



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Microbiología y Ecología

Doctorado en Medicina
Tesis Doctoral

Efecto de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) en genes de la inmunidad innata y adaptativa en la incidencia y dinámica de la infección activa por Citomegalovirus en pacientes sometidos a trasplante hematopoyético alogénico o trasplante de órgano sólido.

Doctoranda:

Isabel Corrales Vázquez

Director de la Tesis:

David Navarro Ortega

Enero 2017



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Microbiología y Ecología

Doctorado en Medicina
Tesis Doctoral

Efecto de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) en genes de la inmunidad innata y adaptativa en la incidencia y dinámica de la infección activa por Citomegalovirus en pacientes sometidos a trasplante hematopoyético alogénico o trasplante de órgano sólido.

Doctoranda:

Isabel Corrales Vázquez

Director de la Tesis:

David Navarro Ortega

Enero 2017

CENTRO DONDE SE HA REALIZADO LA TESIS: Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

TÍTULO: Efecto de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) en genes de la inmunidad innata y adaptativa en la incidencia y dinámica de la infección activa por Citomegalovirus en pacientes sometidos a trasplante hematopoyético alogénico o trasplante de órgano sólido.

AUTOR: Dña. Isabel Corrales Vázquez, Farmacéutica Especialista en Microbiología y Parasitología.

DIRECTOR: D. David Navarro Ortega, Catedrático de la Universidad de Valencia y Jefe de Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

D. David Navarro Ortega, Catedrático del Dpto. de Microbiología y Ecología de la Universitat de València y Jefe de Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia,

CERTIFICA:

Que la presente memoria, titulada “*Efecto de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) en genes de la inmunidad innata y adaptativa en la incidencia y dinámica de la infección activa por Citomegalovirus en pacientes sometidos a trasplante hematopoyético alogénico o trasplante de órgano sólido*”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por Dña. Isabel Corrales Vázquez, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Medicina de la Universitat de València.

Y para que conste firma el presente certificado en Valencia, a 19 de enero de 2017.

Fdo. D. David Navarro Ortega.

AGRADECIMIENTOS

En este apartado quiero manifestar mi gratitud a todas aquellas personas que han contribuido y han hecho posible la presentación de este trabajo, un reto a nivel profesional y personal en el que quiero hacer partícipes a aquellas personas que han dejado su impronta.

Comienzo citando a mi Director de Tesis, D. David Navarro Ortega, mostrando mi más sincero agradecimiento por brindarme la oportunidad de trabajar bajo su dirección y mostrarme el horizonte hacia dónde encaminar mi carrera profesional.

Manifiesto mi gratitud al Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia, a D. Juan García de Lomas Barrionuevo, anterior Jefe de Servicio y a su equipo de trabajo, por facilitarme el espacio y recursos necesarios para este estudio. Sin duda una colaboración con un equipo humano y profesional excepcional y enriquecedor.

Aprovecho estas últimas líneas para acordarme de los míos, mi familia más cercana, mi marido Javier, mis padres y hermano, y a todos los que están y otros que ya se han ido, por confiar siempre en mí, por su apoyo, por guiarme en los primeros pasos de este sendero que es la vida y animarme ahora a seguir con pisada firme cada paso hacia el futuro.

PRESENTACIÓN

Esta tesis doctoral se presenta como compendio de publicaciones conforme al nuevo Reglamento sobre depósito, evaluación y defensa de la tesis doctoral aprobado en cumplimiento de lo que disponen el Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, por el que se regulan las enseñanzas oficiales de doctorado, así como del artículo 136 de los Estatutos de la Universitat de València.

Este proyecto se ha realizado dentro del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) Ministerio de Sanidad y Consumo, número PS 12/01992 y título “Marcadores inmunológicos y genotípicos de protección frente a la infección por Citomegalovirus en el trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos”; y gracias a los fondos aportados por el proyecto “Polimorfismos Roche Pharma Diagnostics®”.

A continuación, se detallan por orden cronológico, los artículos que componen la presente tesis doctoral:

1. Corrales, I., Giménez, E., Solano, C., Amat, P., de la Cámara, R., Nieto, J., ... Navarro, D. (2015). Incidence and Dynamics of Active Cytomegalovirus Infection in Allogeneic Stem Cell Transplant Patients According to Single Nucleotide Polymorphisms in Donor and Recipient CCR-5, MCP-1, IL-10, and TLR-9 Genes. *J Med Virol*, 87(2), 248-255. doi: 10.1002/jmv.24050.
2. Fernández-Ruiz, M., Corrales, I., Arias, M., Campistol, J. M., Giménez, E., Crespo, J., ... Navarro, D.; OPERA Study Group. (2015). Association between individual and combined SNPs in

genes related to innate immunity and incidence of CMV infection in seropositive kidney transplant recipients. *Am J Transplant*, 15(5), 1323-1335. doi: 10.1111/ajt.13107.

3. Fernández-Ruiz, M., Corrales, I., Amat, P., González, E., Andrés, A., Navarro, D., & Aguado, J. M. (2015). Influence of Age and HLA Alleles on the CMV-Specific Cell-Mediated Immunity Among CMV-Seropositive Kidney Transplant Candidates. *Am J Transplant*, 15(9), 2525-2526. doi: 10.1111/ajt.13370.
4. Corrales, I., Solano, C., Amat, P., Giménez, E., de la Cámara, R., Nieto, J., ... Navarro, D. (2016). IL28B genetic variation and cytomegalovirus-specific T-cell immunity in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Med Virol*, [Epub ahead of print]. doi: 10.1002/jmv.24676.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNdc	ADN de doble cadena
AG	Ensayo de antigenemia pp65
Alo-TPH	Trasplante Alogénico de Precursores Hematopoyéticos
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
CCR-5	<i>Chemokine Receptor Type 5</i> ; Quimiocina Receptora de tipo 5
CDs	Células Dendríticas
CDV	Cidofovir
CLIA	<i>ChemiLuminescent Immuno Assay</i> ; Ensayo de quimioluminiscencia
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CPA	Célula Presentadora de Antígeno
CR	Cociente de Riesgo
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-Grabbing Non-integrin</i>
D	Donante

DMSO	Dimetil-sulfóxido
DNAemia	Presencia de ADN viral en sangre
EA	<i>Early antigen</i> ; antígeno temprano
EICH	Enfermedad del Injerto Contra el Huésped
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> ; Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
ELISPOT	<i>Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> ; Suero Bovino Fetal
FOS	Foscarnet
GCV	Ganciclovir
HCMV	Citomegalovirus Humano
HHV-6	Herpesvirus humano tipo 6
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> ; Antígeno Leucocitario Humano
HPV	Papilomavirus Humano
HR (aHR)	Hazard Ratio (Hazard Ratio ajustado)
HWE	<i>Hardy-Weinberg equilibrium</i> ; Equilibrio de Hardy-Weinberg
IC	Intervalo de Confianza
ICS	<i>Intracellular Cytokine Staining</i> ; Tinción Intracelular de Citoquinas

ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IE-1	<i>Immediate-early protein 1</i> ; proteína precoz 1
Ig	Inmunoglobulina
IFN-α	<i>Alpha</i> -interferón
IFN-λ_3 (IL-28B)	Interferón <i>lambda</i> 3 (Interleuquina 28B)
IFN-γ	Interferón <i>gamma</i>
IL-2	Interleuquina 2
IL-6	Interleuquina 6
IL-10	Interleuquina 10
IQR	<i>Inter-Quartile Range</i> ; Rango intercuartílico
ISG	<i>Interferon-Stimulated Genes</i> ; Genes estimulados por Interferón
i.v.	intravenoso
LA	<i>Late Antigen</i> ; Antígeno tardío
LPMNs	Leucocitos Polimorfonucleares
MCP-1	<i>Monocyte Chemotactic Protein 1</i> ; Proteína quimiotáctica de monocitos 1
MDDCs	<i>Monocyte-Derived Dendritic Cells</i> ; Células Dendríticas Derivadas de Monocitos
mL	mililitro
NK	<i>Natural Killer cells</i> ; células asesinas naturales

OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	<i>Opening Reading Frame</i> ; Marco de Lectura Abierto
Pb	Pares de bases
PBMCs	<i>Peripheral Blood Monocytes Cells</i> ; Células mononucleares de sangre periférica
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> ; Tampón Fosfato Salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> ; Reacción en Cadena de la Polimerasa
PD-1	<i>Programmed cell Death protein 1</i>
pp65	<i>Phosphoprotein 65</i> ; Fosfoproteína 65
QF-CMV	QuantiFERON®-CMV
QRT-PCR	<i>Quantitative Real Time PCR</i> ; PCR cuantitativa en tiempo real
R	Receptor
SD	Desviación Estándar
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> ; Polimorfismos de un único nucleótido
TLR-1	<i>Toll-Like Receptor 1</i> ; Receptor tipo Toll 1
TLR-2	<i>Toll-Like Receptor 2</i> ; Receptor tipo Toll 2
TLR-4	<i>Toll-Like Receptor 4</i> ; Receptor tipo Toll 4
TLR-6	<i>Toll-Like Receptor 6</i> ; Receptor tipo Toll 6

TLR-9	<i>Toll-Like Receptor 9</i> ; Receptor tipo Toll 9
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> ; Factor de Necrosis Tumoral alfa
TOS	Trasplante de Órgano Sólido
TPH	Trasplante de Precusores Hematopoyéticos
UI	Unidades Internacionales
VEB	Virus Epstein-Barr
VHC	Virus de la Hepatitis C
VHS-1	Virus Herpes Simple tipo 1
VHS-2	Virus Herpes Simple tipo 2
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VRS	Virus Respiratorio Sincitial
VVZ	Virus Varicela Zóster

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	VII
PRESENTACIÓN	IX
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	XI
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	1
ÍNDICE DE TABLAS.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
I. INTRODUCCIÓN.....	11
I.1. ESTRUCTURA Y CICLO REPLICATIVO.....	13
I.2. PATOGÉNESIS Y RESPUESTA INMUNE.....	18
I.3. DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN Y ENFERMEDAD POR HCMV.....	21
I.3.1. Estudios Serológicos.....	21
I.3.2. Cultivo Celular.....	22
I.3.3. Detección de la Antigenemia.....	23
I.3.4. Monitorización Inmunológica.....	23
I.3.5. Técnicas moleculares.....	25

I.4. HCMV en el contexto del Trasplante Alogénico de Precusores Hematopoyéticos (alo-TPH).....	27
I.5. HCMV en el contexto del Trasplante de Órgano Sólido (TOS).....	30
I.6. Estrategias preventivas frente a la infección por HCMV en el contexto clínico del trasplante: Profilaxis Antiviral y Tratamiento Anticipado.....	33
I.7. Tratamiento de la infección por HCMV en el contexto del trasplante.....	36
I.7.1. Fármacos disponibles.....	36
I.7.2. Resistencia a antivirales.....	38
I.7.3. Terapias alternativas.....	39
I.7.4. Vacunación.....	40
I.8. Polimorfismos de un único nucleótido en la Infección y Enfermedad Orgánica por HCMV.....	40
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	49
III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	55
III.1. Tipos y Poblaciones de Estudio.....	57
III.2. Monitorización Inmunológica: Tinción Intracelular de Citoquinas.....	59
III.3. Manejo de la Infección Activa por HCMV.....	61

III.4. Análisis de SNPs.....	64
III.5. Cuantificación de la IL-28B.....	67
III.6. Análisis Estadístico.....	67
IV. RESULTADOS.....	71
V. DISCUSIÓN CONJUNTA.....	105
VI. LIMITACIONES METODOLÓGICAS.....	125
VII. CONCLUSIONES FINALES.....	133
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	137
IX. ARTÍCULOS ORIGINALES.....	175
X. ANEXOS.....	219
X.1. ANEXO I. ESCRITO DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL SOBRE EL FACTOR DE IMPACTO DE LAS PUBLICACIONES QUE SE RECOGEN EN LA TESIS DOCTORAL.....	221
X.2. ANEXO II. INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL SOBRE LA COAUTORÍA DE LAS PUBLICACIONES COMPENDIADAS EN LA TESIS DOCTORAL.....	223

ÍNDICE DE TABLAS

IV. Resultados

Tabla IV.1. Efecto de los genotipos de SNPs del donante en la Tasa de Incidencia de Infección Activa por HCMV en pacientes sometidos a alo-TPH.....	75
Tabla IV.2. Efecto de los genotipos de SNPs del receptor en la Tasa de Incidencia de Infección Activa por HCMV en pacientes sometidos a alo-TPH.....	76
Tabla IV.3. Duración de la DNAemia y el pico de HCMV en plasma en los primeros episodios de infección activa por HCMV de acuerdo a los genotipos de SNP del donante.....	78
Tabla IV.4. Duración de la DNAemia y el pico de HCMV en plasma en los primeros episodios de infección activa por HCMV de acuerdo a los genotipos de SNP del receptor.....	79
Tabla IV.5. Incidencia Acumulada de Infección Activa por HCMV en función de los SNPs de los receptores de TOS renal.....	84
Tabla IV.6. Incidencia Acumulada de Infección Activa por HCMV en función de los SNPs.....	85

Tabla IV.7. Diferentes modelos de regresión multivariada de Cox que evalúan el impacto de los SNPs seleccionados en la supervivencia libre de HCMV..	88
Tabla IV.8. Diferentes modelos de regresión multivariada de Cox que evalúan el impacto de los SNPs seleccionados en la supervivencia libre de HCMV en los pacientes que tuvieron 3 o más puntos de monitorización virológica....	90
Tabla IV.9. Efecto combinado de los genotipos desfavorables de los SNPs en la supervivencia libre de infección.....	91
Tabla IV.10. Efecto combinado de SNPs seleccionados en los genes que codifican para TLR-9, DC-SIGN y la IL-28B en la supervivencia libre de infección por HCMV.....	92

ÍNDICE DE FIGURAS

I. Introducción

Figura I.1. Estructura del virión de HCMV 15

Figura I.2. Ciclo replicativo del HCMV (Beltran & Cristea, 2014)..... 17

III. Metodología de la investigación

Figura III.1. Tipificación mediante PCR alelo-específica en el Sistema de Applied Biosystems..... 65

Figura III.2. Curvas de fusión de los diferentes genotipos en el sistema de detección de la IL-28B (Insert LightMix® Kit IL28B rs12979860)..... 66

IV. Resultados

Figura IV.1. Curvas de Kaplan-Meier que representan la supervivencia libre de infección por HCMV para cada genotipo de SNP en TLR-2 y la IL-28B en la cohorte global..... 86

Figura IV.2. Curvas de Kaplan-Meier que representan la supervivencia libre de infección por HCMV para cada genotipo de SNP de TLR-9 y DC-SIGN 87

Figura IV.3. Recuento absoluto de las células T CD8 ⁺ específicas para HCMV productoras de IFN- γ de acuerdo con los alelos HLA-B44 o sin los alelos HLA-B44, en pacientes seropositivos para HCMV y candidatos a trasplante renal.....	94
Figura IV.4. Recuento absoluto de las células T CD4 ⁺ específicas para HCMV productoras de IFN- γ de acuerdo con los alelos HLA-A1 y/o HLA-A2 y sin los alelos HLA-A1 y HLA-A2, en pacientes seropositivos para HCMV y candidatos a trasplante renal.....	95
Figura IV.5. Medida de la respuesta de las células T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ productoras de IFN- α específica para HCMV en receptores de alo-TPH que no tuvieron DNAemia previa para HCMV (n=85) de acuerdo con el genotipo de SNP de la IL-28B (rs12979860) del donante.....	98
Figura IV.6. Representación de los valores de IL-28B, mediana (Figura IV.6.A) y pico (Figura IV.6.B), en receptores de alo-TPH, sin DNAemia previa por HCMV según el genotipo de SNP de la IL28B (rs12979860) del donante.....	99
Figura IV.7. Correlación entre los niveles plasmáticos de la IL-28B y la respuesta de las células T CD8 ⁺ y CD4 ⁺ específicas para HCMV en receptores de alo-TPH sin DNAemia previa independientemente del genotipo de SNP de la IL-28B del donante.....	100

Figura IV.8. Características virológicas de la DNAemia por HCMV.....	101
Figura IV.9. Células T específicas para HCMV, CD8 ⁺ (Figura IV.9.A) y CD4 ⁺ , después del inicio de la DNAemia por HCMV, de acuerdo al genotipo de SNP de la IL-28B del donante.....	102
Figura IV.10. Correlación entre el pico de la respuesta T CD8 ⁺ y CD4 ⁺ específica para HCMV, medida después de la detección de la DNAemia, y los niveles plasmáticos de la IL-28B medidos antes de la aparición de DNAemia por HCMV.....	104
Figura IV.11. Correlación entre la mediana de la respuesta T CD8 ⁺ y CD4 ⁺ específica para HCMV y los valores plasmáticos de IL-28B durante el episodio de DNAemia por HCMV.....	104

I. INTRODUCCIÓN

I.1. ESTRUCTURA Y CICLO REPLICATIVO

Taxonómicamente, el Citomegalovirus Humano (HCMV) o Herpesvirus Humano tipo 5 (de acuerdo al ICTV, del inglés International Committee on Taxonomy of Viruses), pertenece al orden *Herpesvirales*, familia *Herpesviridae*, subfamilia *Betaherpesvirinae* y género *Cytomegalovirus* (Davison et al., 2010).

El HCMV es el miembro de mayor tamaño de la familia de los herpesvirus humanos. El número de proteínas codificadas por el virus y la complejidad de sus funciones en el ciclo viral, se reflejan en el tamaño de su genoma (Britt et al., 2004).

El **virión** de HCMV, de aproximadamente 180 milimicras, consta de una nucleocápside icosaédrica de unos 100 nanómetros (nm), que contiene un genoma ADN lineal de doble cadena (ADNdc) de aproximadamente 230.000 pares de bases (pb) y codifica para más de 220 marcos abiertos de lectura (ORF, del inglés Openning Reading Frame). El material genético está rodeado por una cubierta proteica denominada tegumento o matriz, y ésta a su vez, está cubierta por una bicapa lipídica que posee un gran número de glicoproteínas virales (Gandhi et al., 2004; Landolfo et al., 2003) (Figura I.1).

El **genoma viral** de HCMV incluye regiones largas U_L (del inglés, Unique Long) y regiones cortas U_S (del inglés, Unique Short), separadas por regiones repetitivas internas y delimitadas por regiones repetitivas terminales, permitiendo así al genoma viral existir como cuatro isómeros diferentes. Los genes más conservados entre los diferentes herpesvirus, se encuentran en las regiones U_L , mientras que los genes que confieren funciones específicas como el reconocimiento del hospedador, se encuentran en las regiones U_S (Boeckh & Geballe, 2011; Britt et al., 2004).

Introducción

La estructura de la **nucleocápside** es similar a la del Herpesvirus Humano tipo 1 (VHS-1) o Herpes Simple tipo 1, formada por 162 capsómeros compuestos por dos unidades morfológicas distintas, 12 pentámeros y 150 hexámeros, con estructuras de triple hélice que unen capsómeros adyacentes (Butcher et al., 1998).

El **tegumento** del virión es un revestimiento amorfo, formado por la adición secuencial de proteínas en el núcleo y en el citoplasma, la mayoría fosforiladas y no todas de función conocida. Esta estructura mantiene la asociación entre la envoltura lipídica del virión y la cápside (Britt et al., 2004; Varnum et al., 2004). Las proteínas que constituyen el tegumento desempeñan papeles importantes en, la entrada a la célula por el virus, la expresión génica, la evasión de la respuesta inmune, el ensamblaje del virus y la salida de la célula infectada. La proteína pp65 es la proteína estructural viral más importante objetivo tanto de la inmunidad celular como humoral y es el antígeno diana de las células T CD8⁺ en el contexto de la infección por HCMV (Bunde et al., 2005).

La **envoltura** es una bicapa lipídica que contiene espículas de glicoproteínas codificadas por el virus. Entre ellas están gB (UL55), gM (UL100), gH (UL75), gL (UL115), gO (UL 74), gN (UL 73), gp48 (UL4), gpTRL10, y UL33. La proteína gB es la principal diana de los anticuerpos neutralizantes y está muy conservada en todas las especies, aunque la proteína gM es la más abundante (Varnum et al., 2004).

Además de las proteínas estructurales del virión del HCMV, se han asociado al mismo proteínas celulares como la CD13 (aminopeptidasa), β_2 -microglobulina, proteína fosfatasa I, anexina II, proteínas implicadas en el control de la traducción, ... (Varnum et al., 2004).

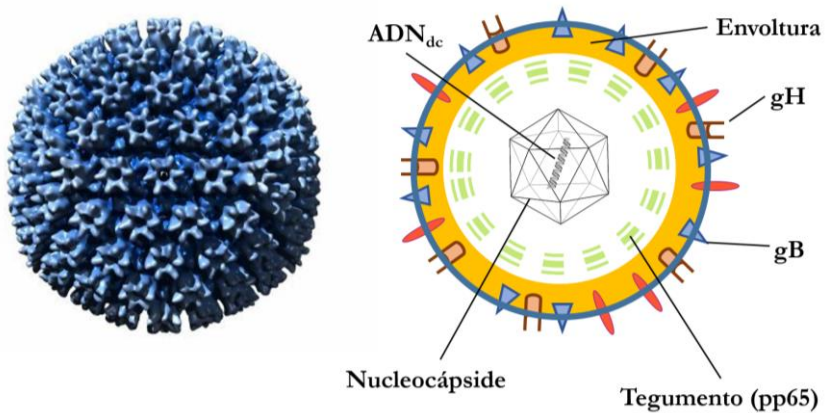


Figura I.1. Estructura del virión de HCMV

Se diferencian tres tipos de partículas virales durante la infección por HCMV: (i) viriones maduros infecciosos, (ii) partículas envueltas no infecciosas, que tienen la misma composición que los viriones maduros infecciosos, pero sin ADN viral, y (iii) cuerpos densos, que son partículas encapsuladas no replicativas deficientes de ácidos nucleicos, características únicamente de la infección por HCMV y que están compuestas principalmente por la proteína del tegumento pp65 (UL83) (Varnum et al, 2004).

El HCMV por pertenecer a la subfamilia *Betaherpesvirinae* tiene un ciclo replicativo mucho más lento que el VHS o el Virus Varicela Zoster (VVZ) (*Alfaherpesvirinae*). Las partículas infecciosas interactúan a través de las glicoproteínas de la envuelta viral con los receptores celulares, como consecuencia, el virión y las membranas celulares se fusionan, y se produce la liberación de las proteínas de la cápside y el tegumento directamente en el

Introducción

citoplasma (Kalejta, 2008). Gracias a la interacción de las proteínas virales del tegumento con la maquinaria tubular del hospedador, la cápside se desplaza al núcleo donde se producirá la transcripción viral, la replicación del genoma y la encapsidación (Figura I.2). Al mismo tiempo, otras proteínas del tegumento se dirigen a otras localizaciones con el fin de inhibir las etapas iniciales de la respuesta inmune y regular la expresión de genes virales.

