, Steffens M, Arlt EM, Toliat MR, Mezger M, Suk A, et al. Polymorphisms in the genes encoding chemokine receptor 5, interleukin-10, and monocyte chemoattractant protein 1 contribute to cytomegalovirus reactivation and disease after allogeneic stem cell transplantation. *J Clin Microbiol*. 2006;44(5):1847-50.
172. Heo J, Dogra P, Masi TJ, Pitt EA, de Kruijf P, Smit MJ, et al. Novel Human Cytomegalovirus Viral Chemokines, vCXCL-1s, Display Functional Selectivity for Neutrophil Signaling and Function. *J Immunol*. 2015;195(1):227-36.
173. Uhlin M, Mattsson J, Maeurer M. Update on viral infections in lung transplantation. *Curr Opin Pulm Med*. 2012;18(3):264-70.
174. Tu CC, Arnolds KL, O'Connor CM, Spencer JV. Human Cytomegalovirus UL111A and US27 Gene Products Enhance the CXCL12/CXCR4 Signaling Axis via Distinct Mechanisms. *J Virol*. 2018;92(5).
175. Mitsani D, Nguyen MH, Girnita DM, Spichty K, Kwak EJ, Silveira FP, et al. A polymorphism linked to elevated levels of interferon-gamma is associated with an increased risk of cytomegalovirus disease among Caucasian lung transplant recipients at a single center. *J Heart Lung Transplant*. 2011;30(5):523-9.
176. Alakulppi NS, Kyllonen LE, Salo HM, Partanen J, Salmela KT, Laine JT. The impact of donor cytokine gene polymorphisms on the incidence of cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transpl Immunol*. 2006;16(3-4):258-62.
177. Cai XJ, Song AX, Wang H, Zhang P, Zhang GX, Yang F, et al. [Role of IFN-gamma + 874 genetic polymorphisms in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 2012;33(12):989-93.
178. Vu D, Shah T, Ansari J, Sakharkar P, Yasir Q, Naraghi R, et al. Interferon-gamma gene polymorphism +874 A/T is associated with an increased risk of cytomegalovirus infection among Hispanic renal transplant recipients. *Transpl Infect Dis*. 2014;16(5):724-32.
179. Hoffmann TW, Halimi JM, Buchler M, Velge-Roussel F, Goudeau A, Al Najjar A, et al. Association between a polymorphism in the IL-12p40 gene and cytomegalovirus reactivation after kidney transplantation. *Transplantation*. 2008;85(10):1406-11.
180. Wujcicka WI, Wilczynski JS, Nowakowska DE. Association of SNPs from IL1A, IL1B, and IL6 Genes with Human Cytomegalovirus Infection Among Pregnant Women. *Viral Immunol*. 2017;30(4):288-97.
181. Wujcicka W, Wilczynski J, Paradowska E, Studzinska M, Nowakowska D. The role of single nucleotide polymorphisms, contained in proinflammatory cytokine genes, in the development of congenital infection with human cytomegalovirus in fetuses and neonates. *Microb Pathog*. 2017;105:106-16.
182. Cano P, Han FS, Wang HL, Fernandez-Vina M, Han XY. Cytokine gene polymorphisms affect reactivation of cytomegalovirus in patients with cancer. *Cytokine*. 2012;60(2):417-22.

183. Lee HJ, Kim TH, Kang SW, Kim YH, Kim SK, Chung JH, et al. Association Interleukin-4 and Interleukin-4 Receptor Gene Polymorphism and Acute Rejection and Graft Dysfunction After Kidney Transplantation. *Transplant Proc.* 2016;48(3):813-9.
184. Kielsen K, Enevold C, Heilmann C, Sengelov H, Pedersen AE, Ryder LP, et al. Donor Genotype in the Interleukin-7 Receptor alpha-Chain Predicts Risk of Graft-versus-Host Disease and Cytomegalovirus Infection after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol.* 2018;9:109.
185. Chen C, Busson M, Rocha V, Appert ML, Lepage V, Dulphy N, et al. Activating KIR genes are associated with CMV reactivation and survival after non-T-cell depleted HLA-identical sibling bone marrow transplantation for malignant disorders. *Bone Marrow Transplant.* 2006;38(6):437-44.
186. Arav-Boger R, Willoughby RE, Pass RF, Zong JC, Jang WJ, Alcendor D, et al. Polymorphisms of the cytomegalovirus (CMV)-encoded tumor necrosis factor-alpha and beta-chemokine receptors in congenital CMV disease. *J Infect Dis.* 2002;186(8):1057-64.
187. Mariotti J, Maura F, Spina F, Roncari L, Doderio A, Farina L, et al. Impact of cytomegalovirus replication and cytomegalovirus serostatus on the outcome of patients with B cell lymphoma after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20(6):885-90.
188. Wang LR, Dong LJ, Zhang MJ, Lu DP. Correlations of human herpesvirus 6B and CMV infection with acute GVHD in recipients of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2008;42(10):673-7.
189. Widmann T, Sester U, Gärtner BC, Schubert J, Pfreundschuh M, Köhler H, et al. Levels of CMV specific CD4 T cells are dynamic and correlate with CMV viremia after allogeneic stem cell transplantation. *PLoS One.* 2008;3(11):e3634.
190. Sathe A, Ortega SB, Mundy DI, Collins RH, Karandikar NJ. In vitro methotrexate as a practical approach to selective allodepletion. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007;13(6):644-54.
191. Matsue H, Yang C, Matsue K, Edelbaum D, Mummert M, Takashima A. Contrasting impacts of immunosuppressive agents (rapamycin, FK506, cyclosporin A, and dexamethasone) on bidirectional dendritic cell-T cell interaction during antigen presentation. *J Immunol.* 2002;169(7):3555-64.
192. Nishida S, Yoshida LS, Shimoyama T, Nuno H, Kobayashi T, Tsunawaki S. Fungal metabolite gliotoxin targets flavocytochrome b558 in the activation of the human neutrophil NADPH oxidase. *Infect Immun.* 2005;73(1):235-44.
193. Ramirez-Ortiz ZG, Lee CK, Wang JP, Boon L, Specht CA, Levitz SM. A nonredundant role for plasmacytoid dendritic cells in host defense against the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Cell Host Microbe.* 2011;9(5):415-24.
194. Tsunawaki S, Yoshida LS, Nishida S, Kobayashi T, Shimoyama T. Fungal metabolite gliotoxin inhibits assembly of the human respiratory burst NADPH oxidase. *Infect Immun.* 2004;72(6):3373-82.
195. Pardo J, Urban C, Galvez EM, Ekert PG, Müller U, Kwon-Chung J, et al. The mitochondrial protein Bak is pivotal for gliotoxin-induced apoptosis and a critical host factor of *Aspergillus fumigatus* virulence in mice. *J Cell Biol.* 2006;174(4):509-19.
196. Zallio F, Primon V, Tamiasso S, Pini M, Baraldi A, Corsetti MT, et al. Epstein-Barr virus reactivation in allogeneic stem cell transplantation is highly related to cytomegalovirus reactivation. *Clin Transplant.* 2013;27(4):E491-7.
197. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science.* 2011;331(6013):44-9.
198. Schmidt S, Tramsen L, Hanisch M, Latgé JP, Huenecke S, Koehl U, et al. Human natural killer cells exhibit direct activity against *Aspergillus fumigatus* hyphae, but not against resting conidia. *J Infect Dis.* 2011;203(3):430-5.

199. Kupfahl C, Heinekamp T, Geginat G, Ruppert T, Härtl A, Hof H, et al. Deletion of the gliP gene of *Aspergillus fumigatus* results in loss of gliotoxin production but has no effect on virulence of the fungus in a low-dose mouse infection model. *Mol Microbiol.* 2006;62(1):292-302.
200. Spikes S, Xu R, Nguyen CK, Chamilos G, Kontoyiannis DP, Jacobson RH, et al. Gliotoxin production in *Aspergillus fumigatus* contributes to host-specific differences in virulence. *J Infect Dis.* 2008;197(3):479-86.
201. Zhang Q, Lenardo MJ, Baltimore D. 30 Years of NF- κ B: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology. *Cell.* 2017;168(1-2):37-57.
202. Koch PD, Miller HR, Yu G, Tallarico JA, Sorger PK, Wang Y, et al. A High Content Screen in Macrophages Identifies Small Molecule Modulators of STING-IRF3 and NF κ B Signaling. *ACS Chem Biol.* 2018;13(4):1066-81.
203. Du S, Hiramatsu N, Hayakawa K, Kasai A, Okamura M, Huang T, et al. Suppression of NF- κ B by cyclosporin a and tacrolimus (FK506) via induction of the C/EBP family: implication for unfolded protein response. *J Immunol.* 2009;182(11):7201-11.
204. Majumdar S, Aggarwal BB. Methotrexate suppresses NF- κ B activation through inhibition of I κ B phosphorylation and degradation. *J Immunol.* 2001;167(5):2911-20.
205. Spurlock CF, Gass HM, Bryant CJ, Wells BC, Olsen NJ, Aune TM. Methotrexate-mediated inhibition of nuclear factor κ B activation by distinct pathways in T cells and fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology (Oxford).* 2015;54(1):178-87.
206. Vafadari R, Kraaijeveld R, Weimar W, Baan CC. Tacrolimus inhibits NF- κ B activation in peripheral human T cells. *PLoS One.* 2013;8(4):e60784.
207. Molinero LL, Alegre ML. Role of T cell-nuclear factor κ B in transplantation. *Transplant Rev (Orlando).* 2012;26(3):189-200.
208. Mami-Chouaib F, Ameyar M, Dorothée G, Bentires-Alj M, Dziembowska M, Delhalle S, et al. Effect of nuclear factor κ B inhibition on tumor cell sensitivity to natural killer-mediated cytolytic function. *Eur J Immunol.* 2001;31(2):433-9.
209. Tischer S, Dieks D, Sukdolak C, Bunse C, Figueiredo C, Immenschuh S, et al. Evaluation of suitable target antigens and immunoassays for high-accuracy immune monitoring of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus-specific T cells as targets of interest in immunotherapeutic approaches. *J Immunol Methods.* 2014;408:101-13.
210. Fayard A, Dagueneat E, Blaise D, Chevallier P, Labussiere H, Berceanu A, et al. Evaluation of infectious complications after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation with post-transplant cyclophosphamide following reduced-intensity and myeloablative conditioning: a study on behalf of the Francophone Society of Stem Cell Transplantation and Cellular Therapy (SFGM-TC). *Bone Marrow Transplant.* 2019.
211. Ocheni S, Kroeger N, Zabelina T, Sobottka I, Ayuk F, Wolschke C, et al. EBV reactivation and post transplant lymphoproliferative disorders following allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2008;42(3):181-6.
212. Aalto SM, Linnavuori K, Peltola H, Vuori E, Weissbrich B, Schubert J, et al. Immunoreactivation of Epstein-Barr virus due to cytomegalovirus primary infection. *J Med Virol.* 1998;56(3):186-91.
213. Sedláček P, Petterson T, Robin M, Sivaprakasam P, Vainorius E, Brundage T, et al. Incidence of Adenovirus Infection in Hematopoietic Stem Cell Transplantation Recipients: Findings from the AdVance Study. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2019;25(4):810-8.
214. Moins-Teisserenc H, Busson M, Scieux C, Bajzik V, Cayuela JM, Clave E, et al. Patterns of cytomegalovirus reactivation are associated with distinct evolutive profiles of immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Infect Dis.* 2008;198(6):818-26.
215. Abu-Khader A, Krause S. Rapid monitoring of immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation--a comparison of different assays for the detection of cytomegalovirus-specific T cells. *Eur J Haematol.* 2013;91(6):534-45.