El HCMV replica y empaqueta su genoma en el núcleo, pero las nucleocápsides son demasiado grandes para atravesar los poros nucleares, por tanto, el tránsito desde el núcleo hasta el citoplasma está orquestado por un complejo nuclear viral altamente conservado. En el caso del HCMV, el complejo consta de dos proteínas, UL50 y UL53 (Cristea et al., 2010). En el núcleo se produce la transcripción de ARN mensajeros (ARNm) muy precoces que se traducen finalmente en proteínas muy precoces antigénicas (IE, del inglés Immediate Early) (Beltran & Cristea, 2014). La expresión de genes virales precoces (IE) hace que el virus perpetre el programa de replicación lítica. Las proteínas virales IE modulan el ambiente de la célula huésped y estimulan la expresión de genes virales tempranos (EA, del inglés Early Antigen), los cuáles están implicados en el efecto citopático, estimulan la síntesis de ADN, ARN y proteínas en la célula infectada (Kalejta et al., 2008). Después de la replicación del ADN, se produce la expresión de los genes virales tardíos (LA, del inglés Late Antigen), la mayoría de ellos se transcriben en proteínas y glicoproteínas estructurales. En el núcleo se forma la cápside y se empaqueta el ADN en la misma. Los LA inician el ensamblaje de la cápside en el núcleo, seguido de su salida al citoplasma. Para la salida de la cápside, se forma un complejo nuclear en el que adquieren la membrana nuclear interna. La envoltura definitiva de la cápside se produce a través de vesículas que provienen del retículo endoplásmico, el aparato de Golgi y la maquinaria endosomal. La posterior fusión de estas vesículas con la

membrana celular, da lugar a la liberación del virión con envuelta. A continuación, se produce la liberación en el espacio extracelular de las partículas infecciosas generadas, así como otras partículas no infecciosas llamados cuerpos densos (Beltran & Cristea, 2014).

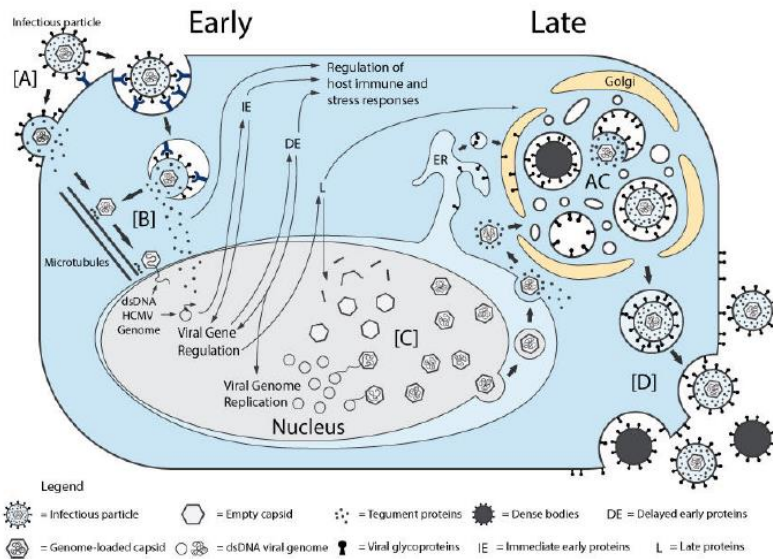


Figura I.2. Ciclo replicativo del HCMV (Beltran & Cristea, 2014)

Se ha observado una notable conservación en los patrones virales y de abundancia de las proteínas en las células infectadas por el HCMV. Según progresa la infección en el tiempo aumenta la cantidad de proteínas virales, en la mayoría de los casos (Reyda et al., 2014).

I.2. PATOGÉNESIS Y RESPUESTA INMUNE

La infección por HCMV es frecuente y ubicua. Se estima que la prevalencia de HCMV varía entre el 30 y el 90% de la población humana, depende de la zona geográfica, aumenta con la edad del individuo y en condiciones socioeconómicas desfavorables (Staras et al., 2006).

El reservorio del HCMV es estrictamente humano. En la población general, la infección primaria se produce por contacto directo con fluidos corporales como orina, secreciones cervicales, esperma, saliva, leche, lágrimas, sangre, o mediante el trasplante de órganos cuando éstos provienen de donantes seropositivos (Sia et al., 2000). El HCMV es el único miembro de la familia de los *Herpesvirus* que muestra una transmisión transplacentaria natural mediante replicación y transporte en la placenta (Crough & Khanna, 2009).

Se define infección por HCMV el aislamiento del virus o la detección de proteínas virales o ácidos nucleicos en algún fluido corporal o muestra de tejido, aún en ausencia de síntomas. Se considera que el paciente sufre enfermedad por HCMV cuando existen hallazgos histopatológicos en los órganos afectados, se suele asociar a cargas virales elevadas y con frecuencia está asociada a una elevada mortalidad. Los síndromes clínicos más característicos de la enfermedad por HCMV son neumonía, enfermedad gastrointestinal, hepatitis, síndrome por HCMV (caracterizado por fiebre y pancitopenia), retinitis y encefalitis (Ljungman et al., 2002; Rovira & Ruiz, 2007).

La infección inicial suele ocurrir durante la infancia y generalmente es asintomática. Puede darse un síndrome mononucleósico autolimitado con fiebre y malestar general, entre otros síntomas. La infección por HCMV provoca principalmente una infección lítica en diferentes tipos celulares y se

produce cuando el virus infecta a células epiteliales, mayoritariamente. Posteriormente pasa al torrente sanguíneo infectando células sanguíneas, fibroblastos, células endoteliales y del músculo liso (Jarvis & Nelson, 2002; Sia et al., 2000; Sinzger et al., 2000). La replicación en el epitelio ductal contribuye a su difusión mediante fluidos corporales. La replicación viral activa está fuertemente suprimida por el sistema inmunitario, ya que en individuos inmunocompetentes, el HCMV se mantiene en un estado de latencia, principalmente, en las células precursoras mieloides CD34⁺ y monocitos CD14⁺, que posteriormente se diferenciarán en macrófagos y células dendríticas, entre otras (McCormick & Mocarski, 2015).

El HCMV consta de una fase latente y una fase lítica, que se suceden por periodos de reactivación. Si el sistema inmune funciona correctamente, la infección primaria es autolimitada, y tras el establecimiento de la latencia (es decir, no hay infección productiva), el virus mantiene una infección persistente, o infección productiva de bajo nivel, controlada por el mismo (Sinclair, 2008). El HCMV tiene un perfil de transcripción altamente restringido, además de otros factores relacionados con la manipulación de la célula huésped, de la señalización celular, la inhibición de la vigilancia inmune del huésped y el estrés celular. Este perfil transcripcional hace que la fase de latencia esté asociada a determinados genes virales que son expresados durante la misma (Poole & Sinclair, 2015).

En la infección por HCMV se activan mecanismos y vías tanto de la respuesta inmune innata como adaptativa, ya que el HCMV es un potente inmunógeno. Se ha visto que la inmunidad humoral parece estar más implicada en la prevención de adquisición de la enfermedad por HCMV. Por el contrario, la inmunidad celular es crítica en el control de la replicación viral (Sanbonmatsu et al, 2014).

Introducción

Durante la infección por HCMV, se produce la liberación de citoquinas, quimiocinas y moléculas de adhesión con el fin de reclutar células inflamatorias para el control de misma (Nordøy et al., 2000). Se ha visto que el antígeno pp65 atenúa la respuesta del interferón (Abate et al., 2004; Browne et al., 2003) y el IE está implicado en la supresión de la respuesta al mismo (Paulus et al., 2006).

Como parte de la respuesta inmune humoral, los anticuerpos neutralizantes se dirigen principalmente contra las proteínas del virus gB y gH, importantes para la entrada del virus en la célula. Por lo general, la respuesta inmune primaria corre a cargo de las IgM y en las reactivaciones, de la IgG.

El HCMV existe como diferentes genotipos, que pueden dar lugar a reinfecciones por cepas diferentes, para las cuales no protege la inmunidad innata. Se requiere una respuesta inmune potente frente a amplio rango de antígenos virales mediada por los linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ para la defensa frente al HCMV (Gandhi & Khanna, 2004). Para el control de la infección por HCMV es esencial la inmunidad celular y las principales dianas de los linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ son las proteínas virales IE-1 y pp65. Cuando se produce la infección primaria, hay un aumento de las células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas para HCMV, esto se relaciona tanto con una reducción de la reactivación como de la enfermedad por HCMV. El correcto funcionamiento de la inmunidad celular se asocia a un curso clínico favorable en el contexto del TPH (Sanbonmatsu et al., 2014). Las células T CD8⁺ no son suficientes por sí solas para el control de la replicación viral, ya que las células T CD4⁺ son esenciales para la recuperación de la infección (Sester et al., 2002).

Por otro lado, las células T polifuncionales, en particular las que producen simultáneamente la Interleuquina-2 (IL-2), el Factor de Necrosis

Tumoral alfa (TNF- α), y el Interferón gamma (IFN- γ) tras la exposición al antígeno, son un factor crucial en el control de la infección persistente por HCMV (Lachmann et al., 2012).

I.3. DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN Y ENFERMEDAD POR HCMV

El diagnóstico de laboratorio de HCMV deberá abordarse de diferente manera dependiendo del paciente, los recursos disponibles y la patología de base. En este documento, contextualizaré el diagnóstico en el entorno del trasplante, tanto de órgano sólido como trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos. El diagnóstico de la enfermedad HCMV se realiza de acuerdo a los signos y síntomas clínicos en conjunción con la detección de HCMV en la sangre y en los tejidos afectados. El diagnóstico de enfermedad invasiva no carece de inconvenientes, ya que la mera presencia del virus en el tejido no implica necesariamente relación de causalidad, por lo que tendrá que valorarse en función de la clínica. La muestra clínica utilizada variará en función del estudio a realizar y según la sospecha diagnóstica (Gandhi & Khanna, 2004).

I.3.1. Estudios Serológicos

Los **estudios serológicos** valoran la respuesta inmune humoral mediante la detección en suero de los anticuerpos IgM e IgG. En el contexto del trasplante, la utilidad de estas técnicas radica en la determinación del estatus serológico de donante y receptor. En menor medida nos informa de

una infección primaria, ya que una IgM positiva no permite detectar infección recurrente y se mantiene elevada durante meses. Existe una amplia gama de técnicas serológicas para la determinación del HCMV, desde las manuales hasta las más complejas. La tendencia actual es utilizar técnicas automatizadas que nos permitan trabajar con grandes volúmenes de muestras y en poco tiempo. Entre ellas destacan la quimioluminiscencia (CLIA, del inglés, ChemiLuminescent Immuno Assay) y el ELISA (del inglés, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Existen técnicas manuales más sencillas, como la aglutinación con partículas de látex y la inmunocromatografía, que se emplean en hospitales de tercer nivel para realizar serologías en donantes de órganos (Sanbonmatsu et al., 2014).

I.3.2. Cultivo Celular

El **cultivo** del HCMV en fibroblastos humanos es una técnica en desuso, ya que es un procedimiento lento y requiere al menos 21 días para dar un resultado negativo. Solo se consideraría su uso para las pruebas de resistencia (Gandhi & Khanna, 2004; Sanbonmatsu et al., 2014). Se dispone de una técnica denominada Shell-Vial que permite un diagnóstico más temprano, de 18 a 48 horas y de la que existen kits comerciales disponibles. Esta técnica tiene un valor predictivo positivo elevado para la enfermedad por HCMV en pacientes trasplantados, siempre que se utilice la muestra adecuada en cada caso (Sanbonmatsu et al., 2014).

I.3.3. Detección de la Antigenemia

La prueba de la **antigenemia** es un método fiable, rápido y sensible. Se basa en el empleo de anticuerpos monoclonales para la detección de la proteína viral pp65, antígeno viral mayoritario presente en los leucocitos de sangre periférica durante la infección por HCMV. Es un marcador indirecto de infección, ya que cuantifica los leucocitos positivos para pp65, por tanto, puede haber células no infectadas que contengan proteínas de HCMV. La presencia de una célula positiva ya es indicativa de infección, pero el umbral varía dependiendo del contexto clínico en el que nos encontremos. A pesar de ser una técnica muy estandarizada, tiene algunos inconvenientes que hacen que su uso decaiga frente a las técnicas moleculares cuantitativas, sobre todo, en el contexto del trasplante (Gandhi & Khanna, 2004; Sanbonmatsu et al., 2014).

I.3.4. Monitorización Inmunológica

Es conveniente realizar una **monitorización inmunológica** que nos permita valorar la inmunidad celular mediante la identificación del número de células protectoras frente a la infección y reactivación por HCMV. Esta herramienta nos informa de la capacidad del paciente trasplantado de responder al virus después del trasplante, con el fin de instaurar tratamientos preventivos. La cantidad de IFN- γ producido por las células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas para HCMV se correlaciona con la protección frente a la infección por HCMV después del trasplante (Bunde et al., 2005; Sester et al., 2001). En este sentido, se han desarrollado varias técnicas que miden las respuestas de las células T específicas para HCMV en los pacientes sometidos a trasplante. Estos métodos se basan en la detección de la respuesta inmune celular

Introducción

mediante la medida y cuantificación en sangre total de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ específicos de HCMV. Entre estos métodos se encuentran la tinción de multímeros del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), el ELISPOT, la citometría de flujo y el QuantiFERON[®]-CMV (Ciáurriz et al., 2015; Crough & Khanna, 2009).

Los multímeros del CMH facilitan la identificación directa y el conteo de células T. Estos multímeros están formados por moléculas HLA (del inglés, Human Leukocyte Antigen) de clase I y péptidos antigénicos, unidos covalentemente a fluorocromos, lo que nos permite la visualización directa, conteo y caracterización de las células T CD8⁺ específicas del virus (Ciáurriz et al., 2015; Crough & Khanna, 2009).

El ELISPOT (del inglés, Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay) es un ensayo funcional de inmunoabsorción ligado a enzima (Crough & Khanna, 2009). Detecta la liberación de IFN- γ por los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en respuesta a la estimulación de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, del inglés, Peripheral Blood Mononuclear Cells) por el HCMV (Ciáurriz et al., 2015; Crough & Khanna, 2009).

QuantiFERON[®]-CMV (QF-CMV) es recomendable por ser una técnica simple, rápida, estandarizada y con disponibilidad comercial. Se basa en la medición de los valores de IFN- γ producidos por los linfocitos T CD8⁺ cuando se estimulan in vitro con antígenos de HCMV como pp65, pp50, IE-1 y gB, específicos para amplia gama de alelos HLA de clase I. Permite la medición de la respuesta específica para HCMV, pero el mayor inconveniente radica en que no evalúa la inmunidad mediada por los linfocitos T CD4⁺ (Ciáurriz et al., 2015; Crough & Khanna, 2009; Sanbonmatsu et al., 2014).

La Citometría de flujo tras tinción intracelular de citoquinas (ICS, del inglés, Intracellular Cytokine Staining) permite la detección de diversas citoquinas efectoras Th1, generalmente IFN- γ y TNF- α , en las PBMCs o en sangre total, en respuesta a la estimulación in vitro con péptidos virales, lisis del virus completo o células dendríticas inmaduras infectadas por el HCMV (Crough & Khanna, 2009). A pesar de que requiere equipos y personal especializado es un método muy empleado, sobre todo en investigación, para estudiar la recuperación funcional de los linfocitos T específicos para HCMV después del trasplante, ya que es útil para predecir la aparición de la enfermedad o la reactivación en este contexto clínico (Ozdemir et al., 2002; Sanbonmatsu et al., 2014).

Actualmente, no existe consenso en cuanto a las técnicas que evalúan la inmunidad en pacientes después del trasplante. Para la elaboración de esta tesis he utilizado la última técnica detallada, por tener buenos resultados en anteriores estudios de nuestro grupo.

I.3.5. Técnicas moleculares

En cuanto al **diagnóstico molecular**, de las técnicas que se utilizan hoy en día, la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (del inglés Polymerase Chain Reaction) cuantitativa en tiempo real es la más empleada (QRT-PCR). Son métodos rápidos y automatizados, que nos permiten determinar la carga viral de HCMV para instaurar un tratamiento más temprano y obtener resultados beneficiosos (Sanbonmatsu et al., 2014). Para la determinación de la carga viral se puede utilizar tanto plasma como sangre total, pero se ha visto que hay mayor correlación con la replicación activa de HCMV en muestras de plasma, ya que en sangre total los leucocitos pueden

Introducción

albergar el virus en estado de latencia (Kulkarni et al., 2001). Aun así, las cargas de ADN de HCMV medidas en sangre total y plasma tienen una correlación significativa (Gandhi & Khanna, 2004).

La QRT-PCR permite la monitorización de la DNAemia (presencia de ADN viral en sangre) en pacientes trasplantados, esencial para el manejo clínico de estos pacientes. También permite la correlación entre altos niveles de ADN viral y la presencia de síntomas clínicos en los receptores de trasplante, aunque la existencia de carga viral no implica necesariamente el desarrollo de enfermedad clínica, por lo que debería valorarse si es necesario el tratamiento en cada paciente concreto (Crough & Khanna, 2009; Gandhi & Khanna, 2004). Existen varios ensayos disponibles de QRT-PCR que se diferencian en el gen diana que amplifican, la naturaleza de la sonda o la plataforma utilizada para el procedimiento (Aguado et al., 2012; Pérez-Romero et al., 2015).

Las técnicas de amplificación y secuenciación de ácidos nucleicos basadas en ARNm están mostrando resultados alentadores en pacientes sometidos a trasplante, ya que el ARNm solo está presente cuando el virus está replicando (Gandhi & Khanna, 2004; Sanbonmatsu et al., 2014).

Las técnicas moleculares también se emplean para la identificación de mutaciones responsables de la resistencia a los antivirales utilizados para combatir la infección por HCMV, mediante métodos genotípicos (Sanbonmatsu et al., 2014).

I.4. HCMV en el contexto del Trasplante Alogénico de Precusores Hematopoyéticos (alo-TPH)

El trasplante alogénico de precusores hematopoyéticos (alo-TPH) representa una herramienta ampliamente utilizada en el tratamiento de diversas enfermedades hematológicas, tumores sólidos, algunas neoplasias malignas epiteliales, además de otras enfermedades no malignas. Las infecciones, son una de las complicaciones más graves de esta terapia, y en especial, la infección por HCMV. La infección por HCMV es una causa relevante de morbilidad y mortalidad en los receptores de alo-TPH (Boeckh & Ljungman, 2009; Pérez-Romero et al., 2015).

Los individuos que han sido sometidos a alo-TPH, reciben tratamientos con fármacos inmunosupresores potentes que tienen como objetivo tanto las células T CD4⁺ como CD8⁺, críticas para el control inmune del HCMV. El déficit de estas células puede conducir a la replicación incontrolada de HCMV y llevar a la lesión de órganos, poniendo en peligro la vida del individuo (Appelbaum, 2001; Cíaurriz et al., 2015). La restauración de la inmunidad adaptativa en el contexto del TPH es un proceso lento. Existe un mayor riesgo de infección activa por HCMV en los pacientes sometidos a alo-TPH, debido al retraso en la recuperación de las funciones celulares T y B que lleva a un deterioro de la respuesta de las células T citotóxicas específicas para HCMV (Hebart & Einsele, 2004).

Las infecciones por HCMV suelen producirse después del implante medular (alrededor del día +30) hasta el día 100 post-TPH. En los pacientes sometidos a alo-TPH, e inmunodeprimidos en general, los síndromes clínicos asociados a la enfermedad por HCMV se deben a factores indirectos como la liberación de citoquinas por parte del sistema inmune (Trilling et al., 2012).

Se han establecido factores de riesgo asociados a la infección por HCMV en el contexto del alo-TPH entre los que se encuentran:

- **Estado serológico de donante (D) y receptor (R):** un elevado porcentaje de pacientes D⁺/R⁻ desarrollan infección primaria por HCMV, por el contrario, el serostatus D⁻/R⁻ tendría, a priori, mejor pronóstico. Se ha observado que los trasplantes D⁺/R⁺ generan mayores niveles de células multifuncionales T específicas para HCMV, por lo que requieren menor terapia antiviral comparada con los D⁻/R⁺, ya que estos últimos dependen de la exposición al antígeno de HCMV durante su reactivación para la reconstitución de la inmunidad celular específica (Jaskula et al., 2012; La Rosa & Diamond, 2012; Zhou et al., 2009). Por otro lado, la recepción de un injerto de D⁻ cuando estamos ante un TPH mieloablatoivo y con HLA-no relacionado, parece afectar negativamente a la supervivencia del TPH, ya que aumenta la tasa de infección activa y enfermedad por HCMV (Pérez-Romero et al., 2015).

- **Grado de disimilitud en el Antígeno Humano Leucocitario (HLA, del inglés Human Leukocyte Antigen) entre Donante y Receptor:** la falta de compatibilidad óptima entre donante y receptor se asocia a mayor riesgo de Enfermedad Injerto Contra Huésped (EICH) aguda y mayor tasa de reactivación e infección por HCMV (Jaskula et al., 2012).

- **Regímenes de acondicionamiento:** El acondicionamiento puede tener diferente intensidad, en función de si es No Mieloablatoivo o Mieloablatoivo. En el primer caso, se asocia con menor riesgo de infección por HCMV, sin embargo, este efecto no protege frente a complicaciones. La mayor incidencia de reactivación por HCMV, en el acondicionamiento mieloablatoivo, se relaciona con

una recuperación insuficiente de las células T CD8⁺ (Mossa & Khana, 2004).

- **Grado de inmunosupresión:** los fármacos inmunosupresores permiten al receptor poder mantener el injerto y evitar la EICH, ya que sigue siendo la principal complicación letal que limita la aplicación del alo-TPH. Estos regímenes con altas dosis de corticosteroides, micofenolato de mofetilo y ciertos fármacos anti-células T (como la globulina anti-timocítica), se consideran de alto riesgo para la infección por HCMV (Ljungman, 2008).

- **Tipo de profilaxis para la EICH:** Las respuestas inflamatorias asociadas con infecciones por HCMV juegan un papel importante en la fisiopatología del rechazo agudo y crónico del injerto (Kaden & Priesterjahn, 2000; Streblow et al., 2003).

- También influyen **otros factores** como el tipo de fuente de células madre (sangre periférica, médula ósea o cordón umbilical) y la edad del paciente entre otros (Ljungman, 2008).

La infección por HCMV en personas sanas es, por lo general, autolimitada. Por el contrario, en el paciente inmunodeprimido, por tanto, en el contexto del trasplante es algo diferente. En las primeras etapas post-TPH, el repertorio celular del donante interactúa con el entorno del receptor, lo que produce una expansión clonal frente a diversos antígenos, impulsado por la linfopenia y por las citoquinas. Para que haya un buen control de la infección por HCMV en este contexto clínico, tiene que existir una interacción sinérgica entre las respuestas innata y adaptativa del sistema inmune. En el alo-TPH puede ocurrir una reactivación de la latencia del HCMV, causa bien establecida de morbilidad y mortalidad (Ciáurriz et al., 2015).

Se ha visto una fuerte asociación entre la falta de células T CD8⁺ HCMV-específicas y el desarrollo de enfermedad por HCMV después del TPH, ya que estas células desempeñan un papel crucial en la limitación de la replicación de HCMV. Por tanto, sería de especial interés la identificación del número de células protectoras frente a la infección y reactivación por HCMV para prevenir la aparición de la infección activa y la enfermedad por HCMV. Las células T CD8⁺ funcionales específicas para HCMV no son suficientes para controlar la replicación viral, ya que las células T CD4⁺ efectoras de memoria son necesarias para la recuperación de la infección (Ciáurriz et al., 2015; Pérez-Romero et al., 2015). Los pacientes con respuestas pobres de las células T CD4⁺ y CD8⁺ CMV-específicas dentro de los primeros 100 días post-trasplante y los pacientes con linfopenia de células T tienen un alto riesgo de reactivación viral recurrente. Así, la reconstitución de la inmunidad T específica para HCMV es un marcador predictor de mejoría de resultados clínicos y de la supervivencia (Pérez-Romero et al., 2015; Pourgherysari et al., 2009).

En la infección temprana por HCMV post-TPH, las células asesinas naturales, también llamadas NK (del inglés, Natural Killer) están implicadas en el control de la viremia, sobre todo en aquellos pacientes con carencias en la inmunidad de las células T específicas para HCMV (Pérez-Romero et al., 2015).

I.5. HCMV en el contexto del Trasplante de Órgano Sólido (TOS)

La infección por HCMV sigue siendo un problema para los pacientes receptores de trasplante de órgano sólido (TOS), contribuyendo a una

importante morbilidad y mortalidad, y a una disminución de la supervivencia del injerto (Aguado et al., 2012; Crough & Khanna, 2009). El HCMV es importante, especialmente en los receptores de TOS que no tienen una inmunidad adquirida específica preexistente por adquisición de una infección primaria (Freeman, 2009; Razonable et al., 2013).

En el TOS, las infecciones por HCMV pueden ser consecuencia de infecciones primarias originadas a partir del órgano trasplantado, por reactivaciones de infecciones previas en el receptor a causa de la inmunodepresión, y sobreinfecciones por una cepa del donante seropositivo. En el contexto del TOS, las infecciones primarias suelen ser más frecuentes y más severas que las reactivaciones. El desarrollo de enfermedad por HCMV tras una infección primaria, es un problema para el paciente sometido a TOS, pero no para los pacientes VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana) ni los sometidos a TPH (Sanbonmatsu et al., 2014). Los receptores seropositivos para HCMV frecuentemente desarrollan episodios de replicación del HCMV que se derivan tanto de la reactivación viral como de reinfecciones por una cepa heterotípica del virus transmitida por el alo-injerto (Razonable et al., 2013).

La infección por HCMV suele aparecer entre el primer y el cuarto mes posterior al trasplante, que es cuando hay mayor inmunosupresión (Kotton et al., 2010).

Hay una gran variación en la incidencia de la infección por HCMV según el órgano que se trasplante (es mayor en los trasplantados de corazón-pulmón que en los de riñón), el estado serológico de donante y receptor y la estrategia de prevención utilizada (Ramanan & Razonable, 2013). Al igual que para el alo-TPH, para este tipo de trasplante también se conocen los factores de riesgo que propician que se produzca la infección por HCMV, entre ellos

Introducción

se encuentran: (i) la EICH; (ii) el estado serológico de donante y receptor (D^+/R^-), ya que en receptores de TOS la enfermedad por HCMV tardía es más frecuente y grave en los receptores con serología negativa para HCMV que reciben un órgano de donante positivo para HCMV (Crough & Khanna, 2009; Humar et al., 2010; La Rosa & Diamond, 2012); (iii) las co-infecciones virales como la del herpesvirus humano tipo 6 (HHV-6); (iv) el tipo y la intensidad del régimen inmunosupresor (que incluye fármacos como la globulina antitímocítica); y (v) la sepsis y la cirugía, por estimular el TNF que puede reactivar al HCMV que se encontraba en estado de latencia (Kotton et al., 2010).

La enfermedad por HCMV se debe, sobre todo, a efectos directos provocados por el virus, y a efectos indirectos que se asocian tanto a la aparición como al curso de la EICH, a la aceleración de aterosclerosis de las arterias del órgano trasplantado, a un aumento de aparición de sobreinfecciones bacterianas y fúngicas y a la disfunción del órgano trasplantado (Crough & Khanna, 2009; Kotton et al., 2010).

La carga viral no siempre refleja lo que sucede a nivel de órgano, muchas veces es más importante la evolución de la carga viral en el tiempo, ya que sobre todo en los primeros días después del TOS, puede tener valores bajos o incluso ser negativa. Las cargas virales bajas se han relacionado con efectos indirectos como lesiones vasculares en el injerto, diabetes mellitus, infecciones bacterianas y fúngicas y EICH, de manera que habría que valorar el tratamiento antiviral en estos casos (Humar et al., 2004).

I.6. Estrategias preventivas frente a la infección por HCMV en el contexto clínico del trasplante: Profilaxis Antiviral y Tratamiento Anticipado

La prevención de la enfermedad orgánica por HCMV es un objetivo en los pacientes trasplantados. Para ello, disponemos de dos estrategias distintas que en última instancia tienen como objetivo final reducir la morbilidad y la mortalidad por HCMV, por tanto, las dos son enfoques útiles para la prevención de la enfermedad por HCMV (Aguado et al., 2012; Ciáurriz et al., 2015).

La profilaxis antiviral tiene como objetivo reducir la incidencia de infección o enfermedad orgánica por HCMV después del trasplante mediante la administración de fármacos antivirales para todos los pacientes en riesgo, incluso en ausencia de datos clínicos o microbiológicos de infección. En cambio, la finalidad de la terapia preventiva o tratamiento anticipado es la intervención temprana cuando se detecta reactivación o infección por HCMV y el control de dicha infección, mediante la monitorización periódica de la carga viral en sangre o de la antigenemia.

Tanto una estrategia como la otra son eficaces para la prevención de la enfermedad por HCMV (Kotton et al., 2013; Le Page et al., 2013; de la Torre-Cisneros et al., 2011), sin embargo, para los pacientes sometidos a TOS no existen ensayos clínicos aleatorizados que las comparen (Aguado et al., 2015).

La profilaxis antiviral universal puede ser beneficiosa en determinados casos, ya que evita la reactivación de otros herpesvirus y sus efectos indirectos. En cambio, la exposición prolongada a estos fármacos puede predisponer a enfermedad tardía por HCMV, además de aumentar el riesgo de resistencia y toxicidad debidas al tratamiento. En el contexto del TOS, se recomienda

Introducción

cuando el donante es seropositivo y el receptor es seronegativo para HCMV y en pacientes con trasplante de alto riesgo. Suele durar entre 3 y 6 meses, en función del grado de inmunosupresión y tipo de órgano trasplantado. Esta estrategia no se recomienda en trasplantes de donante y receptor con serología negativa para HCMV. Los fármacos más utilizados son el Ganciclovir (i.v.) y Valganciclovir (oral), y Valacyclovir (oral) en trasplante de riñón (Aguado et al., 2012).

El tratamiento anticipado minimiza los costes económicos y la toxicidad asociados al tratamiento, pero no hay una estandarización en los valores umbral para establecer los mismos criterios entre los diferentes hospitales, por lo que requiere una coordinación de diferentes departamentos a nivel hospitalario. En el paciente sometido a TOS, esta estrategia se administra en receptores con serología positiva para HCMV, excepto si el paciente es de alto riesgo o no hay posibilidades de monitorización (Aguado et al., 2012).

La herramienta de la que disponemos para poder instaurar el tratamiento anticipado con garantías es la monitorización de la carga viral de HCMV mediante PCR cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR) y, por otro lado, la monitorización inmunológica. La monitorización de la carga viral nos va a marcar el umbral de DNAemia de HCMV en sangre que se debe pasar para establecer el tratamiento anticipado. Por tanto, es necesario establecer un punto de corte de la carga viral de HCMV para pronosticar el riesgo de enfermedad por HCMV en el periodo post-trasplante (Pérez-Romero et al., 2015; Sanbonmatsu et al., 2014).

No existe estandarización entre centros acerca del inicio o el cese del tratamiento antiviral preventivo en función de la DNAemia (Le Page et al., 2013). La práctica habitual para pacientes sometidos a alo-TPH, es comenzar

la terapia cuando la carga de HCMV para muestras de plasma es de 100 a 10.000 copias/mL (o 1.000-10.000 copias/mL en sangre total). En cambio, para los pacientes que se someten a TOS con riesgo bajo o intermedio de enfermedad orgánica por HCMV se establece el punto de corte de 1.000 a 5.000 copias/mL de plasma (de 1.000 a 300.000 copias/mL en sangre total). Si el paciente requiere vigilancia más exhaustiva, se comienza el tratamiento anticipado cuando existe un aumento significativo en la carga viral entre dos determinaciones consecutivas realizadas con una semana de diferencia (Aguado et al., 2012; Boeckh & Ljungman, 2009; Sanbonmatsu et al., 2014).

La frecuencia óptima de monitorización de carga viral suele ser una vez por semana durante los primeros 100 días después del trasplante y en cada visita del paciente posteriormente. Si existe infección activa, se debe medir la carga viral dos veces a la semana y por cada episodio (Atkinson & Emery, 2011; Boeckh et al., 2003; Boeckh & Ljungman, 2009).

Aunque no existe consenso acerca del cese de la terapia antiviral, se recomienda mantenerla al menos 15 días y hasta la obtención de ADN de HCMV no detectable mediante QRT-PCR (Pérez-Romero et al., 2015).

En el contexto clínico del trasplante, ha cobrado especial importancia la monitorización inmune antiviral, es decir, la medición del número de células T específicas para HCMV, por los métodos expuestos anteriormente. La reconstitución de la respuesta inmune antiviral es esencial para la identificación de pacientes con mayor riesgo de infección por HCMV y poder así establecer el tratamiento anticipado en el caso que corresponda (Ciáurriz et al., 2015; Crough & Khanna, 2009).

I.7. Tratamiento de la infección por HCMV en el contexto del trasplante

I.7.1. Fármacos disponibles

Disponemos de diversos fármacos para las terapias preventivas y de tratamiento para la infección por HCMV. A continuación, se expone un breve resumen de los fármacos disponibles, su mecanismo de acción y su posible uso clínico.

El Ganciclovir (GCV) i.v. y su profármaco via oral, el Valganciclovir inhiben la síntesis del ADN del HCMV actuando sobre la ADN-polimerasa viral. Su principal efecto secundario es la mielosupresión. Estos fármacos requieren ser fosforilados para ser activos y la primera fosforilación corre a cargo de una proteinquinasa codificada por el gen UL97 del HCMV. El Ganciclovir-trifosfato es un inhibidor competitivo de la ADN-polimerasa viral y se incorpora al ADN viral, inhibiendo así la replicación (Aguado et al., 2012; Marcos, 2011). Se aconseja como primera línea de tratamiento el uso tanto de GCV i.v. como de Valganciclovir oral en pacientes con riesgo bajo o moderado de enfermedad por HCMV. Aunque diversos estudios han mostrado la no inferioridad de Valganciclovir frente a GCV, en el contexto del TOS, las guías recomiendan el uso de este último para niños y pacientes con enfermedad grave y potencialmente mortal por HCVM. GCV i.v. debe utilizarse en los pacientes en los que hay una mala tolerancia de Valganciclovir (Aguado et al., 2012; Marcos, 2011). Los efectos adversos del GCV cuando se administra a pacientes sometidos a TOS, son menos frecuentes que si se administra a pacientes que han recibido un TPH. En este contexto, el tratamiento con GCV requiere monitorización hematológica y de la función renal (Sia & Patel, 2000).

El Foscarnet (FOS) es un análogo de pirofosfatos, se administra vía i.v. y tiene elevada nefrotoxicidad, por lo que su uso es limitado a aquellos pacientes que no toleran el GCV o adquieren resistencia al mismo. Es un inhibidor no competitivo de la ADN-polimerasa, no requiere activación y no se incorpora a la cadena de ADN viral (Aguado et al., 2012; Marcos, 2011; Sia & Patel, 2000).

El Cidofovir (CDV) se administra vía i.v. y es un inhibidor competitivo de la ADN-polimerasa del HCVM, requiere la fosforilación para ser activo, pero esta fosforilación corre a cargo de enzimas celulares y no del virus (Aguado et al., 2012; Marcos, 2011; Sia & Patel, 2000).

Otros fármacos como el Aciclovir y Valaciclovir, que se administran vía oral, no se recomiendan para el tratamiento de la enfermedad orgánica por HCMV.

La terapia con inmunoglobulinas puede ser eficaz en el tratamiento de la enfermedad por HCMV en los pacientes con TOS, aunque el tratamiento es costoso, puede estar justificado en determinados grupos de pacientes (Sia & Patel, 2000).

Es importante administrar las dosis correctas, ya que dosis subóptimas pueden dar lugar a la generación de resistencias y al fracaso terapéutico. Por otro lado, dosis por encima de lo adecuado pueden regenerar nefrotoxicidad. Se recomienda la monitorización de la función renal durante el tratamiento, especialmente si se administra concomitantemente con fármacos nefrotóxicos.

La duración del tratamiento no deberá ser inferior a 15 días y se decidirá en función de la evolución clínica y la vigilancia virológica mediante antigenemia semanal o QRT-PCR (Aguado et al., 2012; Marcos, 2011; Sia &

Patel, 2000). Cuando se obtenga un resultado negativo, ya sea de antigenemia o QRT-PCR se pondrá fin al tratamiento, excepto en pacientes de alto riesgo que serían necesarios dos resultados negativos. En determinados casos puede considerarse administrar profilaxis antiviral secundaria después del tratamiento. (Aguado et al., 2012; Marcos, 2011). En pacientes con TPH tras un resultado negativo de QRT-PCR puede interrumpirse el tratamiento antiviral con Ganciclovir (Sia & Patel, 2000).

I.7.2. Resistencia a antivirales

Cuando la carga viral o antigenemia es progresiva o estable, o se observa persistencia de los síntomas clínicos a pesar del tratamiento con GCV durante al menos dos semanas, puede sospecharse que se haya desarrollado resistencia al mismo. No obstante, no todos los fallos del tratamiento pueden ser atribuidos a resistencia viral. Los factores de riesgo que predisponen esta situación son la exposición prolongada o exposición a niveles subóptimos del fármaco, trasplante de pulmón y páncreas, falta de inmunidad específica para HCMV, replicación elevada y fuertes tratamientos inmunosupresores (Aguado et al., 2012; Marcos, 2011).

Existen técnicas moleculares de análisis genotípico para evaluar esta resistencia. Por ejemplo, la resistencia a GCV se debe a la mutación en el gen UL97, que codifica para una proteinquinasa que fosforila el GCV a su forma activa (Marcos, 2011; Sanbonmatsu et al., 2014). Por otro lado, el gen UL54, es la diana de acción de otros fármacos antivirales, ya que codifica para la ADN-polimerasa viral. Por tanto, una mutación en el gen UL54 puede conferir resistencia al mismo tiempo a GCV, FOS y CDV. El tratamiento en cada caso debe valorarse de acuerdo a las pruebas de resistencia, condiciones

inmunes de los pacientes y gravedad de la enfermedad (Aguado et al., 2012; Marcos, 2011).

I.7.3. Terapias alternativas

En la actualidad, no hay evidencia sobre la eficacia de los tratamientos alternativos para la enfermedad por HCMV resistente a los antivirales utilizados en la práctica clínica habitual. En algunos casos, Leflunomida, Sirolimus y Artesunato han mostrado buenos resultados (Aguado et al., 2012; Boeckh et al., 2009; Marcos, 2011). Se está ensayando un profármaco lipídico oral de CDV, el Brincidofovir, con mayor actividad y que, aunque ha mostrado buenos resultados en HCMV resistente a CDV, GCV y FOS, se ha quedado en estudios de fase III por sus efectos adversos (Pérez-Romero et al., 2015).

Maribavir es un fármaco antiviral con buena biodisponibilidad oral, sin toxicidad hematológica, renal ni hepática. A priori, parece buena opción frente a cepas con resistencia a GCV, aunque no se debe utilizar conjuntamente ya que inhibe la quinasa codificada por el gen UL97, que fosforila al GCV (Aguado et al., 2012; Boeckh et al., 2009; Marcos, 2011).

En la actualidad existen otras estrategias en estudio, como los fármacos Letermovir, Ciclopropavir, terapias con ácidos nucleicos y transferencia de células T que aventuran resultados prometedores (Pérez-Romero et al., 2015).

I.7.4. Vacunación

La prioridad en la prevención del HCMV pasa por el desarrollo de una vacuna eficaz frente al virus, ya que, a pesar de haber numerosos ensayos clínicos, no hay ninguna vacuna disponible para su uso. Una de las primeras vacunas que se sintetizó, en este caso viva atenuada, reducía la gravedad por la infección de HCMV en receptores de trasplante renal con donante seropositivo y receptor seronegativo para HCMV. Esta vacuna estaba basada en la cepa *Towne* muy inmunogénica, pero no confería la protección observada tras la infección natural y, por tanto, no impedía la infección primaria (Plotkin et al., 1984).

Con los avances científicos se han desarrollado vacunas que utilizan proteínas recombinantes y vectores del virus para aumentar la inmunogenicidad. Una de ellas, está compuesta por plásmidos que codifican el antígeno de superficie gB y la pp65 diseñada para aumentar no solo la síntesis de anticuerpos gB específicos sino también la de células T gB-específicas (Kharfan-Dabaja et al., 2012).

I.8. Polimorfismos de un único nucleótido en la Infección y Enfermedad Orgánica por HCMV

Un polimorfismo es una variación en la secuencia de ADN que se produce en la población, con una frecuencia mayor o igual al 1% (Brookes, 1999). Los polimorfismos pueden ocurrir en regiones codificantes, sin embargo, también pueden darse en secuencias no codificantes, intrones, o en regiones intergénicas (Karki et al., 2015).

Un polimorfismo de un único nucleótido o SNP (del inglés, Single Nucleotide Polymorphism) es una variación en la secuencia del ADN que afecta a una sola base de una secuencia del genoma, lo que provoca que existan secuencias alternativas (alelos) en los individuos de una población. Se pronuncia “SNIP” y son el tipo de variación más frecuente en el genoma humano en un promedio aproximado de 1 SNP por cada 1.000 – 2.000 pares de bases, por tanto, están en cantidad suficiente para hacer un análisis de haplotipos. Además, los SNPs son binarios, lo que permite su automatización en un genotipado de alto rendimiento. Las técnicas empleadas para su detección son simples, siguen una herencia mendeliana y presentan una baja tasa de mutación (Karki et al., 2015).

Utilizando los SNPs podemos ser capaces de evaluar el grado en que los haplotipos comunes contribuyen al riesgo de una enfermedad. Esto ayudará al estudio de la patología, los métodos de diagnóstico y prevención, y en última instancia al desarrollo de una medicina personalizada (Ye et al., 2001).

Existen SNPs ubicados en regiones promotoras de genes que codifican para determinadas citoquinas de forma individual o en forma de haplotipos, y que han sido asociados a un aumento de los niveles de expresión génica, lo que conlleva a una mayor susceptibilidad a diversas patologías infecciosas (Sugiyama et al., 2011).

Se ha visto que determinados SNPs en genes implicados en la activación o en la regulación de la respuesta inmune innata y adaptativa pueden modular la susceptibilidad y la historia natural en ciertas infecciones virales crónicas (Ge et al., 2009; Netea et al., 2012). La inmunidad innata desempeña un papel crucial en la prevención de la infección por HCMV. En este sentido, los SNPs en genes que codifican para citoquinas o receptores de

citoquinas parecen estar asociados a un riesgo de infección (Bidwell et al., 1999).

Los receptores tipo Toll (TLR, del inglés Toll Like Receptor) juegan un papel clave en el sistema inmune innato y adaptativo, y están implicados en numerosos procesos infecciosos y autoinmunes (Green & Marshak-Rothstein, 2011). La capacidad de respuesta de los TLRs puede verse afectada por los SNPs de los genes que los codifican, resultando en una mayor susceptibilidad a ciertas enfermedades inflamatorias o infecciosas (Akira et al., 2006; Lasker & Nair, 2006; Lazarus et al., 2002). Los TLRs son necesarios para que el sistema inmune reconozca al HCMV y asegure una respuesta antiviral rápida. En este sentido, existe una complejidad entre los patógenos y las respuestas inmunes del huésped en el entorno del trasplante. Los SNPs pueden suponer un factor de riesgo de infección en el contexto del TPH, ya que los polimorfismos en los TLR están asociados con una susceptibilidad a la infección patógeno-específica (Carvalho et al., 2009). Son varios los estudios que evidencian la influencia de los SNPs en los genes de los TLRs en cuanto a la susceptibilidad a las infecciones en pacientes trasplantados (Bochud et al., 2008; de Boer et al., 2011; Carvalho et al., 2009; Koldehoff et al., 2013; Mensah et al., 2009).

Se sabe muy poco acerca del papel de los polimorfismos en los genes de TLR en la patogénesis de la infección por HCMV en seres humanos. Estudios previos muestran que polimorfismos en el gen de TLR-2 se asocian a un aumento de la replicación y la enfermedad por HCMV en receptores de TOS (Kang et al., 2012; Kijpittayarit et al., 2007) y mutaciones en los genes de TLR-4 tienen relación con la incidencia de la enfermedad por HCMV en pacientes sometidos a TOS (Cervera et al., 2007).

Existen evidencias que apuntan a que las interacciones entre algunos TLRs con virus influyen tanto en la respuesta inmune, como en el resultado de la infección por HCMV (Arav-Boger et al., 2012; Boehme et al., 2006; Compton et al., 2003; Loré et al., 2003; Yew et al., 2012). El TLR-9, es el receptor más conocido expresado en células B humanas y sirve como receptor de reconocimiento de patrones que indican la presencia de HCMV, ya que reconoce motivos no metilados de dinucleótidos CpG en el ADN, no presentes en la célula huésped (Hornung et al., 2002). El TLR-9 tiene una alta heterogenicidad en la población (Varani et al., 2007). El HCMV activa las células del huésped a través de múltiples TLRs, predominantemente aquellos que residen en la superficie celular o en los endosomas. El TLR-9 endosomal está implicado en la señalización provocada por el HCMV, lo que conduce a una respuesta proinflamatoria y antiviral, como la producción de interferones tipo I (IFN-I) (Arav-Boger et al. 2012). El HCMV regula fuertemente los niveles de ARNm de TLR-9 en fibroblastos humanos, por lo que éste desempeña un papel central en la defensa del huésped contra la infección por HCMV (Iversen et al., 2009; Vaidya & Cheng, 2003).

Los polimorfismos en TLR-9 se asocian con diversas infecciones virales como el Síndrome de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), el Papilomavirus (HPV) y el HCMV (Bochud et al., 2007; Lai et al., 2013; Taniguchi et al., 2013). Los SNPs en TLR-9 1174G/A y 2848C/T están relacionados con la carga viral y la progresión de la infección en pacientes infectados por el VIH (Bochud et al., 2007; Pine et al., 2009; Soriano-Sarabia et al., 2008). Los polimorfismos en TLR-9 tienen un impacto en el desarrollo de la enfermedad por HCMV. Se ha visto que variaciones genéticas en el TLR-9 pueden desempeñar un papel en enfermedades asociadas con alteraciones en la respuesta inmune innata (Krieg, 2006).

Se sabe muy poco acerca de los SNPs en los genes de TLR-9 en relación con la infección por HCMV. Se ha informado que el SNP 1237T/C en el alelo C era altamente predictivo de susceptibilidad a la infección por HCMV en receptores de TPH (Carvalho et al., 2009). Sin embargo, los SNPs 1237T/C y 2848C/T en los genes de TLR-9 no mostraron efecto sobre la infección por HCMV en trasplante renal (Krüger et al., 2010).