216. Tschan-Plessl A, Stern M, Schmied L, Retiere C, Hirsch HH, Garzoni C, et al. Human Cytomegalovirus Infection Enhances NK Cell Activity In Vitro. *Transplant Direct*. 2016;2(7):e89.
217. Jin F, Lin H, Gao S, Wang H, Yan H, Guo J, et al. Characterization of IFN γ -producing natural killer cells induced by cytomegalovirus reactivation after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Oncotarget*. 2017;8(1):51-63.
218. Beziat V, Liu LL, Malmberg JA, Ivarsson MA, Sohlberg E, Bjorklund AT, et al. NK cell responses to cytomegalovirus infection lead to stable imprints in the human KIR repertoire and involve activating KIRs. *Blood*. 2013;121(14):2678-88.
219. Pietersma FL, van Dorp S, Jacobi R, Ran L, Nanlohy NM, Schuurman R, et al. High level of perforin expression in T cells: An early prognostic marker of the severity of herpesvirus reactivation after allogeneic stem cell transplantation in adults. *Clin Infect Dis*. 2010;50(5):717-25.
220. Ozdemir E, Saliba RM, Champlin RE, Couriel DR, Giralt SA, de Lima M, et al. Risk factors associated with late cytomegalovirus reactivation after allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant*. 2007;40(2):125-36.
221. 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;93(2):248-56.
222. Symons HJ, Kesserwan C, Kos F, Thoburn CJ, Munchel AT, Wendy Ying, et al. Favorable Immune Reconstitution After Nonmyeloablative, T-Cell Replete, HLA-Haploidentical BMT with Post-Transplant Cyclophosphamide. 2011.
223. Yang J, Lu Q, Liu W, Wan Z, Wang X, Li R. Cyclophosphamide reduces dectin-1 expression in the lungs of naive and *Aspergillus fumigatus*-infected mice. *Med Mycol*. 2010;48(2):303-9.
224. Behrendt CE, Nakamura R, Forman SJ, Zaia JA. Donor killer immunoglobulin-like receptor genes and reactivation of cytomegalovirus after HLA-matched hematopoietic stem-cell transplantation: HLA-C allotype is an essential cofactor. *Front Immunol*. 2013;4:36.
225. Zaia JA, Sun JY, Gallez-Hawkins GM, Thao L, Oki A, Lacey SF, et al. The effect of single and combined activating killer immunoglobulin-like receptor genotypes on cytomegalovirus infection and immunity after hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15(3):315-25.
226. Martinez-Laperche C, Buces E, Aguilera-Morillo MC, Picornell A, Gonzalez-Rivera M, Lillo R, et al. A novel predictive approach for GVHD after allogeneic SCT based on clinical variables and cytokine gene polymorphisms. *Blood Adv*. 2018;2(14):1719-37.
227. Esposito S, Bosis S, Orenti A, Spena S, Montinaro V, Bianchini S, et al. Genetic polymorphisms and the development of invasive bacterial infections in children. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2016;29(1):99-104.
228. Sellathamby S, Lakshmi KM, Busson M, Viswabandya A, George B, Mathews V, et al. Polymorphisms in the immunoregulatory genes are associated with hematopoietic recovery and increased susceptibility to bacterial infections in patients with thalassaemia major undergoing matched related hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18(8):1219-26.
229. Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor- α promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol*. 1997;34(5):391-9.
230. van de Berg PJ, Heutinck KM, Raabe R, Minnee RC, Young SL, van Donselaar-van der Pant KA, et al. Human cytomegalovirus induces systemic immune activation characterized by a type 1 cytokine signature. *J Infect Dis*. 2010;202(5):690-9.
231. Musgrave BL, Watson CL, Hoskin DW. CD2-CD48 interactions promote cytotoxic T lymphocyte induction and function: anti-CD2 and anti-CD48 antibodies impair cytokine synthesis, proliferation, target recognition/adhesion, and cytotoxicity. *J Interferon Cytokine Res*. 2003;23(2):67-81.

232. Jaskula E, Dlubek D, Duda D, Bogunia-Kubik K, Mlynarczewska A, Lange A. Interferon gamma 13-CA-repeat homozygous genotype and a low proportion of CD4(+) lymphocytes are independent risk factors for cytomegalovirus reactivation with a high number of copies in hematopoietic stem cell transplantation recipients. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15(10):1296-305.
233. Pando MJ, Gardiner CM, Gleimer M, McQueen KL, Parham P. The protein made from a common allele of KIR3DL1 (3DL1*004) is poorly expressed at cell surfaces due to substitution at positions 86 in Ig domain 0 and 182 in Ig domain 1. *J Immunol.* 2003;171(12):6640-9.
234. Alicata C, Pende D, Meazza R, Canevali P, Loiacono F, Bertaina A, et al. Hematopoietic stem cell transplantation: Improving alloreactive Bw4 donor selection by genotyping codon 86 of KIR3DL1/S1. *Eur J Immunol.* 2016;46(6):1511-7.
235. Brull DJ, Montgomery HE, Sanders J, Dhamrait S, Luong L, Rumley A, et al. Interleukin-6 gene -174g>c and -572g>c promoter polymorphisms are strong predictors of plasma interleukin-6 levels after coronary artery bypass surgery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(9):1458-63.
236. Bennermo M, Held C, Stemme S, Ericsson CG, Silveira A, Green F, et al. Genetic predisposition of the interleukin-6 response to inflammation: implications for a variety of major diseases? *Clin Chem.* 2004;50(11):2136-40.
237. Schlüter B, Raufhake C, Erren M, Schotte H, Kipp F, Rust S, et al. Effect of the interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C) on the incidence and outcome of sepsis. *Crit Care Med.* 2002;30(1):32-7.

ANEXOS

Anexo 1. Listado de los 213 polimorfismos (SNPs e INDELS) analizados en las 85 parejas receptor-donante del Bloque III.

Gen	Posición	Referencia	Variante	HGVSc	HGVSp	Efecto de la variante	dbSNP	MAF
CCL4	36105271	T	A	ENST00000615863.1:c.238T>A	ENSP00000482259.1:p.Ser80Thr	Variante " missense"	rs1719152	0.249
CCL5	35879999	A	G	ENST00000603197.5:c.76+231T>C		Variante intrónica	rs2280789	0.113
CCL8	34320812	A	C	ENST00000394620.1:c.205A>C	ENSP00000378118.1:p.Lys69Gln	Variante " missense"	rs1133763	0.151
CCR5	46373452	TACAGTCA GTATCAATT CTGGAAGA ATTCCAG	T	ENST00000292303.4:c.554_585delGTCAGTATCA ATTCTGGAAGAATTCCAGACA	ENSP00000292303.4:p.Ser185IlefsTer 32	Variante "frameshift"	rs562091107	0.110
CCR8	39332411	C	G	ENST00000326306.4:c.80C>G	ENSP00000326432.4:p.Ala27Gly	Variante " missense"	rs2853699	0.298
CD48	160684968	C	G	ENST00000613788.1:c.304G>C	ENSP00000484431.1:p.Glu102Gln	Variante " missense"	rs2295615	0.105
CXCL12	44382053	T	C	ENST00000395794.2:c.62-1173A>G		Variante intrónica	rs11592974	0.191
CXCL12	44382666	A	G	ENST00000395794.2:c.62-1786T>C		Variante intrónica	rs17879548	0.101
CXCL12	44383610	G	T	ENST00000395794.2:c.61+1335C>A		Variante intrónica	rs191790682	0.101
CXCL12	44380434	C	G	ENST00000395794.2:c.179+329G>C		Variante intrónica	rs2839688	0.109
CXCL12	44378544	C	CCT	ENST00000395794.2:c.266+91_266+92dupAG		Variante intrónica	rs2839694	0.259
CXCL12	44378401	A	G	ENST00000395794.2:c.266+236T>C		Variante intrónica	rs2839695	0.196
CXCL12	44383265	G	A	ENST00000395794.2:c.61+1680C>T		Variante intrónica	rs3780891	0.101
CXCL12	44383193	T	C	ENST00000395794.2:c.61+1752A>G		Variante intrónica	rs7088876	0.196
CXCL12	44383384	T	C	ENST00000395794.2:c.61+1561A>G		Variante intrónica	rs7092453	0.198
CXCL12	44384263	A	G	ENST00000395794.2:c.61+682T>C		Variante intrónica	rs7093481	0.297
CXCL12	44384759	C	G	ENST00000395794.2:c.61+186G>C		Variante intrónica	rs72790861	0.297
CXCL12	44384812	T	C	ENST00000395794.2:c.61+133A>G		Variante intrónica	rs72790862	0.297
CXCL12	44383518	C	T	ENST00000395794.2:c.61+1427G>A		Variante intrónica	rs74427555	0.101
CXCL12	44384833	C	T	ENST00000395794.2:c.61+112G>A		Variante intrónica	rs78453259	0.101
FOXP3	49259429	T	C	ENST00000376207.8:c.-22-902A>G		Variante intrónica	rs2232365	0.456
FOXP3	49252667	T	C	ENST00000376207.8:c.1044+459A>G		Variante intrónica	rs2280883	0.350
IFNAR1	33343393	G	C	ENST00000270139.7:c.502G>C	ENSP00000270139.3:p.Val168Leu	Variante " missense"	rs2257167	0.129
IFNAR2	33241950	T	G	ENST00000342136.8:c.28T>G	ENSP00000343957.4:p.Phe10Val	Variante " missense"	rs1051393	0.333
IFNG	68157629	T	C	ENST00000229135.3:c.366+284G>A		Variante intrónica	rs1861494	0.272
IFNG	68158742	T	A	ENST00000229135.3:c.115-483A>T		Variante intrónica	rs2430561	0.462
IFNGR1	137198643	T	C	ENST00000367739.8:c.862-4A>G		splice region variant	rs3799488	0.130
IFNGR2	33415005	A	G	ENST00000381995.5:c.248A>G	ENSP00000371425.1:p.Gln83Arg	Variante " missense"	rs9808753	0.143
IFNL1	39298475	A	G	ENST00000333625.2:c.562A>G	ENSP00000329991.1:p.Asn188Asp	Variante " missense"	rs30461	0.112
IFNL2	39269795	T	C	ENST00000331982.5:c.478T>C	ENSP00000333639.4:p.Tyr160His	Variante " missense"	rs59746524	0.208
IFNL2	39269551	A	G	ENST00000331982.5:c.334A>G	ENSP00000333639.4:p.Thr112Ala	Variante " missense"	rs8103362	0.226
IFNL3	39244466	T	C	ENST00000413851.2:c.209A>G	ENSP00000409000.2:p.Lys70Arg	Variante " missense"	rs8103142	0.312
IL10	206771300	C	T	ENST00000423557.1:c.225+56A>G		Variante intrónica	rs1518111	0.221
IL10	206770368	G	C	ENST00000423557.1:c.379-474C>G		Variante intrónica	rs1878672	0.453

IL10	206770767	T	A	ENST00000423557.1:c.378+140A>T		Variante intrónica	rs3024492	0.222
IL10	206770623	C	A	ENST00000423557.1:c.378+284G>T		Variante intrónica	rs3024493	0.166
IL10	206769068	C	T	ENST00000423557.1:c.445-340G>A		Variante intrónica	rs3024495	0.168
IL10RA	117998955	G	A	ENST00000227752.7:c.1051A>G	ENSP00000227752.3:p.Arg351Gly	Variante " missense"	rs2229113	0.318
IL10RA	117993348	A	G	ENST00000227752.7:c.475A>G	ENSP00000227752.3:p.Ser159Gly	Variante " missense"	rs3135932	0.167
IL10RB	33268483	A	G	ENST00000290200.6:c.139A>G	ENSP00000290200.2:p.Lys47Glu	Variante " missense"	rs2834167	0.268
IL12A	159994267	T	G	ENST00000305579.6:c.606+423G>T		Variante intrónica	rs2227314	0.468
IL12A	159991864	T	C	ENST00000305579.6:c.265-1148T>C		Variante intrónica	rs2243123	0.248
IL12A	159994271	A	C	ENST00000305579.6:c.606+427A>C		Variante intrónica	rs2243131	0.149
IL12A	159995206	G	C	ENST00000305579.6:c.607-198G>C		Variante intrónica	rs2243135	0.383
IL12A	159995300	T	C	ENST00000305579.6:c.607-104T>C		Variante intrónica	rs2243136	0.133
IL12A	159992541	G	C	ENST00000305579.6:c.265-471G>C		Variante intrónica	rs475825	0.149
IL12A	159992214	T	A	ENST00000305579.6:c.265-798A>T		Variante intrónica	rs582054	0.468
IL12A	159992311	C	A	ENST00000305579.6:c.265-701A>C		Variante intrónica	rs582537	0.468
IL12A	159989399	G	A	ENST00000305579.6:c.118+225G>A		Variante intrónica	rs7615589	0.248
IL12RB1	18077598	C	T	ENST00000600835.6:c.467G>A	ENSP00000470788.1:p.Arg156His	Variante " missense"	rs11575926	0.155
IL12RB1	18075808	T	C	ENST00000600835.6:c.641A>G	ENSP00000470788.1:p.Gln214Arg	Variante " missense"	rs11575934	0.311
IL12RB1	18069641	A	G	ENST00000600835.6:c.1094T>C	ENSP00000470788.1:p.Met365Thr	Variante " missense"	rs375947	0.313
IL12RB1	18069603	C	G	ENST00000600835.6:c.1132G>C	ENSP00000470788.1:p.Gly378Arg	Variante " missense"	rs401502	0.312
IL12RB1	18086934	T	A	ENST00000600835.6:c.-109-2A>T		splice acceptor variant	rs393548	0.198
IL1A	112781205	A	G	ENST00000263339.3:c.319+399C>T		Variante intrónica	rs1533463	0.320
IL1A	112782628	T	G	ENST00000263339.3:c.96+88C>A		Variante intrónica	rs1609682	0.322
IL1A	112782600	C	T	ENST00000263339.3:c.96+116G>A		Variante intrónica	rs1894399	0.287
IL1A	112782507	A	G	ENST00000263339.3:c.96+209C>T		Variante intrónica	rs2071373	0.321
IL1A	112779775	T	G	ENST00000263339.3:c.320-109A>C		Variante intrónica	rs2071374	0.268
IL1A	112777861	C	T	ENST00000263339.3:c.615+126G>A		Variante intrónica	rs2071375	0.287
IL1A	112777818	T	G	ENST00000263339.3:c.615+169C>A		Variante intrónica	rs2071376	0.322
IL1A	112784348	G	A	ENST00000263339.3:c.-9+95C>T		Variante intrónica	rs2856837	0.287
IL1A	112782395	G	A	ENST00000263339.3:c.96+321C>T		Variante intrónica	rs2856838	0.391
IL1A	112779762	A	G	ENST00000263339.3:c.320-96T>C		Variante intrónica	rs2856841	0.287
IL1A	112784242	A	T	ENST00000263339.3:c.-9+201A>T		Variante intrónica	rs3783525	0.322
IL1A	112784230	C	T	ENST00000263339.3:c.-9+213A>G		Variante intrónica	rs3783526	0.321
IL1A	112781202	A	G	ENST00000263339.3:c.319+402C>T		Variante intrónica	rs3783533	0.321
IL1A	112779074	G	A	ENST00000263339.3:c.490+422T>C		Variante intrónica	rs3783543	0.322
IL1A	112777253	C	G	ENST00000263339.3:c.615+734C>G		Variante intrónica	rs3783546	0.322
IL1A	112775308	T	G	ENST00000263339.3:c.616-41C>A		Variante intrónica	rs3783550	0.322
IL1A	112779646	C	A	ENST00000263339.3:c.340G>T	ENSP00000263339.3:p.Ala114Ser	Variante " missense"	rs17561	0.287
IL1B	112831756	C	T	ENST00000263341.6:c.467-334G>A		Variante intrónica	rs1143637	0.245
IL1B	112831216	C	T	ENST00000263341.6:c.597+76G>A		Variante intrónica	rs1143639	0.245
IL1B	112831178	CAA	C	ENST00000263341.6:c.597+112_597+113delTT		Variante intrónica	rs1143640	0.245
IL1B	112830725	C	T	ENST00000263341.6:c.598-152G>A		Variante intrónica	rs1143643	0.338

IL1B	112835315	GA	G	ENST00000263341.6:c.99+250delT		Variante intrónica	rs3917354	0.204
IL1B	112834786	C	T	ENST00000263341.6:c.99+780G>A		Variante intrónica	rs3917356	0.436
IL1RL1	102351751	C	A	ENST00000233954.5:c.1501C>A	ENSP00000233954.1:p.Gln501Lys	Variante " missense"	rs10192036	0.405
IL1RL1	102351896	C	T	ENST00000233954.5:c.1646C>T	ENSP00000233954.1:p.Thr549Ile	Variante " missense"	rs10192157	0.405
IL1RL1	102351752	A	G	ENST00000233954.5:c.1502A>G	ENSP00000233954.1:p.Gln501Arg	Variante " missense"	rs10204137	0.405
IL1RL1	102351902	T	C	ENST00000233954.5:c.1652T>C	ENSP00000233954.1:p.Leu551Ser	Variante " missense"	rs10206753	0.405
IL1RL1	102339008	C	A	ENST00000233954.5:c.233C>A	ENSP00000233954.1:p.Ala78Glu	Variante " missense"	rs1041973	0.237
IL1RL1	102351547	G	A	ENST00000233954.5:c.1297G>A	ENSP00000233954.1:p.Ala433Thr	Variante " missense"	rs4988956	0.405
IL1RL2	102235248	T	C	ENST00000264257.6:c.1649T>C	ENSP00000264257.2:p.Leu550Pro	Variante " missense"	rs2302612	0.189
IL1RN	113129906	C	T	ENST00000259206.9:c.214+242C>T		Variante intrónica	rs2071459	0.137
IL1RN	113129758	T	G	ENST00000259206.9:c.214+94T>G		Variante intrónica	rs2232354	0.204
IL1RN	113119446	A	G	ENST00000259206.9:c.11-620G>A		Variante intrónica	rs2592346	0.428
IL1RN	113119202	A	G	ENST00000259206.9:c.11-864G>A		Variante intrónica	rs2637988	0.429
IL1RN	113129881	G	T	ENST00000259206.9:c.214+217G>T		Variante intrónica	rs408392	0.292
IL1RN	113129685	C	T	ENST00000259206.9:c.214+21C>T		Variante intrónica	rs423904	0.292
IL1RN	113118176	C	G	ENST00000259206.9:c.10+148C>G		Variante intrónica	rs4251969	0.290
IL1RN	113118196	A	G	ENST00000259206.9:c.10+168A>G		Variante intrónica	rs4251970	0.290
IL1RN	113118490	G	A	ENST00000259206.9:c.10+462A>G		Variante intrónica	rs4251972	0.281
IL1RN	113118501	C	G	ENST00000259206.9:c.10+473C>G		Variante intrónica	rs4251974	0.289
IL1RN	113118583	A	G	ENST00000259206.9:c.10+555A>G		Variante intrónica	rs4251975	0.289
IL1RN	113118603	C	A	ENST00000259206.9:c.10+575C>A		Variante intrónica	rs4251976	0.289
IL1RN	113119125	G	A	ENST00000259206.9:c.11-941G>A		Variante intrónica	rs4251981	0.289
IL1RN	113119442	A	G	ENST00000259206.9:c.11-624A>G		Variante intrónica	rs4251983	0.288
IL1RN	113119649	A	G	ENST00000259206.9:c.11-417A>G		Variante intrónica	rs4251984	0.289
IL1RN	113119836	G	T	ENST00000259206.9:c.11-230G>T		Variante intrónica	rs4251985	0.288
IL1RN	113124439	GC	G	ENST00000259206.9:c.74-3241delC		Variante intrónica	rs4251999	0.433
IL1RN	113126824	G	A	ENST00000259206.9:c.74-865G>A		Variante intrónica	rs439154	0.428
IL1RN	113129822	G	A	ENST00000259206.9:c.214+158G>A		Variante intrónica	rs442710	0.292
IL1RN	113129696	G	A	ENST00000259206.9:c.214+32G>A		Variante intrónica	rs446433	0.292
IL1RN	113130095	A	G	ENST00000259206.9:c.214+431A>G		Variante intrónica	rs447713	0.292
IL1RN	113129717	G	C	ENST00000259206.9:c.214+53G>C		Variante intrónica	rs495282	0.292
IL1RN	113129761	A	C	ENST00000259206.9:c.214+97A>C		Variante intrónica	rs495410	0.292
IL1RN	113120136	A	C	ENST00000259206.9:c.73+8A>C		splice region variant	rs878972	0.289
IL2	122454980	G	A	ENST00000226730.4:c.208-1127C>T		Variante intrónica	rs2069778	0.151
IL2RA	6024237	C	G	ENST00000379959.7:c.367+7G>C		splice region variant	rs11256369	0.231
IL2RB	37128579	G	T	ENST00000216223.9:c.1173C>A	ENSP00000216223.5:p.Asp391Glu	Variante " missense"	rs228942	0.184
IL2RB	37136401	G	A	ENST00000216223.9:c.538-8C>T		splice region variant	rs3218297	0.126
IL4	132675473	GC	G	ENST00000231449.6:c.183+969delC		Variante intrónica	rs11479198	0.168
IL4	132677487	G	C	ENST00000231449.6:c.184-2227C>G		Variante intrónica	rs2227282	0.276
IL4	132677033	G	T	ENST00000231449.6:c.183+2527T>G		Variante intrónica	rs2227284	0.276
IL4	132677607	G	C	ENST00000231449.6:c.184-2107C>G		Variante intrónica	rs2243263	0.100