El TLR-2 coopera con otros TLR de la familia, como TLR-1 y TLR-6 para el reconocimiento de ligandos. Se ha visto que ciertos virus como los Herpesvirus de tipo 1 y 2 (VHS-1 y VHS-2), el HCMV y el Virus Respiratorio Sincitial (VRS) inducen citoquinas proinflamatorias dependientes de TLR-2, lo que confiere mayor protección a la célula. Se han estudiado ciertos SNPs en los genes que codifican para TLR-2 que se asocian con la susceptibilidad y gravedad de infecciones virales (Bochud et al., 2007; Morrison, 2004; Murawski et al., 2009; Texereau et al., 2005).

Las células dendríticas (CDs) participan en el ciclo lítico del HCMV. Estas células expresan un tipo de receptor lectina tipo C (para la captura antigénica) que es el DC-SIGN (del inglés, Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-Grabbing Non-integrin) o también llamado CD209, que es una glicoproteína transmembrana que actúa como molécula de adhesión intercelular específica no integrina tipo 3. La proteína gB del HCMV es un ligando para el DC-SIGN. Este receptor tiene un papel importante en el reconocimiento del HCMV a través de las células dendríticas derivadas de monocitos (MDDCs, del inglés Monocyte-Derived Dendritic Cells) y es crucial para la infección desde una célula portadora de HCMV (CPA, célula presentadora de antígeno) a células no infectadas. Se requiere el bloqueo producido por el DC-SIGN mediante la neutralización mediada por anticuerpos, ya que es suficiente para reducir drásticamente la

unión del HCMV a la superficie celular, y por tanto, pone en peligro la infección productiva del HCMV a las MDDCs.

La Proteína Quimiotáctica de Monocitos 1 (MCP-1, del inglés Monocyte Chemotactic Protein-1), también llamada CCL-2, pertenece a la familia de las quimiocinas C-C y actúa como quimiotáctica y activador de linfocitos T y monocitos. Esta proteína se produce por muchos tipos celulares, como células endoteliales, fibroblastos, células epiteliales y del músculo liso, entre otros. La MCP-1 es importante para las respuestas inmunes antivirales en la circulación periférica y los tejidos, ya que regula la migración e infiltración de los monocitos, los linfocitos T y las células NK (Deshmane et al., 2009). Se ha demostrado que el promotor del gen que codifica para MCP-1 contiene sitios de unión para el factor de transcripción NF-kappa B (NF- κ B), por tanto, las modificaciones en este gen pueden influir en la inmunidad innata (Ueda et al., 1997).

La Quimiocina Receptora de tipo 5 (CCR-5, del inglés Chemokine Receptor Type 5), es una proteína transmembrana que funciona como un receptor de quimiocinas. CCR-5 se expresa predominantemente en linfocitos T, macrófagos, CD8 y microglía (Varani et al., 2005).

Se ha demostrado que citoquinas tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α , del inglés Tumor Necrosis Factor alpha), la interlequina-10 (IL-10) y el interferón gamma (IFN- γ) poseen propiedades antivirales, por tanto, sus polimorfismos pueden predisponer o no a la infección (Vu et al., 2014). En este sentido, existen asociaciones entre los SNPs de genes de determinadas moléculas coestimuladoras, en el contexto del TPH, y las infecciones virales (Saadi et al., 2013).

Introducción

La interleuquina-10 (IL-10) es una citoquina antiinflamatoria e inmunosupresora que inhibe la activación y la función de las células T, células NK y macrófagos (Conti et al., 2003; Mannino et al., 2015). Por otro lado, la IL-10 inhibe la síntesis de citoquinas proinflamatorias como la IL-1, IL-6 y el TNF y promueve la síntesis de anticuerpos y la formación de células T citotóxicas (Hurme et al., 2003). Se han estudiado los SNPs de la IL-10 en el contexto del TOS, y se ha visto que niveles altos de IL-10 predisponen a la propagación de la infección, mientras que niveles bajos de esta citoquina tienen efectos protectores frente a la reactivación por HCMV. Aunque, a priori, los genotipos asociados con altos niveles de producción de citoquinas parezca que tienen efectos beneficiosos frente al HCMV, estos efectos suceden más tarde, por lo que limitan la extensión del virus, pero no evitan la reactivación del mismo (Alakulppi et al., 2006).

El interferón tipo III o lambda interferón (IFN- λ_3 ; IL-28B) comparte muchas funciones biológicas con el interferón de tipo I y juega un papel importante en la respuesta a las infecciones virales (Hayes et al., 2011). La influencia de los SNPs en la IL-28B, todavía no ha sido bien caracterizada para infecciones virales distintas al virus de la hepatitis C (VHC). Dos estudios recientes, realizados en el contexto del TOS y TPH, apuntan a que la presencia del alelo menor del SNP de la IL-28B se asocia con menor replicación de HCMV después del trasplante, pero aún está por confirmar (Bravo et al., 2014b; Egli et al., 2014). Por otro lado, los SNPs en los genes de IFN- λ_3 influyen en la susceptibilidad a la replicación del HCMV en receptores de TOS, en especial, en pacientes que no reciben profilaxis antiviral (Manuel et al., 2015). Además, se ha demostrado el impacto relevante de SNP en los genes que codifican para la IL-28B en la incidencia de la infección activa por HCMV en receptores de trasplante de órgano sólido (Egli et al., 2014).

Los SNPs en genes relevantes relacionados con la inmunidad, tales como los que codifican para CCR-5, MCP-1, IL-10, TLR-9, TLR-2, DC-SIGN o la IL-28B, han mostrado ejercer una influencia tanto en el riesgo de infección como enfermedad por HCMV, así como en la dinámica de replicación del HCMV en el marco del TPH y en pacientes críticos (Bravo et al., 2014b; Carvalho et al., 2009; Loeffler et al., 2006; Mezger et al., 2008). En el contexto del TOS, se han relacionado con mayor riesgo de infección por HCMV, o mayor incidencia de enfermedad por HCMV determinados SNPs en genes, en donantes y receptores, que codifican para moléculas de reconocimiento de patrones y receptores (MBL o lectina de unión a manosa, ficolina-2, TLR-2 y TLR-4), citoquinas (IL-12, IL-10, IFN- γ , IFN- λ_3 o IL-28B), y proteínas de regulación inmune asociadas a la membrana (PD-1, de inglés, Programmed cell Death protein 1) (Brown et al., 2009; Cervera et al., 2009a,b; Egli et al., 2014; Hoffmann et al., 2008; Hoffmann et al., 2010; Kang et al., 2012; Kijpittayarit et al., 2007; Mitsani et al., 2011; de Rooij et al., 2011).

El sistema HLA, situado en el brazo corto del cromosoma 6, está formado por un conjunto de loci altamente polimórficos, y que, debido a que se encuentran en una misma localización cromosómica con alto desequilibrio de ligamiento, se heredan en haplotipos. Las moléculas HLA de clase I se encuentran en la superficie de casi todas las células. La función principal de las moléculas HLA de clase I es la de presentar péptidos antigénicos, provenientes de parásitos intracelulares, a los linfocitos T CD8⁺, con la finalidad de activar la respuesta inmune. Se ha visto, que los polimorfismos en los genes del HLA-I, actúan como biomarcadores genéticos. Como consecuencia de estas características, la determinación del polimorfismo o la tipificación HLA nos puede servir para predecir la susceptibilidad a padecer ciertas infecciones y estudiar la correlación con otros parámetros clínicos (Binkowski et al., 2012).

Introducción

No existe una caracterización completa de los factores de riesgo que modulan la infección por HCMV en el contexto clínico del trasplante. Por tanto, sería necesaria una definición precisa de los factores clínicos y biológicos que predisponen a la morbilidad relacionada con el HCMV para elegir la opción más adecuada sobre una base individual. La identificación de los rasgos genéticos que predisponen a la infección activa y a la enfermedad orgánica por HCMV puede permitir el diseño de estrategias de terapia preventiva, para anticiparnos y evitar las complicaciones relacionadas con el HCMV de forma individual, lo que puede traducirse en beneficios clínicos tangibles para los pacientes.

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La capacidad del HCMV de escapar a los mecanismos de defensa inmunológicos es multifactorial y se debe a un efecto inmunomodulador del virus sobre el sistema inmunológico del huésped. Por un lado, el HCMV provoca una inversión del cociente de las células T CD4⁺/CD8⁺ y, en segundo lugar, puede producir leucopenia. También es capaz de escapar al normal funcionamiento del sistema inmunológico a través de la reducción en la expresión de moléculas HLA (antígenos leucocitarios humanos) de clase I y II.

Las citoquinas son moléculas que median las respuestas inmunes e inflamatorias y se producen por una gran variedad de células. Las citoquinas influyen en el resultado del trasplante, ya que juegan un papel importante en el rechazo agudo y crónico del injerto, así como en el éxito del mismo.

Por todo esto, cabe esperar que determinados polimorfismos en citoquinas pro-inflamatorias puedan hacer más o menos susceptible al huésped de sufrir la infección y/o enfermedad por HCMV, al igual que ocurre con otras infecciones virales tales como la Hepatitis C. Son muchos los estudios que han demostrado que los polimorfismos en genes de citoquinas están asociados con los resultados clínicos de las enfermedades infecciosas y en contextos clínicos como enfermedades autoinmunes, trasplante de órganos y TPH (Awad et al., 2001; Freeman et al., 1999; Hurme et al., 2003; Gourley et al., 2004; Sahoo et al., 2000). Hay estudios que han identificado SNPs en genes implicados en la inmunidad innata que se asocian a un aumento de la incidencia de la infección o enfermedad por HCMV después del trasplante (Cervera et al., 2007; Kang et al., 2012; Manuel et al., 2007). Se ha estudiado la asociación entre determinados SNPs en genes que codifican para determinadas citoquinas en el rechazo agudo y crónico del trasplante renal, en la fibrosis tisular, en la aterosclerosis, en las reacciones inflamatorias

Justificación y Objetivos

y en la insuficiencia renal progresiva, en el contexto del trasplante renal (Sato et al., 2007).

El estudio de los SNPs en los genes de los receptores implicados en el reconocimiento viral será esencial para definir el fondo genético asociado con el riesgo de infección y enfermedad por HCMV. Sería interesante hacer un análisis de los SNPs en los genes de citoquinas que puedan mostrar susceptibilidad al HCMV, en los pacientes sometidos a trasplante, para que se pueda hacer una determinación del riesgo individual de la infección y enfermedad por HCMV y poder establecer una profilaxis personalizada.

Determinados polimorfismos genéticos en los genes que modulan la respuesta inmune innata, incluyendo los genes que codifican para las citoquinas CCR-5 (Quimiocina Receptora de Tipo 5), MCP-1 (Proteína Quimiotáctica de Monocitos tipo 1), IL-10 (Interleuquina 10), TLR-2 (Toll-like Receptor 2), TLR-9 (Toll-like Receptor 9), DC-SIGN e IL-28B (Interleuquina 28B), que son activadores y reguladores de vías inmunológicas, generan mecanismos inmunes que modulan la susceptibilidad individual a la infección por HCMV, tanto en pacientes trasplantados de órgano sólido como alogénicos, por lo que se podrían aplicar determinadas estrategias de prevención en dicha población.

Con todo lo expuesto, se pueden extraer diversos objetivos en los que se basará este trabajo de tesis.

OBJETIVOS

Artículo 1

- Investigar la influencia ejercida por los SNPs en genes que codifican para las citoquinas CCR-5, MCP-1, IL-10, y TLR-9, en donante y receptor, en la tasa de incidencia y la dinámica replicativa de la DNAemia por HCMV, desarrollada dentro de los primeros 100 días después del trasplante en el entorno del trasplante alogénico de células madre.

Artículo 2

Investigar el efecto individual y combinado de los SNPs en los genes CCR-5, MCP-1, IL-10, TLR-2, TLR-9, DC-SIGN e IL-28B sobre el riesgo de infección y enfermedad orgánica por HCMV en receptores de trasplante renal seropositivos para HCMV.

Artículo 3

Comprobar si el efecto de ciertos alelos de los antígenos leucocitarios de clase I (HLA-I) en la reactividad pre-trasplante en el contexto del TOS, determinada por el ensayo QuantiFERON-CMV® (QF-CMV), persiste al evaluarla mediante Citometría de Flujo para tinción intracelular de citoquinas (ICS).

Artículo 4

Investigar si el SNP rs12979860 de la IL-28B tiene algún efecto sobre la reconstitución de la inmunidad innata y adaptativa específicas para HCMV, y la magnitud de la expansión de las células T específicas para HCMV después del trasplante, provocada por la replicación del virus, en receptores de trasplante alogénico de células madre.

III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

III.1. Tipos y Poblaciones de Estudio

En el **primer artículo** se realizó un estudio multicéntrico observacional retrospectivo. La cohorte estaba compuesta por 102 pacientes (62 varones y 40 mujeres) que habían recibido un trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos (alo-TPH) entre 2006 y 2011. Los centros participantes fueron el Hospital Clínico Universitario (Valencia), el Hospital Morales Meseguer (Murcia) y el Hospital La Princesa (Madrid). Sólo se incluyeron en el presente estudio los pacientes atendidos en los hospitales participantes dentro de los plazos mencionados y de los cuales se obtuvo un volumen suficiente de plasma, previo al trasplante, para genotipificación de SNPs. El periodo de estudio comprendió los primeros 100 días después del trasplante.

El **segundo artículo** se basó en el estudio OPERA, que es un estudio multicéntrico observacional prospectivo de cohortes desarrollado para evaluar la incidencia de la infección activa y la enfermedad por HCMV y los factores de riesgo asociados en pacientes trasplantados renales seropositivos para HCMV. La población de estudio comprendía 315 pacientes que se sometieron a un solo trasplante renal y eran seropositivos para HCMV en la evaluación previa al trasplante desde marzo de 2011 a diciembre de 2012. Este estudio integró a 25 centros de trasplante españoles (Aguado et al., 2014). El periodo de seguimiento fue el comprendido entre el momento del trasplante hasta 12 meses después del mismo. Para la realización de este trabajo, se seleccionó la incidencia acumulada de infección activa por HCMV, asintomática o enfermedad orgánica, a los 12 meses, ya que en un estudio clínico previo se había observado una incidencia demasiado baja como para evaluar el efecto de los SNPs en este contexto clínico (Aguado et al., 2014).

En el **tercer artículo** se realizó un estudio observacional, descriptivo, unicéntrico y retrospectivo. El estudio se realizó a una cohorte de 43 pacientes seropositivos para HCMV que recibieron un trasplante de riñón entre marzo de 2013 y octubre de 2014. La media de edad de los pacientes fue de 60.6 años (SD= 14.2 años). De los cuarenta y tres pacientes, 41 (95.3%) fueron sometidos a diálisis en el momento de la inclusión. El centro de reclutamiento de muestras fue el Hospital Universitario “12 de octubre” (Madrid).

El **último trabajo** fue un estudio multicéntrico observacional retrospectivo en el que se incluyeron dos cohortes independientes. La cohorte A estaba formada por 85 pacientes de origen caucásico, que se sometieron a un trasplante alogénico de células madre, desde 2008 a 2014, en diferentes centros hospitalarios españoles. Así, 48 pacientes lo hicieron en la unidad de Hematología del Hospital Clínico Universitario (Valencia), 18 en el Hospital La Princesa (Madrid), 11 en el Hospital Ramón y Cajal (Madrid) y 8 en el Hospital Morales Meseguer (Murcia). Para pertenecer a esta cohorte era necesario cumplir con los criterios de inclusión, que eran: (i) que hubiera ausencia de DNAemia previa al análisis inmunológico; (ii) que estuvieran disponibles los datos de inmunidad de las células T CD8⁺ específicas para HCMV; (iii) disponer de al menos 3 muestras de plasma para la cuantificación de la IL-28B, obtenidas después del TPH, pero previas al análisis inmunológico; y (iv) la disponibilidad de datos sobre el genotipo de la IL-28B del donante. La cohorte B la formaban 57 pacientes que recibieron un TPH en el Hospital Clínico Universitario (Valencia) entre 2007 y 2014. Para este grupo los criterios de inclusión fueron los siguientes: (i) disponibilidad de datos de inmunidad de las células T CD8⁺ específicas para HCMV obtenidos durante el episodio de infección activa; (ii) disponibilidad de muestras de plasma para la determinación de la concentración de IL-28B, obtenidas durante el episodio de infección activa; y (iii) disponibilidad de datos del

genotipo de la IL-28B del donante. El periodo de estudio comprende los primeros 100 días después del trasplante. En este trabajo, el número de mediciones disponibles para las células T CD4⁺ específicas para HCMV fue menor que el de las células T CD8⁺ específicas para HCMV. Para la realización de los análisis, solo se consideraron los primeros episodios de DNAemia.

III.2. Monitorización Inmunológica: Tinción Intracelular de Citoquinas

La Citometría de flujo para tinción intracelular de citoquinas (BD Fastimmune, Beckton Dickinson and Company, Biosciences, San José, CA) se realizó para determinar el recuento de las células T CD4⁺ y CD8⁺ productoras de IFN- γ específicas para HCMV en todos los trabajos expuestos.

Para realizar dicha técnica, la muestra utilizada fue sangre total heparinizada, que se procesó dentro de las 24 - 30 horas posteriores a su recogida. Merece la pena destacar, que el retraso en el procesamiento muestral no tiene efecto significativo sobre la capacidad de respuesta de las células T al HCMV. Se utilizaron 0.5 mL de sangre total para su estimulación, durante 6 horas, conjuntamente con dos colecciones de péptidos solapantes de 15-mer que abarcan toda la secuencia de los péptidos altamente inmunogénicos de HCMV, como son las proteínas pp65 e IE-1 (1 μ g/mL por péptido en buffer fosfato salino / dimetilsulfóxido [PBS / DMSO]), obtenido de JPT Peptide Technologies GmbH (Berlín, Alemania), en presencia de 1 μ g/mL de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a las moléculas coestimuladoras CD28 y CD49d.

Metodología de la Investigación

Se realizó una estimulación en paralelo con PBS/DMSO, sin péptidos, pero sí con anticuerpos frente a CD28 y CD49d junto con 1 mg/mL de Fitohemaglutinina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) que actuaría estimulando la proliferación de células T.

Posteriormente se añadió Brefeldina A (10 µg/mL) y Monensina (1µM), inhibidores del transporte de proteínas intracelulares que se utilizan para permitir la acumulación de proteínas y que puedan ser detectadas por citometría. Esta mezcla se incubó durante 6 horas a 37°C.

A continuación, la sangre fue sometida a lisis. Las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) con un 2% de suero bovino fetal (FCS, del inglés, Fetal Calf Serum). La lisis celular se realizó mediante la adición de una solución de lisis (FACS Lysing Solution, Beckton Dickinson, San José, CA). La muestra se congeló a -80°C para su posterior tinción.

Para la realización de la técnica de tinción, la sangre estimulada se descongeló a 37°C y se lavó. Se procedió a la tinción de marcadores de superficie, como CD8-PerCP-Cy5.5, CD4-PerCP-Cy5.5, anti-CD69 PE y CD3-APC (o CD3-APC-Cy7), con anticuerpos monoclonales marcados durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de varios lavados, se utilizó una solución permeabilizante (Permeabilizing Solution 2, BD-Beckton Dickinson, San José, CA) y se realizó la tinción mediante anti-IFN-γ-FITC (isotiocianato de anti-IFN-γ-fluoresceína), que es un fluorocromo marcado con fluoresceína. Se utilizaron los controles de isotipo adecuados. Después, las células se lavaron y se resuspendieron en 200 mL de paraformaldehído al 1% en PBS. Esta mezcla se almacenó a 4°C y el análisis se realizó dentro de las dos a cuatro horas siguientes en un citómetro de flujo FACSCalibur utilizando el software Cell Quest (BD Biosciences Immunocytometry Systems) o utilizando el citómetro BDFACScanto II (BD) y analizado

utilizando los programas BD FACS Diva Software (BD Biosciences) e Infinicyt 1.4/1.7 (Cytognos). Primero, se acotó el analizador para los linfocitos mediante los detectores SSC-A (detector de dispersión lateral) y FSC-A (detector de dispersión frontal). A continuación, se analizó esta población de linfocitos por la expresión en su superficie de CD3 y CD8, o CD3 y CD4, en cada caso. La expresión de estos marcadores fue aún más restrictiva, ya que se acotó por la expresión del marcador de activación CD69 y la citoquina intracelular IFN- γ .

El número total de cada subpoblación de células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas para HCMV, se calculó mediante el producto del porcentaje correspondiente de células T específicas para HCMV que producen IFN- γ tras su estimulación (después de restar el ruido de fondo) y el número absoluto de células T CD4⁺ y CD8⁺, respectivamente. Se consideró positiva una respuesta detectable mayor del 0.1% (dos desviaciones estándar superior a la mediana de los individuos seronegativos para HCMV).

III.3. Manejo de la Infección Activa por HCMV

El episodio de infección activa se definió por un resultado positivo de antigenemia pp65 y/o PCR en tiempo real en muestras de plasma y la duración vino determinada por el intervalo que comprende desde la detección de la primera DNAemia hasta que desaparece.

Se consideró infección asintomática por HCMV cuando se confirmó por parte del laboratorio la replicación del HCMV mediante el ensayo de antigenemia pp65 o el ensayo de PCR, en ausencia de síntomas atribuibles.

La enfermedad por HCMV se definió como un síndrome viral o enfermedad de los órganos diana (Humar et al., 2006).

Cada centro estableció una estrategia de prevención del HCMV, en base a sus protocolos locales, por tanto, no hubo uniformidad en este sentido.

Se realizó la monitorización virológica al menos una vez por semana (dos, durante los episodios de infección activa por HCMV) mediante el ensayo de antigenemia pp65 (Diagnostics CMV pp65 Antigenemia Immunofluorescence assay, Chemicon International, Temecula, CA) y/o mediante un ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real en plasma (Abbott Real Time CMV, Abbott Molecular, Des Plaines, Illinois, USA; LightCycler CMV Quant Kit, Roche, Branchburg, New Jersey, USA), según el estudio que correspondiera, pero con resultados comparables (Clarí et al., 2013).

El manejo de la infección activa por HCMV se realizó de una manera diferente según el periodo y el centro en el que se reclutaron los pacientes, ya que los pacientes que acudieron al HCUV entre febrero de 2006 y abril de 2010, la vigilancia de la infección activa por HCMV se realizó tanto por el ensayo de antigenemia pp65 como por una PCR en tiempo real (CMV real-time PCR, Abbott Molecular, Des Plaines, Illinois, USA). Para estos pacientes, el inicio del tratamiento anticipado, ya fuera con Valganciclovir oral (900 mg/12h), con Ganciclovir intravenoso (i.v.) (5 mg/kg/12 h) o con Foscarnet i.v. (60 mg/kg/ 12h), se basó exclusivamente en el resultado del ensayo de antigenemia (>1 pp65 positivo / 200.000 leucocitos polimorfonucleares). La vigilancia virológica de los pacientes que recibieron un alo-TPH en el HCUV a partir de abril de 2010 se realizó exclusivamente por PCR en tiempo real con un nuevo kit que sustituyó al anterior (Abbott Real Time CMV, Abbott Molecular, Des Plaines, Illinois, USA) y el tratamiento anticipado se instauró a partir de 500 copias/mL en plasma. En

cambio, para los pacientes de otros centros, la vigilancia se realizó mediante PCR en tiempo real (LightCycler CMV Quant Kit, Roche, Branchburg, New Jersey, USA) y el inicio de la terapia antiviral lo marcó la detección de 150 o 500 copias/mL en plasma.