IL4	132678097	G	A	ENST00000231449.6:c.184-1617G>A		Variante intrónica	rs2243266	0.168
IL4	132678194	G	C	ENST00000231449.6:c.184-1520G>C		Variante intrónica	rs2243267	0.169
IL4	132678271	A	C	ENST00000231449.6:c.184-1443A>C		Variante intrónica	rs2243268	0.167
IL4	132678319	TAA	T	ENST00000231449.6:c.184-1393_184-1392delAA		Variante intrónica	rs2243269	0.168
IL4	132678417	A	G	ENST00000231449.6:c.184-1297A>G		Variante intrónica	rs2243270	0.176
IL4	132680862	C	A	ENST00000231449.6:c.360+972C>A		Variante intrónica	rs2243282	0.169
IL4	132681300	G	A	ENST00000231449.6:c.361-1186G>A		Variante intrónica	rs2243284	0.177
IL4	132681301	G	T	ENST00000231449.6:c.361-1185T>G		Variante intrónica	rs2243285	0.100
IL4	132675034	C	T	ENST00000231449.6:c.183+528C>T		Variante intrónica	rs734244	0.168
IL4R	27363079	A	G	ENST00000395762.6:c.1727A>G	ENSP00000379111.2:p.Gln576Arg	Variante " missense"	rs1801275	0.208
IL4R	27344882	A	G	ENST00000395762.6:c.223A>G	ENSP00000379111.2:p.Ile75Val	Variante " missense"	rs1805010	0.425
IL4R	27362551	A	C	ENST00000395762.6:c.1199A>C	ENSP00000379111.2:p.Glu400Ala	Variante " missense"	rs1805011	0.106
IL4R	27362643	T	C	ENST00000395762.6:c.1291T>C	ENSP00000379111.2:p.Cys431Arg	Variante " missense"	rs1805012	0.102
IL4R	27362859	T	C	ENST00000395762.6:c.1507T>C	ENSP00000379111.2:p.Ser503Pro	Variante " missense"	rs1805015	0.152
IL6	22728505	C	A	ENST00000404625.5:c.211-188C>A		Variante intrónica	rs1474347	0.485
IL6	22728289	C	G	ENST00000404625.5:c.211-404C>G		Variante intrónica	rs1474348	0.485
IL6	22729088	A	G	ENST00000404625.5:c.324+282T>G		Variante intrónica	rs1554606	0.470
IL6	22727026	C	G	ENST00000404625.5:c.-84-153C>G		Variante intrónica	rs1800795	0.485
IL6	22726602	A	G	ENST00000404625.5:c.-85+344A>G		Variante intrónica	rs1800797	0.470
IL6	22727814	A	G	ENST00000404625.5:c.210+180A>G		Variante intrónica	rs2069832	0.485
IL6	22728953	C	G	ENST00000404625.5:c.324+147C>G		Variante intrónica	rs2069840	0.332
IL6	22730530	G	T	ENST00000404625.5:c.471+870G>A		Variante intrónica	rs2069845	0.433
IL6	22726814	T	A	ENST00000404625.5:c.-84-365T>A		Variante intrónica	rs7802307	0.495
IL6	22726815	T	A	ENST00000404625.5:c.-84-364T>A		Variante intrónica	rs7802308	0.191
IL6R	154454494	A	C	ENST00000368485.7:c.1073A>C	ENSP00000357470.3:p.Asp358Ala	Variante " missense"	rs2228145	0.360
IL7R	35875491	T	A	ENST00000303115.7:c.801-21A>T		Variante intrónica	rs987106	0.445
IL7R	35871088	A	G	ENST00000303115.7:c.412G>A	ENSP00000306157.3:p.Val138Ile	Variante " missense"	rs1494555	0.296
IL7R	35860966	C	T	ENST00000303115.7:c.197T>C	ENSP00000306157.3:p.Ile66Thr	Variante " missense"	rs1494558	0.302
IL7R	35876172	A	G	ENST00000303115.7:c.1066A>G	ENSP00000306157.3:p.Ile356Val	Variante " missense"	rs3194051	0.282
IL7R	35874473	C	T	ENST00000303115.7:c.731C>T	ENSP00000306157.3:p.Thr244Ile	Variante " missense"	rs6897932	0.271
KIR2DL1	54771302	G	A	ENST00000336077.10:c.70+418G>A		intron variant	rs376251430	0.157
KIR2DL1	54775198	T	C	ENST00000336077.10:c.404T>C	ENSP00000336769.5:p.Leu135Pro	Variante " missense"	rs11673144	0.443
KIR2DL1	54769863	G	T	ENST00000336077.10:c.13G>T	ENSP00000336769.5:p.Val5Phe	Variante " missense"	rs2304224	0.306
KIR2DL1	54783002	C	T	ENST00000336077.10:c.796C>T	ENSP00000336769.5:p.Arg266Cys	Variante " missense"	rs34721508	0.154
KIR2DL3	54747356	C	T	ENST00000342376.3:c.686C>T	ENSP00000342215.3:p.Pro229Leu	Variante " missense"	rs35861855	0.284
KIR2DS4	54837818	C	A	ENST00000339924.12:c.313C>A	ENSP00000340011.8:p.Pro105Thr	Variante " missense"	rs1130492	0.189
KIR2DS4	54839524	A	G	ENST00000339924.12:c.467A>G	ENSP00000340011.8:p.Lys156Arg	Variante " missense"	rs4806590	0.290
KIR2DS4	54837576	G	A	ENST00000339924.12:c.71G>A	ENSP00000340011.8:p.Gly24Glu	Variante " missense"	rs58731871	0.189
KIR3DL1	54818467	A	T	ENST00000391728.8:c.223A>T	ENSP00000375608.4:p.Ile75Leu	Variante " missense"	rs1049150	0.371
KIR3DL1	54821684	G	C	ENST00000391728.8:c.775G>C	ENSP00000375608.4:p.Gly259Arg	Variante " missense"	rs1049215	0.146

KIR3DL1	54830120	G	C	ENST00000391728.8:c.1180G>C	ENSP00000375608.4:p.Glu394Gln	Variante " missense"	rs1130513	0.294
KIR3DL1	54818564	C	T	ENST00000391728.8:c.320C>T	ENSP00000375608.4:p.Ser107Leu	Variante " missense"	rs143159382	0.242
KIR3DL1	54818399	G	A	ENST00000391728.8:c.155G>A	ENSP00000375608.4:p.Arg52His	Variante " missense"	rs144994606	0.225
KIR3DL1	54818437	A	G	ENST00000391728.8:c.193A>G	ENSP00000375608.4:p.Arg65Gly	Variante " missense"	rs149123986	0.244
KIR3DL1	54819964	C	T	ENST00000391728.8:c.607C>T	ENSP00000375608.4:p.Pro203Ser	Variante " missense"	rs2273731	0.428
KIR3DL1	54821820	G	T	ENST00000391728.8:c.911G>T	ENSP00000375608.4:p.Trp304Leu	Variante " missense"	rs35974949	0.429
KIR3DL1	54829451	G	A	ENST00000391728.8:c.1091G>A	ENSP00000375608.4:p.Cys364Tyr	Variante " missense"	rs45542639	0.248
KIR3DL1	54829381	A	G	ENST00000391728.8:c.1021A>G	ENSP00000375608.4:p.Ile341Val	Variante " missense"	rs45551936	0.299
KIR3DL1	54816505	C	T	ENST00000391728.8:c.5C>T	ENSP00000375608.4:p.Ser2Leu	Variante " missense"	rs605219	0.174
KIR3DL1	54818446	A	G	ENST00000391728.8:c.202A>G	ENSP00000375608.4:p.Ile68Val	Variante " missense"	rs643347	0.369
KIR3DL2	54853865	G	T	ENST00000326321.7:c.474G>T	ENSP00000325525.3:p.Glu158Asp	Variante " missense"	rs1048270	0.217
KIR3DL2	54852264	C	G	ENST00000326321.7:c.337C>G	ENSP00000325525.3:p.Leu113Val	Variante " missense"	rs3188286	0.268
KIR3DL2	54866553	C	T	ENST00000326321.7:c.1190C>T	ENSP00000325525.3:p.Thr397Met	Variante " missense"	rs3745902	0.300
KIR3DL3	54727239	A	G	ENST00000291860.1:c.356-372G>A		Variante intrónica	rs34614411	0.265
KIR3DL3	54727164	C	A	ENST00000291860.1:c.356-447A>C		Variante intrónica	rs34830246	0.282
KIR3DL3	54727369	C	A	ENST00000291860.1:c.356-242C>A		Variante intrónica	rs34876880	0.449
KIR3DL3	54727502	G	C	ENST00000291860.1:c.356-109C>G		Variante intrónica	rs35093205	0.405
KIR3DL3	54727323	C	T	ENST00000291860.1:c.356-288C>T		Variante intrónica	rs35508109	0.172
KIR3DL3	54727304	G	A	ENST00000291860.1:c.356-307A>G		Variante intrónica	rs35910454	0.302
KIR3DL3	54726137	G	A	ENST00000291860.1:c.155G>A	ENSP00000291860.1:p.Arg52His	Variante " missense"	rs113988102	0.305
KIR3DL3	54735264	C	A	ENST00000291860.1:c.961A>C	ENSP00000291860.1:p.Asn321His	Variante " missense"	rs602444	0.480
KIR3DL3	54727702	G	T	ENST00000291860.1:c.447G>T	ENSP00000291860.1:p.Arg149Ser	Variante " missense"	rs62132665	0.105
LTA	31573007	C	A	ENST00000454783.5:c.179C>A	ENSP00000403495.1:p.Thr60Asn	Variante " missense"	rs1041981	0.306
LTA	31572779	T	C	ENST00000454783.5:c.37T>C	ENSP00000403495.1:p.Cys13Arg	Variante " missense"	rs2229094	0.287
TGFB1	41346210	C	T	ENST00000221930.5:c.517-1346A>G		Variante intrónica	rs1989457	0.426
TGFB1	41342943	G	A	ENST00000221930.5:c.635-696T>C		Variante intrónica	rs10416269	0.417
TGFB1	41339408	C	T	ENST00000221930.5:c.860+2475G>A		Variante intrónica	rs11466344	0.218
TGFB1	41337556	T	C	ENST00000221930.5:c.860+4327A>G		Variante intrónica	rs11466345	0.103
TGFB1	41351499	C	T	ENST00000221930.5:c.355+1191A>G		Variante intrónica	rs12462166	0.315
TGFB1	41351534	A	G	ENST00000221930.5:c.355+1156C>T		Variante intrónica	rs12983775	0.315
TGFB1	41351804	TGGGGGG GCTCGCTG CTC	T	ENST00000221930.5:c.355+885_355+886insGA GCAGCGAGCCCCC		Variante intrónica	rs150460951	0.316
TGFB1	41350981	C	A	ENST00000221930.5:c.355+1709T>G		Variante intrónica	rs2241715	0.314
TGFB1	41348147	A	C	ENST00000221930.5:c.516+148G>T		Variante intrónica	rs2241717	0.431
TGFB1	41339853	C	G	ENST00000221930.5:c.860+2030G>C		Variante intrónica	rs2278422	0.427
TGFB1	41333726	T	C	ENST00000221930.5:c.861-1445A>G		Variante intrónica	rs8105161	0.168
TGFB1	41348629	A	T	ENST00000221930.5:c.356-174A>T		Variante intrónica	rs8108632	0.433
TGFB1	41353016	A	G	ENST00000221930.5:c.29C>T	ENSP00000221930.4:p.Pro10Leu	Variante " missense"	rs1800470	0.382
TGFB2	218347501	G	A	ENST00000366929.4:c.346+454G>A		Variante intrónica	rs10482724	0.163
TGFB2	218402545	A	G	ENST00000366929.4:c.431-2624A>G		Variante intrónica	rs10746379	0.134

TGFB2	218350962	A	G	ENST00000366929.4:c.346+3915A>G	Variante intrónica	rs11581605	0.226
TGFB2	218401860	G	A	ENST00000366929.4:c.431-3309G>A	Variante intrónica	rs1317681	0.166
TGFB2	218350388	C	T	ENST00000366929.4:c.346+3341C>T	Variante intrónica	rs1417488	0.249
TGFB2	218350308	G	A	ENST00000366929.4:c.346+3261G>A	Variante intrónica	rs1418555	0.225
TGFB2	218409436	T	C	ENST00000366929.4:c.594+4104T>C	Variante intrónica	rs17047804	0.127
TGFB2	218375179	C	T	ENST00000366929.4:c.430+11762C>T	Variante intrónica	rs17558745	0.295
TGFB2	218380187	C	T	ENST00000366929.4:c.430+16770C>T	Variante intrónica	rs2009112	0.384
TGFB2	218384985	A	C	ENST00000366929.4:c.431-20184C>A	Variante intrónica	rs2027566	0.373
TGFB2	218415855	T	C	ENST00000366929.4:c.594+10523T>C	Variante intrónica	rs2796813	0.425
TGFB2	218377666	T	G	ENST00000366929.4:c.430+14249T>G	Variante intrónica	rs2796817	0.150
TGFB2	218407028	A	G	ENST00000366929.4:c.594+1696A>G	Variante intrónica	rs2796819	0.435
TGFB2	218348267	A	G	ENST00000366929.4:c.346+1220G>A	Variante intrónica	rs2799098	0.197
TGFB2	218379955	A	G	ENST00000366929.4:c.430+16538A>G	Variante intrónica	rs3892225	0.185
TGFB2	218416124	TG	T	ENST00000366929.4:c.594+10797delG	Variante intrónica	rs5781034	0.197
TGFB2	218398415	A	T	ENST00000366929.4:c.431-6754A>T	Variante intrónica	rs61823428	0.128
TGFB2	218347653	A	G	ENST00000366929.4:c.346+606A>G	Variante intrónica	rs6658835	0.269
TGFB2	218384123	G	GA	ENST00000366929.4:c.430+20717delA	Variante intrónica	rs74882313	0.417
TNF	31576412	A	G	ENST00000449264.2:c.187-122A>G	Variante intrónica	rs3093662	0.108

HGVSc: Human Genome Variation Society (HGVS) coding sequence name; HGVSp: HGVS protein sequence name; dbSNP: Single Nucleotide Polymorphism Database; MAF: frecuencia alélica poblacional.

Pasado y presente de la monitorización de la respuesta funcional inmunológica desarrollada frente a Epstein-Barr y Adenovirus en el trasplante de progenitores hematopoyéticos

M. Vallejo Ruiz, E. Soria Saldise, C. Mansilla Puerta, A.
Zabalza San Martín, N. Ramírez

An. Sist. Sanit. Navar. 2018, Vol. 41, Número 1, enero-abril

Pasado y presente de la monitorización de la respuesta funcional inmunológica desarrollada frente a Epstein-Barr y Adenovirus en el trasplante de progenitores hematopoyéticos

Past and present of monitoring the functional immune response developed against Epstein-Barr and Adenovirus in hematopoietic stem cell transplantation

doi.org/10.23938/ASSN.0121

M. Vallejo Ruiz^{1,2}, E. Soria Saldise^{1,2}, C. Mansilla Puerta^{1,2}, A. Zabalza San Martín^{2,3}, N. Ramírez^{1,2}

RESUMEN

Las infecciones víricas por Epstein-Barr (EBV) y Adenovirus (AdV) representan una causa significativa de morbi-mortalidad en pacientes sometidos a un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos debido al uso de tratamientos inmunosupresores y al prolongado periodo de inmunodeficiencia que generan. Hasta el momento, se ha demostrado el papel protector post-trasplante de los linfocitos T CD8+ (CTLs) específicos de EBV y AdV. Sin embargo, otros factores son cada vez más importantes en la regulación de la reconstitución y actividad de CTLs específicos para estos virus, como las diferentes subpoblaciones celulares (linfocitos T CD4+, linfocitos T reguladores, células dendríticas, células *Natural Killer*, etc.), mecanismos moleculares de inmunoregulación y los fármacos administrados al paciente como profilaxis para una posible enfermedad de injerto contra huésped. El objetivo de esta revisión es analizar la importancia de la monitorización de la respuesta celular específica funcional frente a EBV y AdV en el manejo de los pacientes post-trasplante.

Palabras clave. Trasplante hematopoyético. Infección vírica. Reconstitución inmune. Virus Epstein-Barr. Adenovirus.

ABSTRACT

Epstein-Barr (EBV) and Adenovirus (AdV) viral infections represent a significant cause of morbi-mortality in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients due to the use of immunosuppressive treatments and the prolonged period of immunodeficiency that they generate. To date, the post-transplant protective role of EBV and AdV specific CD8+ T lymphocytes (CTLs) has been demonstrated. However, other factors are increasingly important in regulating the reconstitution and activity of CTLs specific to these viruses such as different cell subpopulations (CD4 + T lymphocytes, regulatory T lymphocytes, dendritic cells, Natural Killer cells, etc.), molecular mechanisms of immunoregulation and the drugs administered to the patient as prophylaxis for a possible graft-versus-host disease. The aim of this review is to analyze the importance of monitoring the functional EBV and AdV-specific cellular response in the management of post-transplant recipients.

Keywords. Hematopoietic stem cell transplantation. Viral infection. Immune reconstitution. Epstein-Barr virus. Adenovirus.

An. Sist. Sanit. Navar. 2018; 41 (1): 83-90

1. Grupo de investigación en Oncohematología. Navarrabiomed. Pamplona
2. IdiSNA (Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra). Pamplona.
3. Servicio de Hematología. Complejo Hospitalario de Navarra. Pamplona.

Correspondencia:

Natalia Ramírez
Grupo de investigación en Oncohematología
Navarrabiomed – Fundación Miguel Servet
C/ Iruñlarrea 3
31008 Pamplona
E-mail: nramireh@cfnavarra.es

Financiación: M. Vallejo es beneficiaria de una ayuda para la contratación de doctorandos 2017 de la Dirección General de Industria, Energía e Innovación del Gobierno de Navarra.

C. Mansilla es beneficiaria de una ayuda Juan de la Cierba (incorporación), Ministerio de Economía, Industria y Competitividad del Gobierno de España.

Recepción: 23/06/2017
Aceptación provisional: 18/10/2017
Aceptación definitiva: 14/11/2017

INTRODUCCIÓN

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH) es un procedimiento terapéutico indicado principalmente en enfermedades congénitas y adquiridas que afectan a la médula ósea. Tanto el propio proceso del alo-TPH como la terapia inmunosupresora administrada tras el mismo favorecen la duración de la deficiencia inmunitaria en el periodo post-trasplante, generando en el paciente un microambiente óptimo para el desarrollo de infecciones. Concretamente, hasta un 30% de las muertes por infecciones después del alo-TPH están causadas por virus como Epstein-Barr (EBV) y Adenovirus (AdV), lo cual está relacionado con una alteración en la recuperación del número y función de las células responsables del control de estas infecciones víricas, los linfocitos T (LT) específicos de estos virus¹.