Para los pacientes sometidos a TOS, el tratamiento anticipado se instauró ante cualquier valor de antigenemia y/o cualquier carga de HCMV, independientemente del umbral establecido por cada centro. Se consideraron diferentes episodios cuando estaban separados por dos semanas y con al menos una muestra en medio con resultado negativo. Para este grupo de pacientes, la profilaxis antiviral fue definida como la administración de Ganciclovir o Valganciclovir dentro de las tres primeras semanas tras el trasplante, independientemente de su duración. Se asumió, que el resto de pacientes habían sido tratados con tratamiento anticipado, excepto que se informase de lo contrario.

El cese de la terapia antiviral vino marcado por dos resultados consecutivos negativos de la antigenemia pp65 y/o de la PCR en tiempo real, en muestras obtenidas con una semana de diferencia.

Los valores de DNAemia de CMV en plasma se normalizaron mediante un estándar de referencia aceptado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como patrón para amplificación de ácidos nucleicos (National Institute for Biological Standards and Control, Hertfortshire, UK). Las cargas de ADN de HCMV se expresan como UI/mL, por tanto, el factor de conversión, de copias/mL a UI/mL, para estos ensayos de PCR en tiempo real se realizó según se informó en un estudio anterior (Clarí et al., 2013).

Para el ensayo de antigenemia pp65 (AG), se obtuvo sangre en tubos con EDTA y se procesó dentro de las 2 horas siguientes a su recogida. Se procedió a la separación de los leucocitos polimorfonucleares (LPMNs) del

plasma mediante el método de sedimentación con dextrano. El AG se realizó por una técnica de inmunofluorescencia, según se había descrito en un estudio anterior (Solano et al., 2001). Los resultados se informaron como número de células pp65 positivas / 2×10^5 LPMNs.

III.4. Análisis de SNPs

En todos los casos la muestra utilizada fue sangre total o plasma, previamente criopreservadas a -70°C y se recuperaron para los análisis. Para el primer estudio, la muestra se recogió antes y después del trasplante. Por el contrario, para el resto de artículos la recogida de la muestra se realizó alrededor del día 30 después del trasplante, ya que está demostrado que el ADN libre de las células plasmáticas en el alo-TPH, una vez que los pacientes se han convertido a la quimera del donante, es predominantemente de origen hematopoyético (Lui et al., 2002). En el momento del análisis, todos los pacientes se habían convertido en quimera completa del donante.

La extracción del ADN de HCMV de las muestras se realizó utilizando el QIAamp DNA Mini Kit QIAcube (Qiagen, Valencia, CA) en la plataforma de extracción QIAcube (Qiagen) y concretamente para el último estudio se realizó utilizando el EZ1 Virus 2.0 Kit (Qiagen, Valencia, CA) en la plataforma de extracción BioRobot EZ1 (Qiagen, Valencia, CA).

La selección de los SNPs del estudio se realizó en base los resultados de trabajos anteriores que apuntaban a una asociación de estos SNPs, tanto con infección activa como con enfermedad por HCMV o ambas, en los receptores de TOS y alo-TPH (Bravo et al., 2014b; Brown et al., 2009; Carvalho et al., 2009; Kang et al., 2012; Kijpittayarit et al., 2007; Loeffler et al., 2006; Mezger et al., 2008).

El genotipado de los SNPs de IL-10 (rs1878672), CCR-5 (rs1800023), TLR-2 (rs5743708), TLR-9 (rs5743836), DC-SIGN (rs735240) y MCP-1 (rs13900) se realizó mediante una PCR alelo-específica en tiempo real en un Sistema de Software Applied Biosystems 7500 PCR en tiempo real, versión 2.0.6 (Applied Biosystems, Foster City, CA) y con cebadores consenso, como se explica en publicaciones anteriores (Bravo et al., 2014b; Loeffler et al., 2006; Mezger et al., 2008). El genotipado de los alelos de SNPs se realizó mediante un análisis estándar a punto final con la ayuda de un software comercial de genotipado (TaqMan® Genotyper Software 1.0 versión 1, Applied Biosystems) (Figura III.1). Con el fin de estimar la reproducibilidad global, se realizó el genotipado por duplicado para cada SNP, de 25 individuos escogidos al azar. La ratio de genotipado correcto (Call rate, en inglés) era del 100%, ya que la tasa de error por reacción fue del 0% (número de genotipos que difieren dividido por el número total de comparaciones realizadas).

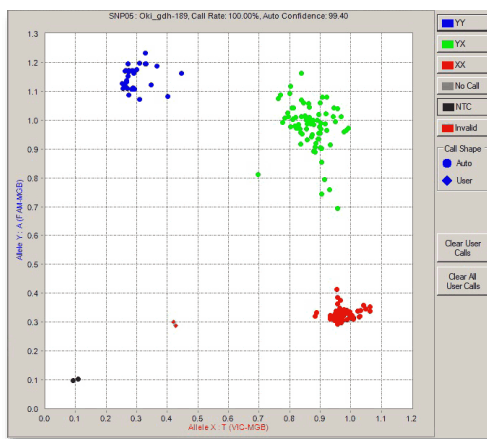


Figura III.1. Tipificación mediante PCR alelo-específica en el Sistema de Applied Biosystems.

Metodología de la Investigación

La genotipificación del SNP rs12979860 de la IL-28B se realizó mediante PCR (kit LightMix IL28B; TIB MOLBIOL, Berlín, Alemania), utilizando la plataforma LightCycler 2.0 siguiendo las recomendaciones del fabricante (Insert LightMix® Kit IL28B rs12979860; Cat.-No.40-0588-32). La técnica se basa en amplificar un fragmento largo de 139 pb con cebadores específicos y posteriormente analizar la curva de fusión generada, utilizando una sonda oligomérica simple, que es específica para el alelo C -3176. Los fragmentos resultantes de la PCR, son detectados por una SimpleProbe® en el canal 530. Los genotipos se identifican mediante la elaboración de una curva de fusión con puntos de fusión específicos (T_m). El alelo T presenta un T_m de aproximadamente, 51-53°C y el alelo C se muestra 8°C por encima de esta temperatura (Figura III.2).

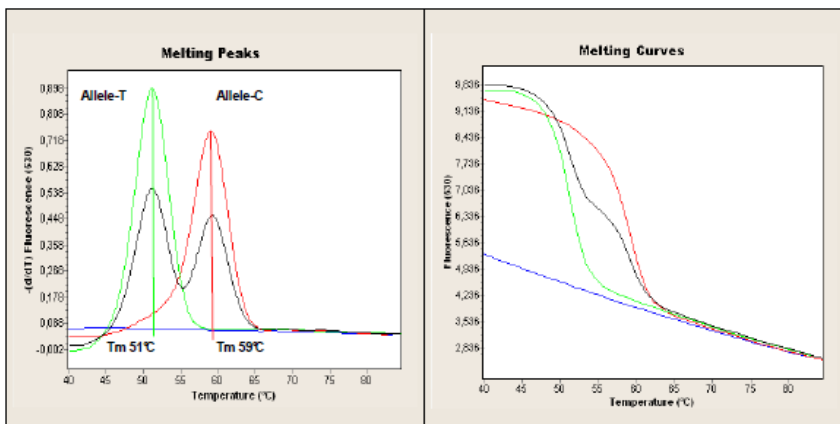


Figura III.2. Curvas de fusión de los diferentes genotipos en el sistema de detección de la IL-28B (Insert LightMix® Kit IL28B rs12979860).

III.5. Cuantificación de la IL-28B

Para la cuantificación de la IL-28B se utilizaron muestras de plasma, que estaban previamente congeladas a -80°C . Se demostró que el almacenamiento a largo plazo no tuvo efecto sobre los niveles de IL-28B, ya que las muestras se analizaron retrospectivamente.

Los niveles plasmáticos de IL-28B se determinaron mediante un kit de ELISA específico para la IL-28B humana (Human IL-28B, Shangai SunRed Biological Technology, Shanghai, China), según las instrucciones del fabricante.

La sensibilidad del ensayo es de 0.68 pg/mL y el intervalo lineal de cuantificación va de 0.8 a 2000 pg/mL . Los coeficientes de variación interensayo e intraensayo, según el fabricante y nuestros propios cálculos, fueron inferiores al 10%.

Para la determinación de la densidad óptica se utilizó un lector de placas de microtitulación a 150 nm .

Tanto el análisis como las calibraciones de las muestras se realizaron por duplicado y para el análisis de los datos fueron considerados los valores medios.

III.6. Análisis Estadístico

En todos los casos, el análisis estadístico de los datos se realizó con la ayuda del paquete estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, IBM. Inc., Chicago, Illinois) en versiones diferentes según el estudio. Los gráficos se han elaborado con el programa Prism versión 6.0 (GraphPad

Software Inc., La Jolla, California). En todos los casos se realizó un contraste bilateral y la significación estadística vino dada por una P inferior a 0.05.

El test Rho de Spearman se utilizó para investigar la correlación entre variables continuas.

Las medianas de las muestras independientes se compararon mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para muestras independientes, mientras que se aplicó la prueba de Chi-cuadrado (χ^2), o la prueba exacta de Fisher, según correspondiera, para comparar las frecuencias de las variables categóricas.

Para cada parámetro, se llevaron a cabo comparaciones por parejas entre los diferentes grupos de genotipos de SNPs, individualmente o en combinación.

La desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE, del inglés Hardy-Weinberg equilibrium) para cada SNP fue evaluado mediante el test χ^2 con un grado de libertad.

El desequilibrio de ligamiento por pares fue probado con la herramienta online SNP Annotation and Proxy Search (SNAP) (<http://www.broad.mit.edu/mpg/snap>), utilizando los datos de genotipo de la población europea (CEU) de los 1000 genomas del Proyecto Piloto 1.

En general, para el estudio de los SNPs, se propusieron tres modelos genéticos potenciales. En el modelo dominante, un alelo es suficiente para producir el efecto, en el modelo recesivo el efecto requiere los dos alelos y en el codominante, se supone un efecto aportado por cada alelo que coloca el genotipo heterocigótico a mitad de camino entre los dos genotipos homocigóticos.

En el tercer artículo se utilizaron múltiples modelos de regresión lineal por separado para la evaluación de los factores demográficos, clínicos e inmunológicos (alelos HLA) que influyen en el recuento absoluto de las células T específicas para HCMV.

El segundo artículo, conlleva un estudio estadístico más amplio. Los datos cuantitativos vendrán representados por la media \pm la desviación estándar (SD) o la mediana con rango intercuartílico (IQR) y las variables cualitativas se expresan como frecuencias absolutas y relativas.

La probabilidad de supervivencia se estimó mediante el método de Kaplan-Meier con la infección por HCMV como evento, y las diferencias entre los grupos se compararon mediante la prueba de Log-Rank.

Para evaluar la asociación entre los SNPs seleccionados y la infección por HCMV se utilizaron modelos de regresión multivariante de Cox y los resultados se expresaron en Hazard ratios (HR) o Cocientes de Riesgo (CR) con intervalos de confianza (IC) del 95%. Se realizó un análisis de haplotipos mediante la creación de una puntuación basada en los SNPs que ejercían un impacto independiente sobre los resultados (se añadió un punto para cada genotipo desfavorable portado por el paciente).

Se hizo una estratificación de los análisis en función de si la profilaxis antiviral se utilizó como estrategia preventiva del HCMV, así, los pacientes que no habían recibido ninguna intervención específica fueron analizados conjuntamente con los sí la habían recibido.

Se hizo un análisis de sensibilidad restringido a aquellos pacientes con una apropiada monitorización y control de la infección por HCMV, es decir, se habían tomado tres o más puntos de monitorización durante los 6 meses posteriores al trasplante.

Metodología de la Investigación

Aunque para todos los artículos las pruebas de significación fueron bilaterales y se consideró como significativo un valor de $P < 0.05$, para el segundo artículo se aplicó el método de corrección de Bonferroni (el valor α para cada combinación es igual al valor α fijado dividido por el número total de comparaciones) para evitar la posible inflación de los valores de P, debido a comparaciones múltiples.

IV. RESULTADOS

A continuación, se expondrán los resultados de los diferentes trabajos en función de los objetivos planteados en el estudio.

Artículo 1

En el primer artículo compendiado en esta tesis, se fijaron dos objetivos fundamentales.

- **Investigar la influencia de los SNPs en genes que codifican para CCR-5, MCP-1, IL-10, y TLR-9, en donante y receptor, en la tasa de incidencia de la infección por HCMV, en el entorno del alo-TPH.**

El primer objetivo del estudio fue investigar el efecto potencial de determinados SNPs en la tasa de incidencia de la infección por HCMV. La población de estudio estaba formada por 102 pacientes sometidos a alo-TPH. Un total de 73 (71.5%) pacientes desarrollaron DNAemia por HCMV dentro de los primeros 100 días después del trasplante (que era el periodo de estudio), con una mediana de 35 días (rango, 2-65).

Con respecto a las características clínicas y demográficas de los pacientes que formaban la cohorte, la aparición de infección activa por HCMV se asoció significativamente al desarrollo de EICH de grado II-IV ($P=0.02$). Del mismo modo, se observó una tendencia hacia una mayor incidencia de infección activa por HCMV en pacientes que se sometieron a un alo-TPH con donante no emparentado y con HLA diferente, aunque no se alcanzó significación estadística ($P=0.29$ y $P=0.36$, respectivamente). Por el contrario, no tuvo impacto significativo en la incidencia de la infección activa por HCMV ni la fuente de células madre (sangre periférica, médula ósea o sangre de cordón umbilical), ni el régimen de acondicionamiento utilizados.

Resultados

Los SNPs analizados estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg en el grupo de estudio, según lo determinado por una prueba de Chi-cuadrado utilizando un grado de libertad ($P=0.204$ para CCR-5; $P=0.457$ para MCP-1; $P=0.769$ para IL-10; $P=0.105$ para TLR-9).

No hubo asociación estadísticamente significativa entre la tasa de incidencia de infección activa por HCMV ni la necesidad de un tratamiento antiviral preventivo y los SNPs de los genes de CCR-5, MCP-1, IL-10, o TLR-9, en donantes y receptores (Tablas IV.1 y IV.2).

Tabla IV.1.

Efecto de los genotipos de SNPs del donante en la Tasa de Incidencia de Infección Activa por HCMV en pacientes sometidos a alo-TPH.

Gen	SNP	Infección Activa por HCMV		P-value ^d
		Si (n=73)	No (n=29)	
CCR-5	AA ^a	28 (38.4)	11 (37.9)	0.89
	AG	35 (47.9)	15 (51.7)	
	GG	10 (13.7)	3 (10.3)	
	AA / AG ^b	63 (86.3)	18 (62.1)	0.65
	GG	10 (13.7)	11 (37.9)	
	AG / GG ^c	45 (61.6)	15 (51.7)	0.97
	AA	28 (38.4)	25 (86.2)	
MCP-1	CC ^a	40 (54.8)	15 (51.7)	0.96
	CT	24 (32.9)	10 (34.5)	
	TT	9 (12.3)	4 (13.8)	
	TT / CT ^b	33 (45.2)	14 (48.3)	0.78
	CC	40 (54.8)	15 (51.7)	
	CC / CT ^c	64 (87.7)	25 (86.2)	0.84
	TT	9 (12.3)	4 (13.8)	
IL-10	AA ^a	14 (19.2)	5 (17.2)	0.76
	GA	37 (50.7)	17 (58.6)	
	GG	22 (30.1)	7 (24.1)	
	AA / GA ^b	51 (69.9)	22 (75.9)	0.55
	GG	22 (30.1)	7 (24.1)	
	GA / GG ^c	59 (80.8)	24 (82.8)	0.82
TLR-9	AA	14 (19.2)	5 (17.2)	0.87
	CC ^a	18 (24.7)	8 (27.6)	
	CT	37 (50.7)	13 (44.8)	
	TT	18 (24.7)	8 (27.6)	0.76
	CC / CT ^b	55 (75.3)	21 (72.4)	
	TT	18 (24.7)	8 (27.6)	0.76
	CT / TT ^c	55 (75.3)	21 (72.4)	
CC	18 (24.7)	8 (27.6)		

^aModelo Codominante

^bModelo Dominante

^cModelo Recesivo

^dChi-cuadrado; Contraste bilateral; P<0.05 valor considerado como significativo

Resultados

Tabla IV.2.

Efecto de los genotipos de SNPs del receptor en la Tasa de Incidencia de Infección Activa por HCMV en pacientes sometidos a alo-TPH.

Gen	SNP	Infección Activa por HCMV		P-value ^d
		Si (n=73)	No (n=29)	
CCR-5	AA ^a	23 (31.5)	7 (24.1)	0.74
	AG	40 (54.8)	17 (58.6)	
	GG	10 (13.7)	5 (17.2)	
	AA / AG ^b	63 (86.3)	24 (82.8)	0.65
	GG	10 (13.7)	5 (17.2)	
	AG / GG ^c	50 (68.5)	22 (75.9)	0.46
	AA	23 (31.5)	7 (24.1)	
MCP-1	CC ^a	36(49.3)	13 (44.8)	0.56
	CT	30 (41.1)	11 (37.9)	
	TT	7 (9.6)	5 (17.2)	
	TT / CT ^b	37 (50.7)	16 (55.2)	0.68
	CC	36 (49.3)	13 (44.8)	
	CC / CT ^c	66 (90.4)	24 (82.8)	0.28
	TT	7 (9.6)	5 (17.2)	
IL-10	AA ^a	15 (20.5)	3 (10.3)	0.44
	GA	31 (42.5)	15 (51.7)	
	GG	27 (37.0)	11 (37.9)	
	AA / GA ^b	46 (63.0)	18 (62.1)	0.93
	GG	27 (37.0)	11 (37.9)	
	GA / GG ^c	58 (79.5)	26 (89.7)	0.22
	AA	15 (20.5)	3 (10.3)	
TLR-9	CC ^a	26 (35.6)	14 (48.3)	0.48
	CT	33 (45.2)	10 (34.5)	
	TT	14 (19.2)	5 (17.2)	
	CC / CT ^b	59 (80.8)	24 (82.8)	0.82
	TT	14 (19.2)	5 (17.2)	
	CT / TT ^c	47 (64.4)	15 (51.7)	0.24
	CC	26 (35.6)	14 (48.3)	

^aModelo Codominante

^bModelo Dominante

^cModelo Recesivo

^dChi-cuadrado; Contraste bilateral; P<0.05 valor considerado como significativo

Del mismo modo, se vio que ninguno de los posibles haplotipos de SNPs se asociaba de manera significativa con la aparición de la DNAemia de HCMV.

De los 73 pacientes con infección activa por HCMV, 62 (84.9%) requirieron el tratamiento con agentes antivirales para los primeros episodios de infección activa por HCMV, 36 pacientes en base a los resultados de PCR en tiempo real y 26 pacientes en base a los resultados de antigenemia pp65. Los 11 (15.1%) pacientes restantes, resolvieron la infección de manera espontánea. El número de pacientes que recibieron terapia antiviral era comparable con independencia de los SNPs de donantes o receptores.

- **Investigar la influencia de los SNPs en genes que codifican para CCR-5, MCP-1, IL-10, y TLR-9, en donante y receptor, en la dinámica replicativa de la DNAemia por HCMV, en el entorno del alo-TPH.**

La segunda parte del estudio consistió en investigar la existencia de la relación entre los SNPs de donantes y receptores, y la duración de la DNAemia por HCMV. Por otro lado, también se investigó la relación entre estos SNPs y el pico máximo de carga del ADN de HCMV en plasma durante los episodios. Los resultados obtenidos nos informan que ambos parámetros fueron significativamente mayores en los pacientes que contenían el genotipo AA en el gen CCR-5 en el donante (no en el receptor) que sus homólogos AG y GG ($P=0.022$ y $P=0.045$, respectivamente) (Tablas IV.3 y IV.4). El modelo mendeliano codominante proporciona el mejor ajuste para estos datos. Es de destacar, que este efecto, no parecía estar relacionado con diferencias en los factores clínicos pre o post-trasplante entre los diferentes

Resultados

SNPs. Por el contrario, el grado de EICH II-IV se produjo de manera similar en los pacientes que contenían los genotipos AA, AG, y GG de SNP en el donante (P=0.592).

Tabla IV.3.

Duración de la DNAemia y el pico de HCMV en plasma en los primeros episodios de infección activa por HCMV de acuerdo a los genotipos de SNP del donante.

Gen	SNP	Duración (días)	P-value	Pico de carga de ADN de HCMV (copias/mL)	P-value			
CCR-5	AA ^a	46 (7-257)	0.022	1849 (77-917791)	0.062			
	AG	33 (7-217)		801 (28-23076)				
	GG	21 (4-36)		189 (20-4244)				
	AA / AG ^b	39 (7-257)	0.022	1230 (28-917791)		0.042		
	GG	21 (4-36)		189 (20-4244)				
	AG / GG ^c	30 (4-217)		737 (20-23076)			0.045	0.046
	AA	46 (7-257)		1849 (77-917791)				
MCP-1	CC ^a	36 (4-217)	0.18	805 (20-29792)	0.17			
	CT	42 (4-257)		2109 (28-917791)				
	TT	28 (7-63)		797 (77-4828)				
	TT / CT ^b	37 (7-257)	0.96	1473 (28-917791)		0.30		
	CC	36 (4-217)		805 (20-29792)				
	CC / CT ^c	38 (4-257)		1308 (20-917791)			0.09	0.28
	TT	28 (7-63)		797 (77-4828)				
IL-10	AA ^a	64 (7-257)	0.23	135 (28-917791)	0.33			
	GA	32.5 (4-217)		1296 (20-29792)				
	GG	42 (8-102)		1460 (29-15224)				
	AA / GA ^b	35 (4-257)	0.69	797 (20-917791)		0.46		
	GG	42 (8-102)		1460 (29-15224)				
	GA / GG ^c	35 (4-257)		1308 (20-29792)			0.15	0.14
AA	64 (7-257)	135 (28-917791)						
TLR-9	CC ^a	26 (8-90)	0.27	481 (80-17777)	0.67			
	CT	38 (4-257)		1219 (20-917791)				
	TT	39 (7-217)		1794 (29-29792)				
	CC / CT ^b	35 (4-257)	0.66	1149 (20-917791)		0.66		
	TT	39 (7-217)		1794 (29-29792)				
	CT / TT ^c	39 (4-217)		1447 (20-917791)			0.10	0.33
	CC	26 (8-90)		481 (80-17777)				

^aModelo Codominante

^bModelo Dominante^cModelo Recesivo^dChi-cuadrado; Contraste bilateral; P<0.05 valor considerado como significativo

Tabla IV.4.

Duración de la DNAemia y el pico de HCMV en plasma en los primeros episodios de infección activa por HCMV de acuerdo a los genotipos de SNP del receptor.