La instauración de protocolos de inmunoterapia adoptiva con LT específicos de EBV y AdV ha demostrado ser una opción terapéutica factible y bien tolerada, que representa un procedimiento rápido y eficaz para la reconstitución inmunológica específica de estos virus post-TPH². En este sentido, Heslop y col describen como, tras la infusión de LT específicos de EBV como profilaxis para este virus post-TPH, ningún paciente desarrolla síndrome linfoproliferativo post-trasplante (SLPT)³. Del mismo modo para AdV, en pacientes con enfermedad o viremia post-TPH la transferencia de LT específicos de AdV permite el aclaramiento de la viremia en el 86% de los pacientes⁴. Recientemente se han descrito novedosas técnicas de edición del genoma (CRISPR/Cas9, TALENs, ZFNs) que pueden ser aplicadas en el desarrollo de productos celulares específicos de antígeno para el manejo terapéutico de infecciones por EBV⁵. En este sentido, la terapia con LT modificados genéticamente para la expresión de receptores antigénicos quiméricos (CARs) permite generar LT autólogos capaces de reconocer antígenos de interés sin requerir restricción por antígenos de histocompatibilidad, conocidos como HLA (del inglés *Human Leukocyte Antigens*).

Una vez infundidos en el paciente, son capaces de expandirse y generar una memoria inmunológica⁶. Estos tratamientos específicos de virus exigen disponer de técnicas de laboratorio específicas y con suficiente sensibilidad para la detección de la respuesta inmunológica desarrollada. Por este motivo, en esta revisión nos proponemos describir los avances realizados hasta el momento en la monitorización de los LT específicos de EBV y AdV en este tipo de pacientes, así como los componentes celulares o humorales que podrían modular su recuperación.

LA RECUPERACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA POST-TPH, UN PROCESO BIOLÓGICO ARDUO E INTERACTIVO

La reconstitución inmunológica después del alo-TPH está mediada por multitud de mecanismos celulares y moleculares complejos y dinámicos que comienzan con la recuperación de la inmunidad innata en las primeras semanas post-TPH. Mientras que, habitualmente, en el primer mes post-TPH la subpoblación de células *natural killer* (NK) es la primera en reconstituirse, la normalización de la subpoblación de LT CD8+ (CTLs) y la de linfocitos B (LB) puede requerir hasta un año, y la de los LT CD4+ (LTh) puede durar hasta los dos años⁷. Es por lo tanto una característica de esta fase, la inversión del ratio CD4:CD8⁸. La duración de este proceso depende, además de factores intrínsecos del paciente como la edad, funcionalidad del timo y patología de base, de otros factores relacionados con el propio trasplante como son el tipo de trasplante, fuente de progenitores hematopoyéticos, régimen de acondicionamiento, compatibilidad HLA donante/receptor y profilaxis farmacológica administrada ante el potencial desarrollo tras el alo-TPH de la enfermedad injerto contra huésped (EICH) o de infecciones⁹. Itzykson y col monitorizan setenta y siete pacientes sometidos a alo-TPH durante veinticuatro meses con el objetivo de determinar los principales factores que influyen en la reconstitución de

las subpoblaciones linfocitarias LTh, CTLs, LB, LT reguladores (LTreg) y células NK. Curiosamente, los primeros factores que afectan a la reconstitución inmunológica son la serología del citomegalovirus (CMV) ya que los receptores con serología positiva poseen CTLs memoria y la replicación de CMV (que desencadena una expansión de estos LT). En segundo lugar, son también importantes otros factores secundarios como la linfopenia y el desarrollo de una EICH post-TPH¹⁰.

El órgano fundamental para la reconstitución inmunológica de los LT es el timo, y su funcionalidad condiciona la recuperación de estas células tras el TPH. Los regímenes de acondicionamiento utilizados, la edad avanzada del paciente y el desarrollo de EICH son devastadores para la función del timo post-TPH¹¹. Tras realizarse el injerto de los progenitores hematopoyéticos en el paciente, se produce una primera fase de expansión de los LT memoria (CD45RO+) infundidos. La limitación de esta fase es que el paciente no recibe con la infusión LT memoria que aporten inmunidad frente a virus a los que el donante no ha sido expuesto. Por esta razón, las guías clínicas recomiendan buscar un donante de acuerdo al status serológico del paciente, ya que cuando la serología es positiva para ambos, la reconstitución inmune es más rápida (antes del día +50), con un riesgo menor de sufrir reactivaciones víricas¹². Una vez que el timo del paciente recupera su funcionalidad, se expanden los LT inmaduros (CD45RA+/CD45RO-CD27+), derivados de las células progenitoras del donante, que poseen un repertorio amplio de receptores de células T (TCR)¹¹. La duración de esta segunda fase depende tanto del daño realizado al timo durante el trasplante como de otros factores como son la intensidad del tratamiento de acondicionamiento, el tratamiento con glucocorticoides por una EICH y el desarrollo de infecciones que afectan a las células epiteliales del timo limitando la funcionalidad de las mismas. Recientemente se han desarrollado estrategias para mejorar la función del timo post-TPH como la administración exógena de interleuquina-7 (IL-7) que, además de favorecer la ti-

mopoyesis, aumenta la proliferación de LT maduros¹³.

Las infecciones víricas ocurren habitualmente entre el mismo día del trasplante y el día +90 aunque se han observado reactivaciones posteriores al día +100 acompañadas de un retraso funcional en la reconstitución inmunológica. Los LT memoria provenientes del donante o de células del paciente que han resistido el régimen de acondicionamiento, son las esenciales para una respuesta rápida y eficaz a una infección primaria o reactivación por EBV y Adv. Sin embargo y sin quitarle importancia a lo previamente afirmado, la clave para la recuperación de la respuesta inmunológica post-TPH específica de virus son los LT inmaduros ya que proporcionan el amplio repertorio de TCR necesario para controlar una amplia variedad de patógenos¹⁴. Recientemente se ha descrito que, al igual que sucede con los virus, es necesaria la completa reconstitución de la inmunidad celular T para la disminución de la incidencia de infección fúngica post-TPH¹⁵.

Después de la fase de neutropenia (a partir del día + 30 post-TPH), la aparición de una EICH es el principal factor que retrasa la recuperación inmune y favorece las reactivaciones víricas. Las infecciones virales tempranas relacionadas con inmunodeficiencia celular T prolongada y disfunción del timo puede indicar EICH subclínica¹⁶. La prevalencia de estas infecciones depende también de la intensidad del tratamiento profiláctico de EICH que actúa directamente sobre la funcionalidad de los LT, siendo estos habitualmente inhibidores de la calcineurina, como Ciclosporina o Tacrolimus, y fármacos inmunosupresores como, el Metotrexato. Los CD4+CD25+Foxp3+ (LTreg) tienen un papel fundamental en el establecimiento de la EICH y las alteraciones en su reconstitución post-TPH contribuyen a este fenómeno, asociándose cuadros más severos de EICH a un menor número de LTreg¹⁷. Existe una correlación entre los LTreg y los CTLs específicos de virus, demostrando que los LTreg influyen en el microambiente óptimo para la reconstitución de la inmunidad funcional¹⁸. Esta subpoblación inmunoregula-

dora expresa altos niveles de receptor de IL-2, por lo que Kennedy-Nasser AA y col tras administrar IL-2 a pacientes en el período post-TPH, observan una expansión in vivo de la subpoblación LTreg regulada, a su vez, por la expresión de la proteína PD-1 y que se asocia a una menor incidencia de infecciones virales y EICH¹⁹.

Por su parte, las células dendríticas (DCs) son las células presentadoras de antígeno por excelencia cuya función consiste en capturar células infectadas por virus, procesarlas y presentar sus antígenos a los CTLs. Wikstrom y col demuestran que la EICH induce un defecto funcional en las DCs que conduce a un fracaso en la generación de CTLs funcionales específicos de virus, demostrando como las DCs favorecen la generación de una respuesta inmunológica competente frente a virus²⁰.

La reconstitución de las células NK post-TPH es un proceso que puede llevar de tres a seis meses durante el cual las células NK CD56^{dim} maduran expresando el receptor NKG2C²¹. Se ha descrito que la presencia de LT maduros procedentes del donante favorece la diferenciación de las células NK post-TPH²². El retraso funcional en la reconstitución inmune post-TPH de estas células se relaciona con una mayor incidencia de EICH y mayor riesgo de sufrir infecciones virales²³. La actividad efectora de las células NK está regulada por el balance entre señales de activación y de inhibición como resultado de la expresión de receptores tipo inmunoglobulina de las células NK (*killer immunoglobulin-like receptor*, KIR).

La interacción de los receptores KIR con sus ligandos antígenos leucocitarios humanos (HLA) de clase I tiene un papel importante en el control de las infecciones virales²⁴. La compatibilidad donante/ receptor en el genotipo de receptores KIR se ha asociado con una menor incidencia de reactivaciones víricas por CMV²⁵. Recientemente, se ha demostrado que la expresión del receptor tirosina quinasa AXL, presente en DCs, NK y células mieloides, es esencial para limitar los efectos inmunosupresores del interferón-I (IFN-I) y permitir la inducción de una respuesta óptima de LT frente a virus²⁶.

ENFERMEDAD LINFOPROLIFERATIVA ASOCIADA A EBV: COMPLICACIÓN CLÍNICA CONDICIONADA POR UNA COMPETENTE RECONSTITUCIÓN INMUNOLÓGICA POST-TPH

El EBV es un virus de la familia *Herpesviridae*, con una prevalencia aproximada del 90% en la población adulta. El virus tras la infección primaria permanece latente en los LB reactivándose durante los períodos de inmunodepresión, pudiendo causar SLPT como consecuencia del tropismo del EBV por los LB del donante y por la capacidad del virus de inducir proliferación celular tras el trasplante. Este fenómeno ocurre típicamente en los primeros 6 meses post-TPH, hecho anterior a la reconstitución inmune de LT específicos de EBV²⁷. La incidencia del SLPT post-TPH es aproximadamente del 4% y se presenta con una gran variedad de síntomas y signos que pueden ir desde un síndrome mononucleósico hasta el desarrollo de pancitopenia que puede progresar rápidamente a linfoma, con una mortalidad asociada del 80%. Se consideran factores de riesgo del SLPT post-TPH: disparidad HLA, discrepancia serológica donante/ receptor, presencia de EICH, depleción de LT y regímenes de acondicionamiento de intensidad reducida, que permiten la presencia de LB residuales²⁸. En los pacientes con alto riesgo de sufrir reactivación del virus se recomienda monitorizar semanalmente la presencia de EBV mediante técnicas de cuantificación de DNA hasta el cuarto mes post-TPH, así como los signos y síntomas que puedan atribuirse al SLPT²⁹.

La monitorización del DNA viral es fundamental para prevenir el desarrollo del SLPT. Wagner y col demostraron que el 50% de los pacientes con una carga viral de EBV >4000 copias/μg de células mononucleadas de sangre periférica desarrollaban SLPT³⁰. Por tanto, la presencia de DNA vírico sin síntomas clínicos se considera indicación de terapia con Rituximab (anticuerpo monoclonal anti-CD20) con una pauta de administración semanal hasta que no se detecte DNA viral³¹. Las deficiencias en la reconstitución inmune de LT y LB post-TPH se asocian con el desarrollo del SLPT. La

reactivación del CMV post-trasplante está estrechamente relacionada con la reactivación del EBV y con el riesgo de sufrir SLPT ya que representa un marcador indirecto de la severidad de la inmunosupresión³². También el retraso en la recuperación de LT CD4-CD8- post-TPH se asocia a una mayor tasa de reactivación por EBV³³.

Estudios previos han descrito que el requisito necesario para tener bajo control la infección por EBV post-TPH y disminuir el riesgo de padecer SLPT es la reconstitución de los LT específicos de EBV, ya que los pacientes que padecen reactivación por EBV presentan un nivel de EBV-CTLs indetectable. Para la detección de dichas células en el período post-TPH se han desarrollado diferentes métodos. Estas técnicas permiten, no solo reducir la indicación de Rituximab a pacientes con déficit en la reconstitución de LT específicos de EBV, sino también identificar pacientes que se puedan beneficiar de inmunoterapia adoptiva con estas células. En este sentido, la técnica denominada ELISPOT (*enzyme-linked immunosorbent spot*) detecta IFN- γ producido por LT CD4+ y CD8+ tras haber sido estimulados con antígenos inmunodominantes de EBV (EBNA), como son las proteínas de fase latente: EBNA1 y EBNA3³⁴. Mediante esta técnica, D'Aveni y col demuestran que un valor de LT específicos de EBV superior a 1000 *spot forming cells*/ 10⁶ células mononucleadas junto con una carga viral < 40000 copias/mL sangre, es suficiente para el aclaramiento del virus sin necesidad de recibir un tratamiento farmacológico con Rituximab³⁵.

Paralelamente, se ha desarrollado la tecnología de multímeros, estructuras moleculares que permiten la identificación, cuantificación, caracterización fenotípica y funcional así como aislamiento de LT específicos de virus. En el caso de EBV, estas células específicas pueden ser visualizadas mediante citometría de flujo ya que el multímero, además de llevar conjugada una molécula de HLA unida a un péptido de EBV (EBNA1, EBNA3 o BMLF-1), se encuentra también unido a un fluorocromo. Utilizando la tecnología de tetrámeros, multímeros que constan de cuatro sitios de unión péptido-HLA, se ha demostrado que el análisis

de EBV-CTLs junto con la cuantificación de DNA es útil para la identificación de los pacientes con alto riesgo de desarrollar SLPT. Mediante esta técnica, el valor predictivo positivo de sufrir SLPT se incrementa de un 39% a un 100% en pacientes que presentan DNA de EBV > 1000 copias/mL en sangre y con niveles de EBV-CTLs <0,5/mm³³⁶.

Actualmente, además de la monitorización de la carga viral, se considera la cuantificación de EBV-CTLs el método óptimo para monitorizar la inmunidad linfocitaria específica de EBV después del alo-TPH ya que el riesgo de sufrir SLPT se correlaciona inversamente con la funcionalidad de EBV-CTLs³⁷. Hasta el momento, aún no hay definido el valor umbral capaz de definir futuras reactivaciones víricas. Aunque la reconstitución de EBV-CTLs ha sido estudiada en detalle y su importancia ha sido demostrada, la respuesta de LT CD4+ específica de este virus está aún mal definida, la cual, se ha demostrado que colabora en la generación de una respuesta competente de CTLs memoria específicos de EBV³⁸.

RECONSTITUCIÓN DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA ESPECÍFICA FRENTE A ADV: MECANISMO BIOLÓGICO EXIGIDO PARA LA RESOLUCIÓN DE LA REACTIVACIÓN POST-TPH

La reactivación por Adv tras el alo-TPH puede cursar como una infección asintomática, enfermedad localizada (cistitis hemorrágica, colitis o neumonía) y/o enfermedad diseminada. La incidencia oscila entre un 5-40% de los alo-TPH, tiene lugar aproximadamente 90 días después del trasplante y se asocia a una mortalidad del 20-80% de los casos³⁹. No existe consenso sobre la monitorización de la viremia en pacientes post-TPH debido, principalmente, a la baja incidencia de este virus. Según la *European Conference on Infections in Leukemia*, se recomiendan monitorizar semanalmente DNA de Adv en pacientes con un factor de riesgo o más⁴⁰. Como factores de riesgo son considerados: depleción de células T, EICH, linfopenia y trasplante de sangre de cordón de donante no emparentado⁴¹. Sin embar-

go, otros autores recomiendan la monitorización a todos los pacientes post-TPH, ya que se ha descrito una correlación entre la carga viral y la mortalidad asociada a la enfermedad por AdV⁴². Una severa linfopenia con un valor < 300 linfocitos/ μL en sangre periférica en el momento de la detección del virus es indicativo de desarrollo de enfermedad por AdV⁴³. Del mismo modo, conteos de LT CD4+ $< 0.15 \times 10^9/\text{L}$ en los primeros 3 meses post-TPH se consideran factor de riesgo de desarrollar adenoviremia⁴⁴.

El único fármaco antiviral aceptado para el tratamiento de la infección por AdV es el Cidofovir. Sin embargo, hay estudios que demuestran que la resolución del virus con este fármaco solo ocurre en pacientes que recuperan la funcionalidad de LT durante el tratamiento⁴⁵. Las opciones terapéuticas para la resolución de la infección en caso de fallo del tratamiento (incremento de la carga viral > 1 log/semana) pasan por la infusión de linfocitos del donante y por avances en la investigación de los LT específicos de AdV⁴⁶. Se ha demostrado que la reconstitución de estos linfocitos específicos es esencial para el manejo de la infección por AdV post-TPH, ya que están asociados al aclaramiento del virus, contribuyendo a la resolución de la infección⁴⁷. Se recomienda, por tanto, la monitorización de LT específicos de AdV para la detección temprana de pacientes de riesgo⁴⁰.

Respecto a la tecnología que permite monitorizar los LT específicos de AdV, se ha utilizado la denominada *Intracellular Interferon- γ Staining* (ICS), que consiste en la detección intracelular mediante citometría de flujo de citoquinas efectoras (habitualmente IFN- γ) secretadas por LT funcionales después de la estimulación con péptidos inmunodominantes de AdV, generalmente péptidos de la proteína hexón de AdV serotipo 5. En un estudio realizado por Feuchtlinger y col utilizando ICS, en ninguno de los pacientes que fallecieron a consecuencia de esta infección se detectaron AdV-CTLs, mientras que los que resolvieron la infección tuvieron valores medios de AdV-CTLs de $0,56 \times 10^9/\text{L}$ hasta los +200 días post-TPH⁴⁸. Del mismo modo, en relación a los LT CD4+ Guérin-El Khourouj y col establecen

que ningún paciente con niveles de LTh específicos de AdV $> 0,06$ /mL en sangre desarrolla adenoviremia⁴⁹. Al igual que para el EBV, se han utilizado otras técnicas para la monitorización de estos LT específicos de AdV como ELISPOT y multímeros, obteniendo similares conclusiones y sin poder también establecer un valor umbral que defina futuras reactivaciones víricas. Además, se ha identificado la proteína pentón de AdV como portadora de epítomos inmunogénicos, lo cual, permitirá ampliar las estrategias de evaluación inmunológica⁵⁰.

Actualmente, se emplean estas técnicas de monitorización para analizar la eficacia de la transferencia adoptiva de LT específicos de antígeno en pacientes con viremia o enfermedad producida por EBV y AdV post-TPH. Las técnicas de monitorización antígeno-específicas permiten, usando una tecnología instaurada en la mayoría de laboratorios clínicos y de metodología estandarizada como es la citometría de flujo policromática, demostrar cómo la restauración satisfactoria y sostenida de la inmunidad de LT se correlaciona con un efecto antiviral y, por tanto, protege contra la mortalidad asociada al virus. Como hemos descrito en esta revisión, con el desarrollo de la tecnología multimérica en combinación con el seguimiento de las diferentes subpoblaciones del sistema inmunológico y la caracterización de su actividad funcional, es posible aunar la monitorización y la transferencia de LT específicos de virus. Aunque ya existen guías clínicas que contemplan la monitorización de CTLs específicas de EBV y AdV junto con la carga viral para el manejo de estos pacientes post-TPH, los futuros estudios deben estar encaminados a la introducción de dichos protocolos de caracterización de la respuesta inmunitaria específica de virus como parte del algoritmo terapéutico y de seguimiento clínico de los pacientes post-TPH.

BIBLIOGRAFÍA

1. GRATWOHL A, BRAND R, FRASSONI F, ROCHA V, NIEDERWIESER D, REUSSER P et al. Cause of death after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in early leukaemias: an EBMT analysis of lethal infectious complications and changes over calendar time. *Bone Marrow Transplant* 2005; 36: 757-769.