Gen	SNP	Duración (días)	P-value	Pico de carga de ADN de HCMV (copias/mL)	P-value
CCR-5	AA ^a	35 (7–257)	0.64	(58–917791)	0.77
	AG	37 (4–217)		(20–29792)	
	GG	30 (11–90)		(20–17777)	
	AA / AG ^b	37 (4–257)	0.47	(20–917791)	0.87
	GG	30 (11–90)		(20–17777)	
	AG / GG ^c	36 (4–217)	0.44	(20–29792)	0.47
MCP-1	AA	35 (7–257)		(58–917791)	
	CC ^a	36 (4–217)	0.19	(20–35432)	0.37
	CT	41 (4–257)		(20–917791)	
	TT	20 (7–39)		(77–4828)	
	TT / CT ^b	35 (4–257)	0.56	(20–917791)	0.20
	CC	36 (4–217)		(20–35432)	
IL-10	CC / CT ^c	37 (4–257)	0.08	(20–917791)	0.31
	TT	20 (7–39)		(77–4828)	
	AA ^a	31 (7–94)	0.86	(58–7352)	0.37
	GA	36 (4–217)		(20–29792)	
	GG	37 (4–257)		(20–917791)	
	AA / GA ^b	35 (4–217)	0.99	(20–29792)	0.76
TLR-9	GG	37 (4–257)		(20–917791)	
	GA / GG ^c	37 (4–257)	0.61	(20–97791)	0.26
	AA	31 (7–94)		(58–7352)	
	CC ^a	35 (4–124)	0.51	(20–17047)	0.88
	CT	30 (7–257)		(20–917791)	
	TT	40 (7–217)		(38–23076)	
TLR-9	CC / CT ^b	34 (4–257)	0.25	(20–917791)	0.95
	TT	40 (7–217)		(38–23076)	
	CT / TT ^c	36 (7–257)	0.62	(20–917791)	0.62
	CC	35 (4–124)		(20–17047)	

^aModelo Codominante

Resultados

^bModelo Dominante

^cModelo Recesivo

^dChi-cuadrado; Contraste bilateral; $P < 0.05$ valor considerado como significativo

Los SNPs en los genes de MCP-1, IL-10, y TLR-9 no tuvieron un impacto aparente sobre las dinámica replicativa de la infección activa por HCMV en esta cohorte. Cabe mencionar que no hubo diferencias entre los grupos comparativos en cuanto al método empleado para la detección de DNAemia en plasma, en la estrategia de terapia antiviral preventiva, el tratamiento antiviral utilizado, o el periodo de tiempo en el que se produjeron los episodios de infección activa por HCMV.

La baja incidencia de enfermedad orgánica por HCMV en la cohorte del estudio (<3%) impidió cualquier análisis estadístico significativo.

Artículo 2

- **Investigación del efecto individual y combinado de los SNPs en los genes CCR-5, MCP-1, IL-10, TLR-2, TLR-9, DC-SIGN e IL-28B sobre el riesgo de infección y enfermedad orgánica por HCMV en receptores de trasplante renal seropositivos para HCMV**

La cohorte de estudio estaba compuesta por 387 pacientes incluidos inicialmente en el estudio multicéntrico OPERA. Solo se pudo obtener muestra de sangre total de 315 (81.4%) para el análisis de genotipos. Cabe destacar, que no hubo diferencias en las características clínicas y demográficas

o el régimen inmunosupresor entre los que pacientes a los que se les realizó el análisis de SNPs y en aquellos en los que no se pudo obtener muestra.

Con respecto a la vigilancia virológica de HCMV, en 313 pacientes (99.4%) se pudo determinar al menos un punto de control en el periodo post-trasplante (mediana, 7 puntos por paciente), y 279 (87.6%) tuvieron 3 o más puntos de control durante los primeros 6 meses.

En cuanto a la estrategia de prevención del HCMV, 164 pacientes (52.1%) recibieron tratamiento anticipado, 146 (46.3%) recibieron profilaxis antiviral y 5 (1.6%) no recibieron ninguna intervención específica. De los 164 pacientes a los que se les administró el tratamiento anticipado, 34 (30.7%) recibieron terapia antiviral para infección asintomática por HCMV. La mediana del periodo de seguimiento fue de 364.8 días (Rango Intercuartílico, IQR=357-375) y, tan solo, 3 pacientes (1.0%) sufrieron la pérdida del injerto 275 días después del trasplante.

Referente al estudio de la incidencia de infección activa por HCMV en la cohorte de estudio, en 143 pacientes se detectó un total de 174 episodios de infección por HCMV distintos (con una incidencia acumulada del 44.4%). Se debe mencionar que la infección por HCMV fue más frecuente entre los pacientes que no recibieron profilaxis antiviral frente a los que si la recibieron (51.5% frente al 36.3%; $P=0.007$). De los 68 episodios de infección activa que se produjeron dentro del grupo de los pacientes que recibieron profilaxis, 7 de ellos (10.3%) fueron diagnosticados mientras el paciente todavía estaba con profilaxis antiviral, es decir, se produjo una infección de brecha.

La incidencia acumulada de enfermedad por HCMV fue baja (3.8%), ya que en 12 pacientes se diagnosticaron trece episodios de enfermedad por HCMV, con una mediana del intervalo entre el trasplante y el primer episodio

de 84.7 días (IQR=29.2-116.7). Debemos resaltar que ningún episodio se asoció directamente a la pérdida del injerto o la muerte del paciente.

- **Efecto de SNPs en la incidencia de la infección por HCMV**

La distribución de frecuencias observada para los genotipos no se desvió significativamente de los recuentos esperados de acuerdo al Equilibrio de Hardy-Weinberg para todos los SNPs, excepto para los genes que codifican para la IL-10, CCR-5 y TLR-2. No hubo desequilibrio de ligamiento para cualquier par de SNPs.

No se observaron diferencias significativas en el uso de anticuerpos policlonales que provocan la depleción de células T como terapia de inducción en los diferentes grupos de genotipos, o en el método utilizado para la evaluar la replicación de HCMV (antigenemia pp65 o PCR). Todos los valores de P fueron inferiores a 0.05.

En primer lugar, se realizó un análisis exploratorio en la cohorte general mediante la comparación de las diferentes combinaciones genotípicas para cada SNP con la incidencia acumulada a los 12 meses de la infección por HCMV. Se realizó un análisis por separado teniendo en cuenta exclusivamente a aquellos pacientes que no recibieron profilaxis antiviral, ya que la profilaxis mitiga la replicación del HCMV en tejidos y mucosas, y por tanto disminuye el riesgo de infección sistémica por HCMV. No hubo diferencias significativas en ninguno de los SNPs sometidos a análisis (después de la corrección de Bonferroni el valor de P se consideró significativo, $P < 0.003$) (Tablas IV.5 y IV.6).

Sin embargo, cuando se consideró la cohorte total (387 pacientes) para el análisis comparativo por parejas entre los diferentes grupos de genotipos para cada SNP nos ha permitido identificar una clara tendencia hacia una menor incidencia de la infección por HCMV en pacientes que portan los alelos A en los genotipos de SNPs de TLR-2 (rs5743708) (AA o AG; $P=0.031$) y los alelos T en los genotipos de los SNPs de la IL-28B (rs12979860) (CT o TT; $P=0.091$) en comparación con los que portan los alelos de genotipos homocigotos (GG y CC, respectivamente) (Tablas IV.5 y IV.6).

Cuando el análisis se restringió a los pacientes que no recibieron profilaxis antiviral, se observó una tendencia hacia menor incidencia de infección entre los portadores del alelo T del genotipo de SNP de TLR-9 (rs5743836) en homocigosis (TT; $P=0.038$), así como entre aquellos que albergan el alelo A del genotipo de SNP de DC-SIGN (rs735240) en homocigosis o heterocigosis (AA o AG; $P=0.076$) (Tablas IV.5 y IV.6).

Resultados

Tabla IV.5.

Incidencia Acumulada de Infección Activa por HCMV en función de los SNPs de los receptores de TOS renal.

Gen (SNP)	Genotipo	Incidencia Acumulada de infección por HCMV a los 12 meses								
		Cohorte global				No profilaxis antiviral				
		Sí (n = 140)	No (n = 175)	p-value	Sí (n = 87)	No (n = 82)	p-value			
IL10 (rs1878672)	CC	30 (21.4)	39 (22.3)	0.910	14 (16.1)	20 (24.4)	0.281			
	CG	61 (43.6)	72 (41.1)		37 (42.5)	36 (43.9)				
	GG	49 (35.0)	64 (36.6)		36 (41.4)	26 (31.7)				
CCR-5 (rs1800023)	AA	58 (41.4)	76 (43.4)	0.250	37 (42.5)	39 (47.6)	0.251			
	AG	54 (38.6)	76 (43.4)		31 (35.6)	33 (40.2)				
	GG	28 (20.0)	23 (13.1)		19 (21.8)	10 (12.2)				
TLR-2 (rs5743708)	AA	1 (0.7)	10 (5.7)	0.055	0 (0.0)	1 (1.2)	0.342			
	AG	1 (0.7)	1 (0.6)		0 (0.0)	1 (1.2)				
	GG	138 (98.6)	164 (93.7)		87 (100.0)	80 (97.6)				
TLR-9 (rs5743836)	CC	3 (2.1)	5 (2.9)	0.288	3 (3.4)	2 (2.4)	0.114			
	CT	42 (30.0)	39 (22.3)		30 (34.5)	17 (20.7)				
	TT	95 (67.9)	131 (74.9)		54 (62.1)	63 (76.8)				
DC-SIGN (rs735240)	AA	24 (17.1)	37 (21.1)	0.543	13 (14.9)	18 (22.0)	0.177			
	AG	60 (42.9)	77 (44.0)		36 (41.4)	39 (47.6)				
	GG	56 (40.0)	61 (34.9)		38 (43.7)	25 (30.5)				
MCP-1 (rs13900)	CC	83 (59.3)	97 (55.4)	0.250	52 (59.8)	48 (58.5)	0.663			
	CT	53 (37.9)	65 (37.1)		33 (37.9)	30 (36.6)				
	TT	4 (2.9)	13 (7.4)		2 (2.3)	4 (4.9)				
IL-28B (rs12979860)	CC	75 (53.6)	77 (44.0)	0.153	48 (55.2)	39 (47.6)	0.347			
	CT	59 (42.1)	84 (48.0)		35 (40.2)	35 (42.7)				
	TT	6 (4.3)	14 (8.0)		4 (4.6)	8 (9.8)				

Tabla IV.6. Incidencia Acumulada de Infección Activa por HCMV en función de los SNPs.

SNP	Genotipo	Incidencia Acumulada de infección por HCMV a los 12 meses								
		Cohorte global					No Profilaxis Antiviral			
		Si (n = 140)	No (n = 175)	P-value	Si (n=87)	No (n=82)	P-value			
TLR-2 (rs5743708)	AA	1 (50.0)	10 (90.9)	0.295	0 (0.0)	1 (50.0)	–			
	AG	1 (50.0)	1 (9.1)	0.014	0 (0.0)	1 (50.0)	0.482			
	AA	1 (0.7)	10 (5.7)		0 (0.0)	1 (1.2)				
	GG	138 (99.3)	164 (94.3)	0.706	87 (100.0)	80 (98.8)	0.482			
	AG	1 (0.7)	1 (0.6)		0 (0.0)	1 (1.2)				
	GG	138 (99.3)	164 (99.4)	0.031	87 (100.0)	80 (98.8)	0.234			
	AA/AG	2 (1.4)	11 (6.3)		0 (0.0)	2 (2.4)				
	GG	138 (98.6)	164 (93.7)	0.014	87 (100.0)	80 (97.6)	0.485			
	AG/GG	139 (99.3)	165 (94.3)		87 (100.0)	81 (98.8)				
TLR-9 (rs5743836)	AA	1 (0.7)	10 (5.7)	0.344	0 (0.0)	1 (1.2)	0.610			
	CC	3 (6.7)	5 (11.4)		3 (9.1)	2 (10.5)				
	CT	42 (93.3)	39 (88.6)	0.551	30 (90.9)	17 (89.5)	0.543			
	CC	3 (3.1)	5 (3.7)		3 (5.3)	2 (3.1)				
	TT	95 (96.9)	131 (96.3)	0.127	54 (94.7)	63 (96.9)	0.041			
	CT	42 (30.7)	39 (22.9)		30 (35.7)	17 (21.2)				
	TT	95 (69.3)	131 (77.1)	0.170	54 (64.3)	63 (78.8)	0.038			
	CC/CT	45 (32.1)	44 (25.1)		33 (37.9)	19 (23.2)				
	TT	95 (67.9)	131 (74.9)	0.689	54 (62.1)	63 (76.8)	0.528			
CT/TT	137 (97.9)	170 (97.1)	84 (96.6)		80 (97.6)					
DC-SIGN (rs735240)	CC	3 (2.1)	5 (2.9)	0.558	3 (3.4)	2 (2.4)	0.569			
	AA	24 (28.6)	37 (32.5)		13 (26.5)	18 (31.6)				
	AG	60 (71.4)	77 (67.5)	0.278	36 (73.5)	39 (68.4)	0.093			
	AA	24 (30.0)	37 (37.8)		13 (25.5)	18 (41.9)				
	GG	56 (70.0)	61 (62.2)	0.517	38 (74.5)	25 (58.1)	0.148			
	AG	60 (51.7)	77 (55.8)		36 (48.6)	39 (60.9)				
	GG	56 (48.3)	61 (44.2)	0.348	38 (51.4)	25 (39.1)	0.076			
	AA/AG	84 (60.0)	114 (65.1)		49 (56.3)	57 (69.5)				
	GG	56 (40.0)	61 (34.9)	0.372	38 (43.7)	25 (30.5)	0.239			
AG/GG	116 (82.9)	138 (78.9)	74 (85.1)		64 (78.0)					
IL-28B (rs12979860)	AA	24 (17.1)	37 (21.1)	0.163	13 (14.9)	18 (22.0)	0.519			
	CC	75 (56.0)	77 (47.8)		48 (57.8)	39 (52.7)				
	CT	59 (44.0)	84 (52.2)	0.103	35 (42.2)	35 (47.3)	0.156			
	CC	75 (92.6)	77 (84.6)		48 (92.3)	39 (83.0)				
	TT	6 (7.4)	14 (15.4)	0.355	4 (7.7)	8 (17.0)	0.285			
	CT	59 (90.8)	84 (85.7)		35 (89.7)	35 (81.4)				
	TT	6 (9.2)	14 (14.3)	0.179	4 (10.3)	8 (18.6)	0.192			
	CC/CT	134 (95.7)	161 (92.0)		83 (95.4)	74 (90.2)				
	TT	6 (4.3)	14 (8.0)	0.091	4 (4.6)	8 (9.8)	0.322			
CT/TT	65 (46.4)	98 (56.0)	39 (44.8)		43 (52.4)					
CC	75 (53.6)	77 (44.0)		48 (55.2)	39 (47.6)					

- Impacto de los SNPs seleccionados en la supervivencia libre de infección por HCMV

En cuanto al estudio de supervivencia libre de infección por HCMV para los diferentes grupos de genotipos de SNPs, se observó que los pacientes que portan el alelo A (en homocigosis o heterocigosis) del genotipo de SNP de TLR-2 (rs5743708) parecían menos susceptibles a la infección por HCMV que sus homólogos GG (tasa de supervivencia libre de infección por HCMV a los 12 meses: 85% frente al 53%; Test Log-Rank, $P=0.048$) (Figura IV.1.A). Por el contrario, los pacientes que portan el alelo menor T, en homocigosis o heterocigosis, del genotipo de SNP de la IL-28B (rs12979860) muestran una tendencia poco significativa en las tasas de supervivencia libres de infección por HCMV a los 12 meses (60% frente al 49%; Test Log-Rank, $P=0.072$) (Figura IV.1.B).

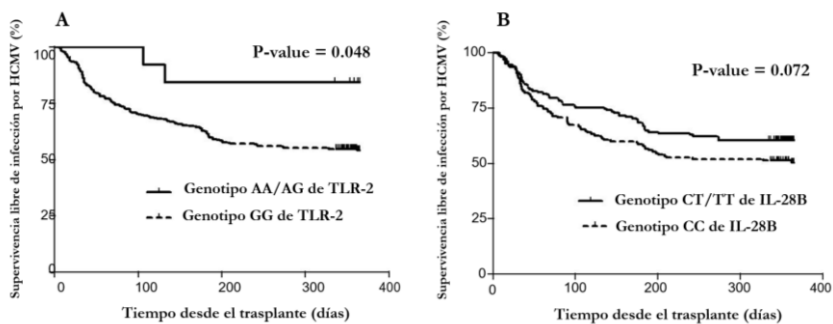


Figura IV.1. Curvas de Kaplan-Meier que representan la supervivencia libre de infección por HCMV para cada genotipo de SNP en TLR-2 (rs5743708; Figura IV.1.A) y la IL-28B (rs12979860; Figura IV.1.B) en la cohorte global.

En el análisis restringido a los pacientes que no recibieron profilaxis antiviral, si se realiza un análisis por subgrupos, se observa que las tasas de

supervivencia libres de infección por HCMV a los 12 meses fueron mayores en los pacientes portadores del genotipo TT de SNP de TLR-9 (rs5743836) (54% frente al 37%; Test Log-Rank, P=0.033) (Figura IV.2.A) y entre aquellos que albergaban el alelo A del genotipo de SNP de DC-SIGN (rs735240) (54% frente al 40%; Test Log-Rank, P=0.037) (Figura IV.2.B).

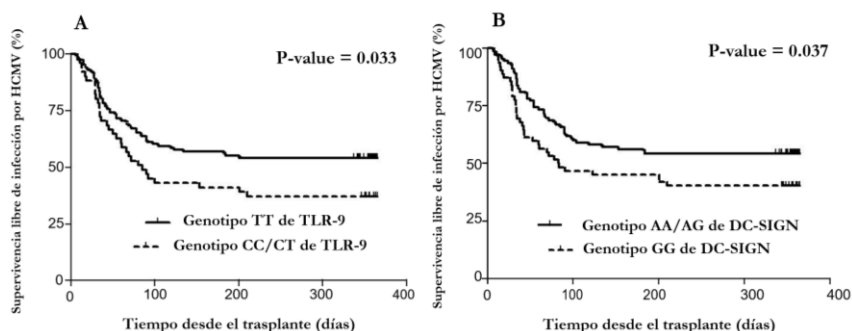


Figura IV.2. Curvas de Kaplan-Meier que representan la supervivencia libre de infección por HCMV para cada genotipo de SNP de TLR-9 (rs5743836; Figura IV.2.A) y DC-SIGN (rs735240; Figura IV.2.B).

- **Análisis multivariado de los factores de riesgo para la infección por HCMV**

Se evaluó el potencial impacto de los SNPs en cada uno de los genes seleccionados, por medio de diferentes modelos multivariados de regresión de Cox, ajustado por aquellas covariables que se consideraron relevantes en el análisis univariado (Tabla IV.7).

Tras ajustar por edad en donante y receptor, el estado serológico para HCMV en el donante, la recepción de profilaxis antiviral y la tasa de filtración glomerular estimada en el primer mes, el impacto del genotipo TT del SNP

Resultados

de TLR-9 (rs5743836) y para los genotipos que portan el alelo minoritario (CT/TT) del SNP de la IL-28B (rs12979860) fue escasamente significativo (aHR: 0.70; IC_{95%}: 0.49-1.02; P=0.061; y aHR: 0.73; IC_{95%}: 0.51-1.04; P=0.080, respectivamente). Es de destacar que, si se restringe el análisis a aquellos pacientes con 3 o más puntos de monitorización virológica para HCMV durante los primeros 6 meses, el efecto protector del alelo menor T del genotipo de SNP de la IL-28B alcanza significación estadística (aHR: 0.66; IC_{95%}: 0.46-0.96; P=0.029) (Tabla IV.8). Todas estas asociaciones se mantuvieron en el análisis de sensibilidad restringido a pacientes de etnia caucásica, ya que el bajo número de pacientes de otras etnias evita una mayor población de estratificación.

Tabla IV.7.

Diferentes modelos de regresión multivariada de Cox que evalúan el impacto de los SNPs seleccionados en la supervivencia libre de HCMV.

	Cohorte Global (n=315)			No profilaxis antiviral (n=169)		
	aHR ¹	IC _{95%}	p-value	aHR ²	IC _{95%}	p-value
Genotipo GG del SNP de TLR-2 (vs. AA/AG)	2.78	0.68-1.39	0.154	₋ ³	-	-
Genotipo TT del SNP de TLR-9 (vs. CC/CT)	0.70	0.49-1.02	0.061	0.61	0.38-0.96	0.035
Genotipo GG del SNP de DC-SIGN (vs. AA/AG)	1.29	0.90-1.86	0.158	1.86	1.18-2.94	0.008
Genotipos CT/TT del SNP de la IL-28B (vs. CC)	0.73	0.51-1.04	0.080	0.77	0.49-1.22	0.263

¹ Modelo ajustado por edad de donante y receptor, estado serológico para HCMV del donante, recepción de profilaxis antiviral y la funcionalidad del injerto (TFG) en el mes 1.

² Modelo ajustado por la edad del receptor, el estado serológico del donante para HCMV y la funcionalidad del injerto (TFG) en el mes 1.

³ No se puede estimar el HR porque todos los casos ocurrieron en los pacientes con el genotipo salvaje GG.

En una segunda serie de modelos de Cox limitados a pacientes que no recibieron profilaxis antiviral, tanto el genotipo TT del SNP de TLR-9 (rs5743836) como el genotipo GG del SNP de DC-SIGN (rs735240) mantenían su efecto independiente sobre los resultados (aHR: 0.61; IC_{95%}: 0.38-0.96; P=0.035 y aHR: 1.86; IC_{95%}: 1.18-2.94; P=0.008, respectivamente) (Tabla IV.7), es decir, los portadores del genotipo TT del SNP en TLR-9 tuvieron una menor incidencia de infección, mientras que el genotipo GG del SNP de DC-SIGN ejercía el efecto contrario. Estos resultados no se alteran significativamente en un análisis de sensibilidad restringido a pacientes con 3 o más puntos de control para la infección por HCMV en los primeros 6 meses después del trasplante.

Resultados

Tabla IV.8.

Diferentes modelos de regresión multivariada de Cox que evalúan el impacto de los SNPs seleccionados en la supervivencia libre de HCMV en los pacientes que tuvieron 3 o más puntos de monitorización virológica.

	Cohorte Global (n=315)			No profilaxis antiviral (n=169)		
	aHR ¹	IC _{95%}	p-value	aHR ²	IC _{95%}	p-value
Genotipo GG del SNP de TLR-2 (vs. AA/AG)	3.02	0.74-12.36	0.125	— ³	—	—
Genotipo TT del SNP de TLR-9 (vs. CC/CT)	0.71	0.48-1.04	0.079	0.65	0.40-1.04	0.072
Genotipo GG del SNP de DC-SIGN (vs. AA/AG)	1.26	0.87-1.84	0.222	1.87	1.17-2.94	0.005
Genotipos CT/TT del SNP de la IL-28B (vs. CC)	0.66	0.46-0.96	0.029	0.70	0.44-1.13	0.142

¹ Modelo ajustado por edad de donante y receptor, estado serológico para HCMV del donante, recepción de profilaxis antiviral y la funcionalidad del injerto (TFG) en el mes 1.

² Modelo ajustado por la edad del receptor, el estado serológico del donante para HCMV y la funcionalidad del injerto (TFG) en el mes 1.

³ No se puede estimar el HR porque todos los casos ocurrieron en los pacientes con el genotipo salvaje GG.

Posteriormente, se evaluó el efecto potencialmente combinado de los genotipos desfavorables de estos SNPs sobre el riesgo de la infección por HCMV. Se hizo una clasificación de los pacientes en 5 haplotipos en función del número de genotipos de SNPs desfavorables presentes, es decir, ningún genotipo desfavorable (3 pacientes; 1.0%), uno (74; 23.5%), dos (142; 45.1%), tres (82; 26.0%) y cuatro (14; 4.4%). Debido al bajo número de pacientes en los grupos extremos, la escala se diseñó en tres categorías (pacientes con 0-1, 2 o 3-4 genotipos desfavorables). Se observa una relación directa entre el

número de genotipos desfavorables y el riesgo de infección por HCMV, que permaneció significativa después de ajustar por otras variables clínicas para la presencia de 2 (aHR en la cohorte general: 2.29; IC_{95%}: 1.37-3.82; P=0.002) y 3-4 (aHR: 2.36; IC_{95%}: 1.38-4.03; P=0,002) genotipos desfavorables (Tabla IV.9).

Tabla IV.9.

Efecto combinado de los genotipos desfavorables de los SNPs en la supervivencia libre de infección.

Nº genotipos desfavorables ¹	Cohorte global (n=315)				No profilaxis antiviral (n=169)			
	n	aHR ²	IC _{95%}	p-value	n	aHR ³	IC _{95%}	p-value
0-1	77	1	-	-	39	1	-	-
2	142	2.29	1.37-3.82	0.002	69	2.37	1.17-4.77	0.016
3-4	96	2.36	1.38-4.03	0.002	61	2.87	1.42-5.79	0.003

¹Genotipos desfavorables incluidos: genotipo GG de TLR-2 (rs5743708), genotipos CC/CT de TLR-9 (rs8743836), genotipo GG de DC-SIGN (rs735240) y genotipo CC de IL-28B (rs12979860).

²Modelo ajustado por edad de donante y receptor, estado serológico para HCMV del donante, recepción de profilaxis antiviral y la funcionalidad del injerto (TFG) en el mes 1.

³Modelo ajustado por la edad del receptor, el estado serológico del donante para HCMV y la funcionalidad del injerto (TFG) en el mes 1.

Por último, se analizó el impacto de las combinaciones específicas de los genotipos de SNPs seleccionados. Los pacientes portadores de una combinación de genotipos favorables en los genes que codifican para IL-28B y TLR-9 tuvieron una menor incidencia de infección por HCMV, tanto en la cohorte global (aHR: 0.65; IC_{95%}: 0.45-0.95; P=0.027) como en el grupo que

Resultados

no recibió profilaxis antiviral (aHR: 0.60; IC_{95%}: 0.36-0.99; P=0.046) (Tabla IV.10).

Tabla IV.10.

Efecto combinado de SNPs seleccionados en los genes que codifican para TLR-9, DC-SIGN y la IL-28B en la supervivencia libre de infección por HCMV.

Combinación de Genotipos	Cohorte global (n=315)				No profilaxis (169)			
	n	aHR	IC _{95%}	P-value	n	aHR	IC _{95%}	P-value
Desfavorables en TLR-9 y DC-SIGN ¹	24	1.22	0.65-2.03	0.531	16	1.83	0.96-3.46	0.065
Desfavorables en IL-28B y DC-SIGN ²	52	1.25	0.79-1.96	0.328	33	1.37	0.81-2.30	0.243
Favorables en SNPs de IL-28B y TLR-9 ³	109	0.65	0.45-0.95	0.027	56	0.60	0.36-0.99	0.046

¹Genotipos CC/CT del SNP en TLR-9 (rs5743836) y genotipo GG del SNP en DC-SIGN (rs735240).

²Genotipo CC del SNP en IL-28B (rs12979860) y genotipo GG del SNP en DC-SIGN (rs735240).

³Genotipos CT/TT del SNP en la IL-28B (rs12979860) y genotipo TT del SNP en TLR-9 (rs5743836).

Artículo 3

- Comprobar si el efecto de ciertos alelos de los antígenos leucocitarios de clase I (HLA-I) en la reactividad pre-trasplante en el contexto del TOS, determinada por el ensayo QuantiFERON-CMV (QF-CMV), persiste al evaluarlo mediante Citometría de Flujo para tinción intracelular de citoquinas (ICS).

La población de estudio constaba de 43 pacientes seropositivos para HCMV que recibieron un trasplante renal. La media de edad de los pacientes fue de 60.6 años (rango, 46.4-74.8).

De los 43 pacientes, los alelos de clase I HLA-A1 y HLA-A2 estaban presentes en 10 (24.4%) y 17 (39.5%) pacientes, respectivamente.

Los resultados mostraron que la magnitud de la respuesta de las células T CD8⁺ específica para HCMV en los pacientes portadores de los alelos HLA-A1 y/o HLA-A2 era comparable a la observada en los pacientes con alelos HLA de clase I de otras especificidades (mediana, 6.59 células/ μ L frente a 4.20 células/ μ L; P=0.309).

Cabe destacar, que los 11 pacientes (25.6%) que portaban el alelo HLA-B44 se asociaron con respuestas más fuertes de las células T CD8⁺ específicas para HCMV que los pacientes que no los portaban (mediana 9.88 células/ μ L frente a 4.06 células/ μ L; P=0.016) (Figura IV.3). De hecho, era el único factor encontrado que pudiera ser asociado con la magnitud de tal respuesta en un modelo de regresión lineal (β =0.366; P=0.020).

Resultados

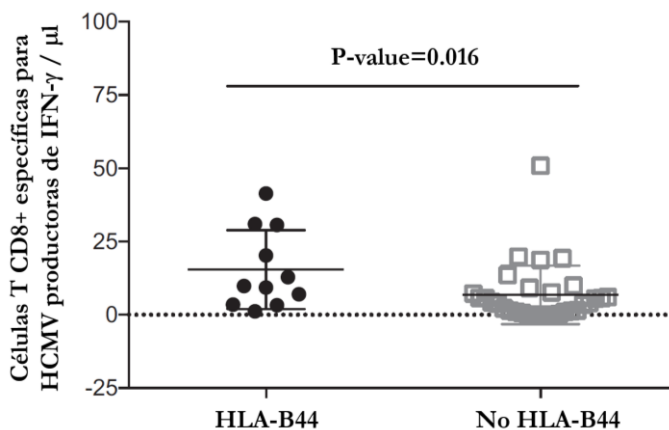


Figura IV.3. Recuento absoluto de las células T CD8⁺ específicas para HCMV productoras de IFN- γ de acuerdo con los alelos HLA-B44 o sin los alelos HLA-B44, en pacientes seropositivos para HCMV y candidatos a trasplante renal.

Por otro lado, no se vio correlación entre los recuentos de células T CD8⁺ específicas para HCMV y que los pacientes que recibieron el trasplante tuvieran edad avanzada (ρ de Spearman=-0.223; P=0.155).

Me gustaría enfatizar, que el estudio previo en el que se basa este artículo (Cantisán et al., 2015), utilizó una cohorte en la que se incluían pacientes que iban a recibir otros tipos de TOS como el de hígado y el de pulmón, a pesar de que se ha visto que los receptores de trasplante renal tienen mayor probabilidad de ser más reactivos a la prueba de QF-CMV que los restantes receptores de TOS.

Es importante destacar, que el recuento de células T CD4⁺ productoras de IFN- γ específicas para HCMV en pacientes que portan los alelos HLA-A1 y/o HLA-A2 fue significativamente mayor que el de los pacientes que presentaban otra especificidad de alelo HLA de clase I (mediana, 5.35 células/ μ L frente a 1.59 células/ μ L; P=0.010) (Figura IV.4).

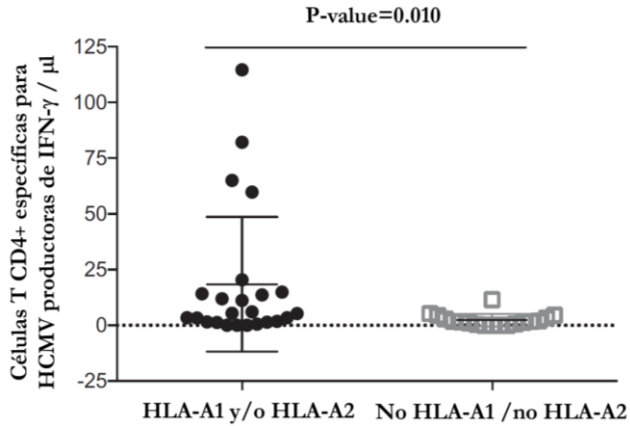


Figura IV.4. Recuento absoluto de las células T CD4⁺ específicas para HCMV productoras de IFN- γ de acuerdo con los alelos HLA-A1 y/o HLA-A2 y sin los alelos HLA-A1 y HLA-A2, en pacientes seropositivos para HCMV y candidatos a trasplante renal.

Por el contrario, la edad avanzada se correlacionó inversamente con el recuento de células T CD4⁺ productoras de IFN- γ específicas para HCMV en pacientes portadores de los alelos HLA-A1 y/o HLA-A2 (ρ de Spearman=-0.517; $P < 0.0001$). Mediante regresión lineal se confirmó una independencia en la asociación del recuento de células T CD4⁺ HCMV-específicas con la edad ($\beta = -0.331$; $P = 0.034$) y portar el alelo HLA-A1 y/o HLA-A2 ($\beta = 0.275$; $P = 0.068$).

Artículo 4

- Investigar si el SNP rs12979860 de la IL-28B tiene algún efecto sobre la reconstitución de la inmunidad innata y adaptativa específicas para HCMV, y la magnitud de la expansión de las células T CMV-específicas después del trasplante, provocada por la replicación del HCMV, en receptores de trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (alo-TPH).

Análisis de la respuesta inmunológica en los receptores de alo-TPH que no han tenido DNAemia antes del primer análisis inmunológico en relación con los genotipos de IL-28B del donante.

El primer lugar se investigó si el nivel de células T específicas para HCMV, en un periodo temprano después del trasplante, difería entre los grupos de genotipos del SNP rs12979860 de la IL-28B del donante.

La cohorte A estaba comprendida por 85 pacientes que no habían tenido DNAemia por HCMV antes del primer análisis inmunológico, alrededor del día +30. Debe mencionarse, que la incidencia de infección por HCMV en este grupo es inferior a la real, ya que se excluyeron los pacientes que tuvieron cargas positivas para HCMV previas al primer análisis inmunológico. El motivo de la exclusión fue que la replicación de HCMV provoca la expansión de las células T específicas para este virus, cuya magnitud puede diferir sustancialmente entre los receptores de alo-TPH. La distribución de genotipos de SNP de la IL-28B para este grupo fue: 36 CC, 39 CT y 10 TT.

No se observaron diferencias significativas en las características clínicas y demográficas de los pacientes entre los diferentes grupos de genotipos de IL-28B del donante.

En esta cohorte se observó una tendencia hacia una menor incidencia de DNAemia por HCMV en los pacientes que portaban el genotipo TT, 10% para TT frente al 26% para los pacientes que albergaban los genotipos CT y CC ($P=0.262$).

El recuento de células T CD8⁺ y CD4⁺ productoras de IFN- γ específicas para HCMV fue diferente, ya que para CD8⁺ estaba disponible para 85 pacientes y para CD4⁺, solo estuvo disponible para 42 (15 CC, 23 CT, 4 TT). Las respuestas detectables de las células T CD8⁺ productoras de IFN- γ específicas para HCMV fueron mayores en pacientes que portaban el genotipo TT (90%), que en sus homólogos CT y CC (77%), aunque no se alcanzó significación estadística ($P=0.525$). En cuanto a las células T CD4⁺ productoras de IFN- γ específicas para HCMV, se detectaron respuestas similares para todos los grupos de genotipos de la IL-28B, siendo 75% para el genotipo TT y 78% para los genotipos CT y CC ($P=0.634$). La mediana de los niveles periféricos de las células T CD4⁺ y CD8⁺ productoras de IFN- γ específicas para HCMV no eran significativamente diferentes entre los grupos comparativos (Figura IV.5.A y IV.5.B).

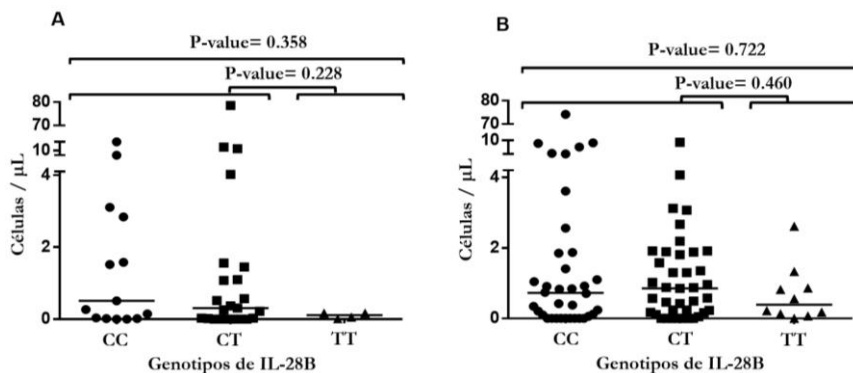


Figura IV.5. Medida de la respuesta de las células T CD4⁺ (Figura IV.5.A) y CD8⁺ (Figura IV.5.B) productoras de IFN- γ específica para HCMV en receptores de alo-TPH que no tuvieron DNAemia previa para HCMV (n=85) de acuerdo con el genotipo de SNP de la IL-28B (rs12979860) del donante. Se muestran los valores de P para las comparaciones estadísticas entre grupos (TT vs. CT vs. CC, caja superior, TT vs. CT más CC, caja inferior).

Niveles plasmáticos de la IL-28B de acuerdo con los genotipos de IL-28B del donante.

De los 85 pacientes que formaban parte de la cohorte A, solo de 50 pacientes se pudieron obtener al menos tres muestras de plasma antes del primer punto de vigilancia inmunológica, para la cuantificación de la IL-28B. La distribución de genotipos de IL-28B para estos pacientes fue 9 CC, 26 CT y 5 TT.

No existió una tendencia específica asociada con ningún genotipo de la IL-28B en particular. Tanto la mediana del nivel de IL-28B de todas las mediciones por paciente (mediana CC/CT: 23.7 pg/mL, rango: 0.0-321.1; mediana TT: 32.0 pg/mL, rango: 18.6-47.8, P=0.308) (figura IV.6.A) como el pico del nivel de IL-28B (mediana CC/CT: 35.8 pg/mL, rango: 0.0-999.2;

mediana TT: 43.0 pg/mL, rango: 22.2-60.4, $P=0.545$) (figura IV.6.B) en estos pacientes, fueron comparables entre los diferentes grupos de genotipos de la IL-28B.

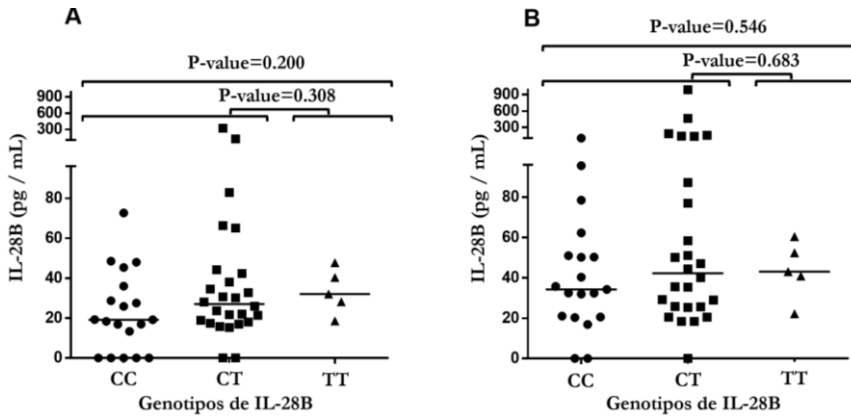


Figura IV.6. Representación de los valores de IL-28B, mediana (Figura IV.6.A) y pico (Figura IV.6.B), en receptores de alo-TPH, sin DNAemia previa por HCMV según el genotipo de SNP de la IL28B (rs12979860) del donante. Se muestran los valores de P para las comparaciones estadísticas entre grupos (TT vs. CT vs. CC, caja superior, TT vs. CT más CC, caja inferior).

Del mismo modo, no se obtuvo correlación entre el pico de los niveles de la IL-28B y la magnitud de las respuestas T CD8⁺ y CD4⁺ específicas para HCMV (LT CD8⁺: $\rho=0.013$, $P=0.929$; LT CD4⁺: $\rho=0.070$, $P=0.657$) (Figuras IV.7.A y IV.7.B, respectivamente).

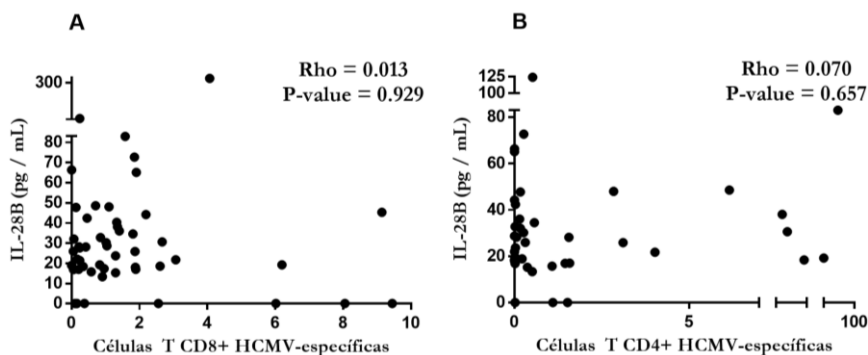


Figura IV.7. Correlación entre los niveles plasmáticos de la IL-28B y la respuesta de las células T CD8⁺ (Figura IV.7.A) y CD4⁺ (Figura VI.7.B) específicas para HCMV en receptores de alo-TPH sin DNAemia previa independientemente del genotipo de SNP de la IL-28B del donante.

Evaluación de la respuesta inmunológica específica para HCMV después del inicio de la DNAemia con respecto al genotipo de la IL-28B

Otro objetivo del estudio fue investigar si el genotipo del SNP rs12979860 de la IL-28B tuvo algún efecto sobre la magnitud de las respuestas T CD8⁺ y CD4⁺ productoras de IFN- γ específicas de HCMV activadas por la replicación.

La cohorte B estaba compuesta por 57 pacientes que habían tenido DNAemia en el punto de vigilancia inmunológica, de los cuales 25 portaban el genotipo CC, 23 el CT y 9 el TT. Entre los diferentes grupos de genotipos de la IL-28B no hubo diferencias significativas en cuanto a la edad, factores demográficos y clínicos conocidos pre y post-trasplante que modulan la susceptibilidad a la infección activa y la enfermedad orgánica por HCMV. Tampoco hubo diferencias en cuanto a la magnitud de la carga de ADN de

HCMV al inicio de la DNAemia ($P=0.966$) (Figura IV.8.A), que es importante, ya que se ha demostrado que el nivel de replicación de HCMV influye en el grado de expansión de las células T CD8⁺ productoras de IFN- γ específicas para HCMV (Guerrero et al, 2012; Hakki et al., 2003; Tormo et al., 2010; Tormo et al., 2011). Finalmente, no hubo diferencias significativas en cuanto al tiempo transcurrido entre el inicio de la DNAemia por HCMV y el momento en que se llevó a cabo la vigilancia inmunológica (mediana aproximada de 20 días en todos los grupos; $P=0.472$).

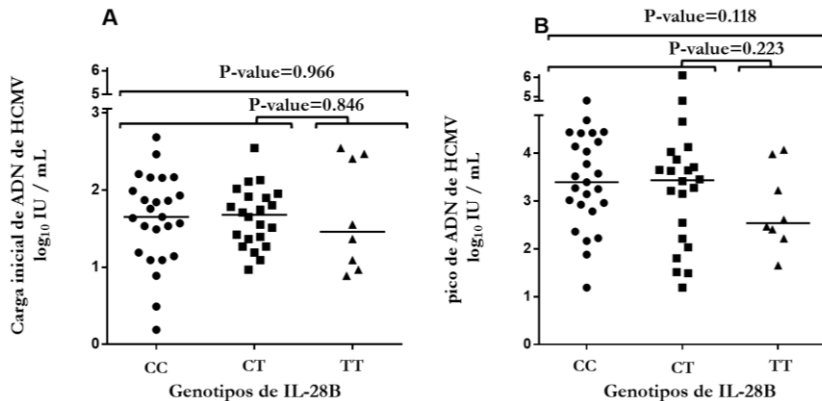


Figura IV.8. Características virológicas de la DNAemia por HCMV. En la Figura IV.8.A viene representada la carga inicial de ADN de HCMV y en la Figura IV.8.B se representa el pico de carga de ADN de HCMV, ambas desarrolladas durante los episodios de DNAemia por HCMV en los pacientes de la cohorte B. Se muestran los valores de P para las comparaciones estadísticas entre grupos (TT vs. CT vs. CC, caja superior, TT vs. CT más CC, caja inferior).

Los datos obtenidos indican que los pacientes que portan el genotipo TT de la IL-28B del donante tenían una respuesta de mayor magnitud de las células T CD8⁺ productoras de IFN- γ específicas para HCMV (mediana, 1.79

Resultados

células/ μL), que sus homólogos CT y CC (medianas, 0.45 y 0.19 células/ μL , respectivamente), aunque no alcanzó significación estadística ($P=0.156$) (Figura IV.9.A). Sin embargo, esta tendencia no se observó para las células T CD4^+ productoras de $\text{IFN-}\gamma$ específicas para HCMV (mediana-TT: 0.44 células/ μL ; mediana-CT: 0.0 células/ μL ; mediana CC: 0.17 células/ μL) (Figura IV.9.B). En relación con lo expuesto, se vio que el nivel del pico de ADN de HCMV en plasma durante los episodios de infección activa, fue sustancialmente menor en los pacientes que portaban el genotipo TT de la IL-28B que en sus homólogos CT y CC, aunque no se alcanzó significación estadística ($P=0.118$) (Figura IV.8.B). Como consecuencia, un menor número de pacientes del grupo TT recibieron terapia antiviral preventiva (33% en el grupo TT; 65.2% en el grupo CT; y 80% en el grupo CC; $P=0.05$).