2. LEEN AM, HESLOP HE, BRENNER MK. Antiviral T-cell therapy. *Immunol Rev* 2014; 258: 12-29.
3. HESLOP HE, SLOBOD KS, PULE MA, HALE GA, ROUSSEAU A, SMITH CA et al. Long-term outcome of EBV-specific T-cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients. *Blood* 2010; 115: 925-935.
4. FEUCHT J, OPPERK K, LANG P, KAYSER S, HARTL L, BETHGE W et al. Adoptive T-cell therapy with hexon-specific Th1 cells as a treatment of refractory adenovirus infection after HSCT. *Blood* 2015; 125: 1986-1894.
5. WANG J, QUAKE SR. RNA-guided endonuclease provides a therapeutic strategy to cure latent herpesviridae infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111: 13157-13162.
6. THEMELI M, RIVIÈRE I, SADELAIN M. New cell sources for T cell engineering and adoptive immunotherapy. *Cell Stem Cell* 2015; 16: 357-366.
7. ALHO AC, KIM HT, CHAMMAS MJ, REYNOLDS CG, MATOS TR, FORCADE E et al. Unbalanced recovery of regulatory and effector T cells after allogeneic stem cell transplantation contributes to chronic GVHD. *Blood* 2016; 127: 646-657.
8. SEGGEWISS R, ENSELE H. Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood* 2010; 115: 3861-3868.
9. AULETTA JJ, LAZARUS HM. Immune restoration following hematopoietic stem cell transplantation: an evolving target. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35: 835-857.
10. ITZYKSON R, ROBIN M, MOINS-TEISSERENC H, DELORD M, BUSSON M, XHAARD A et al. Cytomegalovirus shapes long-term immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2015; 100: 114-123.
11. RINGHOFFER S, ROJEWSKI M, DÖHNER H, BUNJES D, RINGHOFFER M. T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation: assessment by measurement of the sjTREC/ β TREC ratio and thymic naive T cells. *Haematologica* 2013; 98: 1600-1608.
12. BORCHERS S, BREMM M, LEHRNBECHER T, DAMMANN E, PABST B, WÖLK B et al. Sequential anti-cytomegalovirus response monitoring may allow prediction of cytomegalovirus reactivation after allogeneic stem cell transplantation. *PLoS One* 2012; 7: e50248. doi: 10.1371/journal.pone.0050248.
13. CHAUDHRY MS, VELARDI E, MALARD F, VAN DEN BRINK MR. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Time To T Up the Thymus. *J Immunol* 2017; 198: 40-46.
14. CLAVE E, BUSSON M, DOUAY C, PEFFAULT DE LATOUR R, BERRON J, RABIAN C et al. Acute graft-versus-host disease transiently impairs thymic output in young patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2009; 113: 6477-6484.
15. MEHTA RS, REZVANI K. Immune reconstitution post allogeneic transplant and the impact of immune recovery on the risk of infection. *Virulence* 2016; 7: 901-916.
16. KIM SY, LEE DG, KIM MS, KIM HJ, LEE S, MIN CK. The influence of infection early after allogeneic stem cell transplantation on the risk of leukemic relapse and graft-versus-host disease. *Am J Hematol* 2008; 83: 784-788.
17. HU Y, CUI Q, YE Y, LUO Y, TAN Y, SHI J et al. Reduction of Foxp3+ T cell subsets involved in incidence of chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Hematol Oncol* 2017; 35: 118-124.
18. PASTORE D, DELIA M, MESTICE A, PERRONE T, CARLUCCIO P, GAUDIO F et al. Recovery of CMV-specific CD8+ T cells and Tregs after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; 17: 550-557.
19. KENNEDY-NASSER AA, KU S, CASTILLO-CARO P, HAZRAT Y, WU MF, LIU H et al. Ultra low-dose IL-2 for GVHD prophylaxis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation mediates expansion of regulatory T cells without diminishing antiviral and antileukemic activity. *Clin Cancer Res* 2014; 20: 2215-2225.
20. WIKSTROM ME, FLEMING P, KUNS RD, SCHUSTER IS, VOIGT V, MILLER G et al. Acute GVHD results in a severe DC defect that prevents T-cell priming and leads to fulminant cytomegalovirus disease in mice. *Blood* 2015; 126: 1503-1514.
21. ULLAH MA, HILL GR, TEY SK. Functional Reconstitution of Natural Killer Cells in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol* 2016; 7: 144. doi: 10.3389/fimmu.2016.00144.
22. NGUYEN S, KUENTZ M, VERNANT JP, DHEDIN N, BORIES D, DEBRÉ P et al. Involvement of mature donor T cells in the NK cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Leukemia* 2008; 22: 344-352.
23. HUENECKE S, CAPPEL C, ESSER R, PFIRRMANN V, SALZMANN-MANRIQUE E, BETZ S et al. Development of Three Different NK Cell Subpopulations during Immune Reconstitution after Pediatric Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Prognostic Markers in GvHD and Viral Infections. *Front Immunol* 2017; 8: 109. doi: 10.3389/fimmu.2017.00109.
24. SHILLING HG, MCQUEEN KL, CHENG NW, SHIZURU JA, NEGRIN RS, PARHAM P. Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2003; 101: 3730-3740.
25. CHEN C, BUSSON M, ROCHA V, APPERT ML, LEPAGE V, DULPHY N et al. Activating KIR genes are associated with CMV reactivation and survival after non-T-cell depleted HLA-identical sibling bone marrow transplantation for malignant disorders. *Bone Marrow Transplant* 2006; 38: 437-444.
26. SCHMID ET, PANG IK, CARRERA SILVA EA, BOSURGI L, MINER JJ, DIAMOND MS et al. AXL receptor tyrosine kinase is required for T cell priming and antiviral immunity. *Elife* 2016; 5. doi: 10.7554/eLife.12414.
27. HESLOP HE. How I treat EBV lymphoproliferation. *Blood* 2009; 114: 4002-4008.

28. UHLIN M, WIKELL H, SUNDIN M, BLENNOW O, MAEURER M, RINGDEN O et al. Risk factors for Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2014; 99: 346-352.
29. ROUCE RH, LOUIS CU, HESLOP HE. Epstein-Barr virus lymphoproliferative disease after hematopoietic stem cell transplant. *Curr Opin Hematol* 2014; 21: 476-481.
30. WAGNER HJ, CHENG YC, HULS MH, GEE AP, KUEHNLE I, KRANCE RA et al. Prompt versus preemptive intervention for EBV lymphoproliferative disease. *Blood* 2004; 103: 3979-3981.
31. STYCZYNSKI J, VAN DER VELDEN W, FOX CP, ENGELHARD D, DE LA CAMARA R, CORDONNIER C et al. Management of Epstein-Barr Virus infections and post-transplant lymphoproliferative disorders in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Sixth European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-6) guidelines. *Haematologica* 2016; 101: 803-811.
32. XU LP, ZHANG CL, MO XD, ZHANG XH, CHEN H, HAN W et al. Epstein-Barr virus-related post-transplantation lymphoproliferative disorder after unmanipulated human leukocyte antigen haploidentical hematopoietic stem cell transplantation: incidence, risk factors, treatment, and clinical outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015; 21: 2185-2191.
33. BIAN Z, LIU J, XU LP, CHANG YJ, WANG Y, ZHANG XH et al. Association of Epstein-Barr virus reactivation with the recovery of CD4/CD8 double-negative T lymphocytes after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2017; 52: 264-269.
34. ICHEVA V, KAYSER S, WOLFF D, TUVE S, KYZIRAKOS C, BETHGE W et al. Adoptive transfer of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 1-specific T cells as treatment for EBV reactivation and lymphoproliferative disorders after allogeneic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 2013; 31: 39-48.
35. D'AVENI M, AÏSSI-ROTHÉ L, VENARD V, SALMON A, FALENGA A, DECOT V et al. The clinical value of concomitant Epstein Barr virus (EBV)-DNA load and specific immune reconstitution monitoring after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Immunol* 2011; 24: 224-232.
36. ANNELS NE, KALPOE JS, BREIDUS RG, CLAAS EC, KROES AC, HISLOP AD et al. Management of Epstein-Barr virus (EBV) reactivation after allogeneic stem cell transplantation by simultaneous analysis of EBV DNA load and EBV-specific T cell reconstitution. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 1743-1748.
37. MEI P, VAN ESSER JW, NIESTERS HG, VAN BAARLE D, MIEDEMA F, BLAKE N et al. Impaired recovery of Epstein-Barr virus (EBV)-specific CD8+ T lymphocytes after partially T-depleted allogeneic stem cell transplantation may identify patients at very high risk for progressive EBV reactivation and lymphoproliferative disease. *Blood* 2003; 101: 4290-4297.
38. CALAROTA SA, CHIESA A, ZELINI P, COMOLLI G, MINOLI L, BALDANTI F. Detection of Epstein-Barr virus-specific memory CD4+ T cells using a peptide-based culture red enzyme-linked immunospot assay. *Immunology* 2013; 139: 533-544.
39. ISON MG. Adenovirus infections in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 331-339.
40. MATTHES-MARTIN S, FEUCHTINGER T, SHAW PJ, ENGELHARD D, HIRSCH HH, CORDONNIER C et al. European guidelines for diagnosis and treatment of adenovirus infection in leukemia and stem cell transplantation: summary of ECIL-4 (2011). *Transpl Infect Dis* 2012; 14: 555-563.
41. ROBIN M, MARQUE-JUILLET S, CIEUX C, PEFFAULT DE LATOUR R, FERRY C, ROCHA V et al. Disseminated adenovirus infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: incidence, risk factors and outcome. *Haematologica* 2007; 92: 1254-1257.
42. LINDEMANS CA, LEEN AM, BOELENS JJ. How I treat adenovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Blood* 2010; 116: 5476-5485.
43. CHAKRABARTI S, MAUTNER V, OSMAN H, COLLINGHAM KE, FEGAN CD, KLAPPER PE et al. Adenovirus infections following allogeneic stem cell transplantation: incidence and outcome in relation to graft manipulation, immunosuppression, and immune recovery. *Blood* 2002; 100: 1619-1627.
44. HIWARKAR P, GASPARD HB, GILMOUR K, JAGANI M, CHIESA R, BENNETT-REES N et al. Impact of viral reactivations in the era of pre-emptive antiviral drug therapy following allogeneic haematopoietic SCT in paediatric recipients. *Bone Marrow Transplant* 2013; 48: 803-808.
45. MUÑOZ-COBO B, SOLANO C, COSTA E, BRAVO D, CLARI M, BENET I et al. Dynamics of cytomegalovirus (CMV) plasma DNAemia in initial and recurrent episodes of active CMV infection in the allogeneic stem cell transplantation setting: implications for designing preemptive antiviral therapy strategies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; 17: 1602-1611.
46. BORDIGONI P, CARRET AS, VENARD V, WITZ F, LE FAOU A. Treatment of adenovirus infections in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 1290-1297.
47. ZANDVLIET ML, FALKENBURG JH, VAN LIEMPT E, VELTROP-DUITS LA, LANKESTER AC, KALPOE JS et al. Combined CD8+ and CD4+ adenovirus hexon-specific T cells associated with viral clearance after stem cell transplantation as treatment for adenovirus infection. *Haematologica* 2010; 95: 1943-1951.
48. FEUCHTINGER T, LÜCKE J, HAMPRECHT K, RICHARD C, HANDGRETINGER R, SCHUMM M et al. Detection of adenovirus-specific T cells in children with adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2005; 128: 503-509.
49. GUÉRIN-EL KHOUROUJ V, DALLE JH, PÉDRON B, YAKOUBEN K, BENSOUSSAN D, CORDEIRO DJ et al. Quantitative and qualitative CD4 T cell immune responses related to adenovirus DNAemia in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; 17: 476-485.
50. TISCHER S, GEYEREGGER R, KWOCZEK J, HEIM A, FIGUEIREDO C, BLASCZYK R et al. Discovery of immunodominant T-cell epitopes reveals penton protein as a second immunodominant target in human adenovirus infection. *J Transl Med* 2016; 14:286. doi: 10.1186/s12967-016-1042-2.