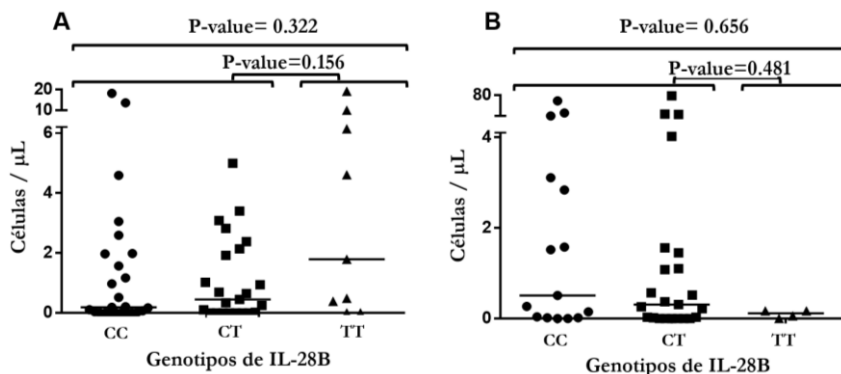


Figura IV.9. Células T específicas para HCMV, CD8^+ (Figura IV.9.A) y CD4^+ (Figura IV.9.B), después del inicio de la DNAemia por HCMV, de acuerdo al genotipo de SNP de la IL-28B del donante. Se muestran los valores de P para las comparaciones estadísticas entre grupos (TT vs. CT vs. CC, caja superior, TT vs. CT más CC, caja inferior).

Estudio de la relación entre los niveles plasmáticos de IL-28B y la respuesta de las células T específicas para HCMV en pacientes con DNAemia por HCMV.

De los 57 pacientes de la cohorte B, de tan solo 27 pacientes (12 CC, 13 CT, y 2 TT), estuvieron disponibles muestras de plasma obtenidas antes (una muestra por paciente) y durante (dos muestras por paciente) del episodio de infección activa por HCMV. Todas las muestras de plasma fueron extraídas antes de la medición de la respuesta inmunológica. Los recuentos de células T CD8⁺ y CD4⁺ productoras de IFN- γ específicas para HCMV estuvieron disponibles en 27 y 23 de estos pacientes, respectivamente. La medición se realizó una mediana de 21 días después de la detección de la DNAemia por HCMV.

El bajo número de pacientes del grupo TT de la IL-28B impidió cualquier análisis significativo a través de comparaciones directas de los niveles plasmáticos de la IL-28B entre los tres grupos. A pesar de esto, se investigó si había una correlación general, independientemente del genotipo de la IL-28B, entre los niveles plasmáticos de la IL-28B y el número de células T específicas para HCMV. En este sentido, se observó una correlación inversa significativa entre los niveles plasmáticos de la IL-28B medidos antes de la aparición de la DNAemia por HCMV y los niveles de células T CD8⁺ específicas para HCMV ($\rho=-0.471$; $P=0.013$) (no con las CD4⁺), medidos después del inicio de la DNAemia por HCMV (Figura IV.10). Del mismo modo, se infiere una tendencia a una correlación inversa significativa entre los niveles plasmáticos de la IL-28B medidos después de la detección de la DNAemia por HCMV y el número de células T CD8⁺ y CD4⁺ específicas para HCMV, aunque no se alcanzó significación estadística (CD8⁺: $\rho=-0.121$; $P=0.549$; y CD4⁺: $\rho=-0.543$; $P=0.266$) (Figura IV.11).

Resultados

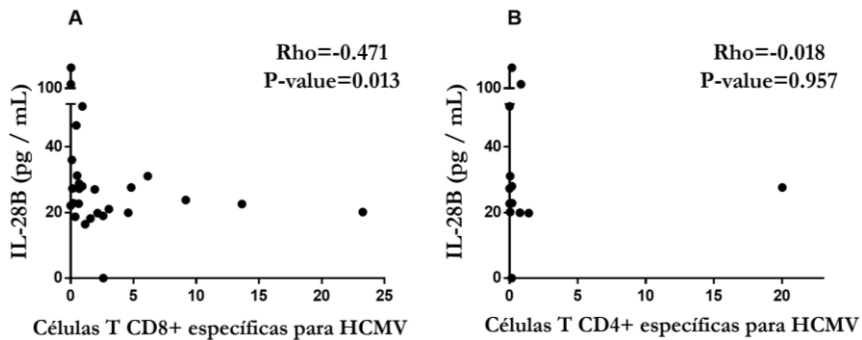


Figura IV.10. Correlación entre el pico de la respuesta T CD8⁺ (Figura IV.10.A) y CD4⁺ (Figura IV.10.B) específica para HCMV, medida después de la detección de la DNAemia, y los niveles plasmáticos de la IL-28B medidos antes de la aparición de DNAemia por HCMV.

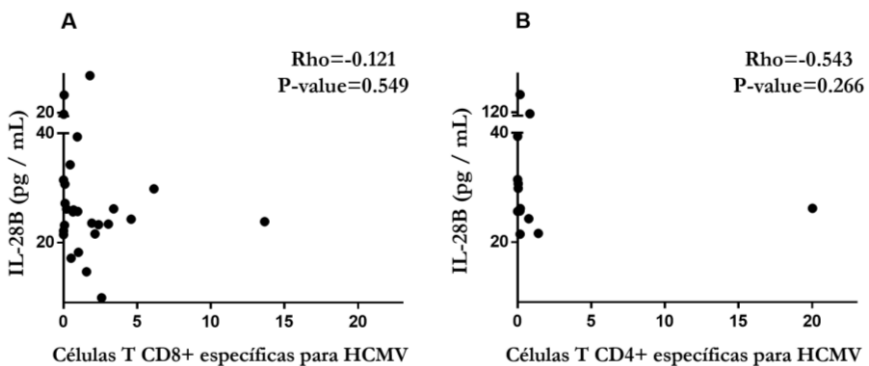


Figura IV.11. Correlación entre la mediana de la respuesta T CD8⁺ (Figura IV.11.A) y CD4⁺ (Figura IV.11.B) específica para HCMV y los valores plasmáticos de IL-28B durante el episodio de DNAemia por HCMV.

En resumen, los datos sugieren que el efecto protector atribuido al SNP rs12979860 de alelo menor T, podría estar mediado, al menos en parte, por la obtención de respuestas más robustas de las células T específicas para HCMV.

V. DISCUSIÓN CONJUNTA

Artículo 1

En el primer artículo el objetivo principal fue la evaluación del impacto de ciertos SNPs en los genes que codifican para determinadas citoquinas y receptores de citoquinas, como CCR-5, MCP-1, IL-10 y TLR-9 en la tasa de incidencia y las características de la infección activa por HCMV en una cohorte de receptores de trasplante alogénico de células madre que fueron atendidos en tres hospitales españoles.

La relación existente entre ciertos SNPs de los genes que codifican para CCR-5, MCP-1, IL-10 y TLR-9 en el donante y la posibilidad de cualquier reactivación de HCMV (MCP-1) o de la enfermedad orgánica por HCMV (MCP-1, CCR-5, IL-10 y TLR-9; $P=0.068$ para la última), ya había sido expuesta en estudios anteriores (Loeffler et al., 2006; Mezger et al., 2008). Estas asociaciones son consideradas biológicamente plausibles, puesto que estos genes están implicados en la evasión de los mecanismos inmunes provocados por la infección viral, por parte del HCMV.

El presente estudio se diferencia de los anteriores en dos aspectos principales. En primer lugar, se investigó el impacto potencial de los SNPs mencionados tanto en donantes como en receptores. El interés de evaluar el efecto del genotipo de SNP en el paciente se debe a varios hechos:

- (i) aunque CCR-5 se expresa predominantemente en células T, macrófagos y células dendríticas, que son de origen donante, las células del colon humano, que son diana natural del HCMV in vivo, también parecen expresar abundantemente este receptor en la superficie apical (Dwinell et al., 1999).

Discusión Conjunta

- (ii) El MCP-1 es producido por muchos tipos celulares, además de monocitos (de origen donante), incluyendo células endoteliales, epiteliales, músculo liso y fibroblastos, todas ellas infectadas productivamente in vitro por HCMV (Yoshimura & Leonard, 1991).
- (iii) La IL-10 es producida, además de por las células T CD4⁺, por células epiteliales bronquiales e intestinales de una manera constitutiva (Moore et al., 2001).
- (iv) El TLR-9 se expresa en una amplia gama de tipos celulares no inmunes (Lien & Ingalls, 2002).

En segundo lugar, en nuestro estudio, para la vigilancia de la infección activa por HCMV se utilizó una PCR en tiempo real altamente sensible, mientras que, en los pacientes de estudios anteriores, podrían haberse empleado métodos menos sensibles, tales como la técnica de antígenoemia pp65 o ensayos de PCR cualitativa o cuantitativa a punto final.

A pesar de las diferencias, los datos del presente estudio parecen apoyar las conclusiones de los anteriores (Loeffler et al., 2006; Mezger et al., 2008), en que los SNPs en los genes de CCR-5, IL-10 y TLR-9 del donante, no se asociaron significativamente con la tasa de incidencia de la infección activa por HCMV.

En cuanto a MCP-1, Loeffler y colaboradores (2006) encontraron una asociación estadísticamente significativa en relación a la incidencia de la infección activa por HCMV ($P=0.021$). La discrepancia con este estudio, puede deberse al menor número de pacientes incluidos en la serie actual, el uso de ensayos más sensibles para la detección de la infección activa por HCMV o por las diferencias en las características basales de los grupos de

pacientes, ya que en los estudios anteriormente citados seleccionaron las células CD34⁺.

Nuestro estudio, proporciona una serie de hallazgos novedosos que merecen ser mencionados:

- (i) Se proporcionan los datos en contra de la existencia de una asociación entre los genotipos de los SNPs de los receptores y la tasa de incidencia de infección activa por HCMV.
- (ii) No se vio relación entre los SNPs de donantes y receptores y la necesidad de tratamiento antiviral preventivo.
- (iii) Los pacientes que albergan el genotipo AA en CCR-5 en el donante, no en el receptor, mostraban episodios de infección activa por HCMV con un nivel más alto de replicación del HCMV. Esto viene dado por un pico de carga de ADN de HCMV en plasma, dentro de cada episodio, de mayor magnitud que los observados en sus homólogos AG y GG. Es de destacar que no hubo diferencias significativas entre los grupos comparativos en cuanto a características clínicas y demográficas, el método empleado de detección de ADN de HCMV en plasma, las estrategias de terapia antiviral preventiva, el antiviral utilizado para su tratamiento o el periodo de tiempo en que transcurrieron los episodios.

Los SNPs en los genes MCP-1, IL-10 y TLR-9, en donantes y receptores, no tuvieron impacto en la dinámica de la infección activa por HCMV en esta cohorte.

Se ha visto que los pacientes críticos no inmunodeprimidos portadores del genotipo AA del SNP en CCR-5 desarrollan episodios de infección activa

Discusión Conjunta

por HCMV, en la que el virus parece tener un alto nivel de replicación en tracto respiratorio inferior (Bravo et al., 2014a). Se sabe que CCR-5 media el reclutamiento, la activación y la diferenciación de los linfocitos CD4⁺ Th1 y células funcionales CD8⁺ (Alkhatib, 2009). Se ha visto cierta variabilidad frente a determinadas infecciones víricas en pacientes que portan la mutación homocigótica CCR5Δ32, ya que provoca una deficiencia de CCR-5 que protege frente al VIH (McDermott et al., 1998; Samson et al., 1996) y puede proporcionar protección contra la persistencia de VHB (Thio et al., 2007), pero parece aumentar la replicación del VHC en los individuos con infección crónica (Woitas et al., 2002). Del mismo modo, los pacientes sometidos a TPH que portan la delección CCR5Δ32 parecen mostrar una incidencia significativamente menor de reactivación del Virus Epstein Barr (VEB) poco después del trasplante, que los que albergan el genotipo salvaje (Bogunia-Kubik et al., 2007).

El SNP rs1800023 se encuentra en el exón 2 (-2086) del gen CCR-5, es decir, es un polimorfismo del promotor proximal del gen, sitio desde el que se originan la mayoría de transcripciones (McDermott et al., 1998). Por otro lado, se desconoce si este SNP afecta a la expresión funcional de CCR-5 en la superficie de las células inmunes o no inmunes, por tanto, solo se puede especular una explicación mecanicista a nuestros hallazgos. Sin embargo, la expresión subóptima de CCR-5 en los linfocitos T específicos de HCMV resulta en un deterioro del paso de estas células a los tejidos de la mucosa y del parénquima, facilitando de este modo la replicación local y su difusión en el compartimento sistémico, a pesar del tratamiento con agentes antivirales. Por otro lado, el aumento de la expresión de CCR-5 promueve respuestas inflamatorias locales. En este contexto, se observó una mayor posibilidad de desarrollar EICH agudo severo en los receptores de TPH que portaban el genotipo H1H1 del gen CCR-5 (que incluyen el genotipo AA para el SNP

rs1800023) (McDermott et al., 2010). A su vez, se sabe que la inflamación acciona la reactivación del HCMV y promueve la replicación del HCMV (Cook et al., 2006). En este contexto, una investigación del efecto de la delección del alelo CCR5 Δ 32 en las características de la infección activa por HCMV en este contexto clínico podría arrojar luz sobre esta cuestión.

Los datos presentados sugieren que los SNPs rs1800023 en el exón 2 del gen que codifica para el CCR-5 en el donante, pueden modular la dinámica de replicación la infección por HCMV en el marco del alo-TPH. No obstante, se requieren estudios con cohortes más grandes para probar la validez de dicha observación. Si estuviéramos en lo cierto, se podrían mejorar las estrategias actuales en la prevención de la morbilidad y mortalidad relacionada con el HCMV en pacientes con trasplante alogénico de células madre.

Artículo 2

El segundo objetivo principal de este trabajo fue investigar la posible asociación entre varios SNPs dentro de determinados genes implicados en diferentes vías inmunológicas activadoras y reguladoras y los 12 meses de incidencia acumulada de infección por HCMV, confirmada por métodos de laboratorio en una cohorte de receptores de trasplante de riñón seropositivos para HCMV. Fruto de los análisis realizados, se pueden extraer tres observaciones novedosas.

En primer lugar, se describe por primera vez una asociación entre el SNP situado dentro de la región promotora del gen de TLR-9 (rs5743836) (Carvalho et al., 2011) y la incidencia de la infección por HCMV en receptores de trasplante renal seropositivos para HCMV. En concordancia con nuestros

resultados, se ha visto que varios SNPs en la región codificante del gen que codifica para TLR-9 pueden modular el riesgo de la infección por HCMV en el contexto del TPH (Xiao et al., 2014). En nuestra cohorte, los pacientes que portan el alelo T en homocigosis, muestran tasas de supervivencia sin infección por HCMV sustancialmente más altas que sus homólogos CT y CC, alcanzando significación estadística en el grupo de pacientes que no recibieron profilaxis antiviral. Esto puede explicarse por el efecto mitigador de la profilaxis sobre la replicación de HCMV, que reduce drásticamente la posibilidad de detección de ADN de HCMV en sangre. Por otro lado, en modelos multivariantes de Cox, hubo una asociación independiente entre el genotipo TT de TLR-9 y un menor riesgo de infección por HCMV. Se propone una explicación mecanicista para este efecto biológico, aunque no es sencilla. TLR-9 activa el sistema inmune innato mediante el reconocimiento de motivos CpG no metilados en el ADN, que son relativamente frecuentes en los ADN virales (Kawai & Akira, 2010). TLR-9 se expresa principalmente en células del sistema inmune, tales como las células dendríticas, los linfocitos B, monocitos, neutrófilos y células NK. Las señales promovidas por TLR-9 tienen un papel crítico en la iniciación de la respuesta pro-inflamatoria y en la promoción de las respuestas inmunes de las células T funcionales CD4⁺ Th1 (Carvalho et al., 2011; Tabeta et al., 2004). El alelo C del polimorfismo rs5743836 de TLR-9 introduce un nuevo sitio de unión para el factor de transcripción, dependiente de la IL-6, en el promotor de TLR-9, por tanto, la señalización de TLR-9 es amplificada por un bucle de retroalimentación positiva a través de la IL-6 en los portadores del genotipo CT y CC (frente a TT), resultando en un aumento de la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Carvalho et al., 2011). Por tanto, aunque de una manera especulativa, parece razonable la posibilidad de que los pacientes que albergan el genotipo TT generen respuestas inflamatorias más débiles a través de la señalización de TLR-9, y podrían ser, a su vez, menos propensos a la

reactivación de la infección latente por HCMV, ya que es bien conocido el efecto pro-inflamatorio en el ambiente en la promoción de la reactivación del HCMV y en la perpetuación de la replicación en los tejidos y mucosas (Cook et al., 2006; Traub et al., 2012).

En segundo lugar, se observó que el alelo A del SNP de DC-SIGN (rs735240) parecía conferir protección frente a la infección por HCMV. Se observó una tendencia en la cohorte global, aunque este efecto fue más pronunciado en el grupo de pacientes que no habían recibido profilaxis antiviral, incluso después de ajustar por otras variables clínicas en el modelo multivariado. De manera similar, este efecto se había observado en el marco del TPH (Mezger et al., 2008). DC-SIGN muestra un papel crítico en el acoplamiento del HCMV en las células dendríticas derivadas de monocitos (MDDCs) (Halary et al., 2002), y la interacción del DC-SIGN con el HCMV permite totalmente la replicación del virus en las células dendríticas (Gringhuis et al., 2007). Anteriores estudios han mostrado que las personas sanas que portan el genotipo AA para el SNP rs735240 en DC-SIGN (y portan simultáneamente el genotipo CC para el SNP rs2287886 en DC-SIGN) tienen mayores niveles de expresión de DC-SIGN que los individuos que portan el genotipo GG-TT en los SNPs de DC-SIGN antes mencionados (Mezger et al., 2008), y la eficacia de la infección de las células dendríticas parece correlacionarse con el nivel de expresión de DC-SIGN (Haspot et al., 2012). Por tanto, el potencial efecto protector asociado con el alelo A en nuestra cohorte no se podría explicar por el aparente incremento de la eficiencia de la infección viral de las células dendríticas. Nuestros datos, sin embargo, podrían comprenderse mejor a la vista de una observación reciente que indica que los agentes patógenos que activan DC-SIGN en las células dendríticas humanas mediante la vía serina-treonina quinasa Raf-1, conducen a una eventual prolongación e incremento de la transcripción de la IL-10 para

Discusión Conjunta

aumentar la respuesta antiinflamatoria a citoquinas (Gringhuis et al., 2007). De ello se deduce que los individuos que portan el alelo A en homocigosis, son más propensos a generar respuestas antiinflamatorias derivadas de la interacción de ligandos microbianos con DC-SIGN.

En tercer lugar, se observó que los pacientes que portaban el alelo T del SNP rs12979860 de la IL-28B (3 kb “río arriba”), eran menos susceptibles a la infección por HCMV que sus homólogos CC. Este efecto, sin embargo, solo alcanzó significación estadística cuando el análisis se restringía a los pacientes que tuvieron un adecuado control de la infección por HCMV (3 o más puntos de monitorización de HCMV durante los primeros 6 meses después del trasplante). Este SNP no tuvo impacto significativo en el grupo de pacientes que no recibieron profilaxis antiviral, lo que pudo ser debido al escaso número de individuos que portaban el genotipo TT en este subgrupo. En un estudio previo, realizado en receptores de TPH, se apuntaba a una tendencia hacia una menor incidencia de infección activa por HCMV y una duración más corta de la DNAemia en los primeros episodios en la población donante que portaba el genotipo TT con respecto a la población donante que albergaba los genotipos CC o CT (Bravo et al., 2014b). El efecto protector aparente del genotipo TT del SNP de la IL-28B (rs12979860) en el contexto del TPH está en contraste con lo observado en los pacientes con infección crónica por el genotipo 1 del virus de la Hepatitis C y sometidos a terapia convencional con IFN- α -pegilado más Ribavirina. En este entorno clínico, los pacientes que portan el genotipo CC muestran consistentemente una mayor respuesta a la terapia o una probabilidad mayor de aclaramiento natural de la infección (Ge et al., 2009; Thomas et al., 2009). La razón de esta aparente discrepancia es actualmente desconocida. Sin embargo, se han publicado recientemente datos clínicos y biológicos, que apoyan en parte los resultados de nuestro estudio. Se vio que los receptores de TOS D⁺/R⁻ que portaban el

alelo C de los genotipos de SNPs de la IL-28B (rs8099917 o rs12979860) tenían mayor riesgo de replicación por HCMV tras el cese de la profilaxis antiviral (Egli et al., 2014). Estos autores, mediante una serie de estudios in vitro, observaron que los fibroblastos humanos que portan el alelo menor T en estado homocigótico (TT) del SNP rs12979860 de la IL-28B eran menos permisivos para la replicación del HCMV y mostraban una mayor expresión de IFN- α y de genes antivirales estimulados por IFN durante la infección (Egli et al., 2014). Se ha informado por otros autores que el polimorfismo funcional TT/-G (rs368234815) en la región CpG “río arriba” del gen de la IL-28B, influye en la susceptibilidad a la replicación del HCMV en receptores de TOS que no recibieron profilaxis antiviral (Manuel et al., 2015). Todos estos hallazgos, en conjunto, evidencian un efecto protector del alelo menor T en los genotipos de SNPs localizados en el promotor de la IL-28B, efecto probablemente mediado por un incremento en la expresión de interferones antivirales y/o por un cebado más fuerte de las células T específicas para HCMV debido a la disminución de la expansión de las células T reguladoras (Bravo et al., 2014b; Egli et al., 2012; Egli et al., 2014).

Se ha demostrado que el TLR-2 está involucrado en la activación del factor nuclear κ B y en la respuesta antiviral de las citoquinas, que se activan tras la interacción con las glucoproteínas gB y gH de HCMV (Boehme et al., 2006; Compton et al., 2003). Estudios recientes han mostrado que el genotipo AA, en homocigosis, del SNP Arg753Gln en TLR-2 (rs5743708) es un marcador de riesgo de enfermedad por HCMV después del trasplante hepático (Kang et al., 2012; Kijpittayarit et al., 2007). En nuestro estudio se observa el efecto inverso, ya que los receptores de trasplante renal que portan el genotipo salvaje GG parecen tener una mayor incidencia de la infección por HCMV que sus homólogos AA y AG. Esta asociación, sin embargo, no se mantuvo en los modelos multivariantes de Cox ajustados por otros factores

Discusión Conjunta

de riesgo conocidos para la infección por HCMV. Por tanto, nuestros datos sobre este SNP específico deben ser interpretados con precaución, sobre todo a la vista del bajo número de portadores del alelo A en homocigosis y la presencia de una desviación significativa del Equilibrio de Hardy-Weinberg (Trikalinos et al., 2006).

La lista de SNPs en genes implicados en la orquestación de la respuesta inmune innata y adaptativa provocada por el HCMV ha ido creciendo constantemente durante los últimos años (Brown et al., 2009; Cervera et al., 2009a,b; Egli et al., 2014; Hoffmann et al., 2008; Hoffmann et al., 2010; Kang et al., 2012; Kijpittayarit et al., 2007; Mitsani et al., 2011; de Rooij et al., 2011). Debido a que es muy poco probable que un único SNP pueda ser suficiente para determinar tal efecto, el reconocimiento de los haplotipos de genes relacionados con la inmunidad, definido como un conjunto de variantes genéticas que son heredadas juntas en desequilibrio de ligamiento, parece ser de relevancia fundamental para medir con precisión el riesgo sobre una base individual. En este sentido, están siendo desarrolladas nuevas técnicas para tal fin. En el presente documento, se llevó a cabo un modesto enfoque a este concepto: se investigó el efecto combinado de los genotipos desfavorables de los SNPs seleccionados sobre el riesgo de la infección por HCMV. Se observó una relación estadísticamente significativa entre el número de genotipos de SNP desfavorables realizados de un determinado paciente y el riesgo global de infección por HCMV. Esta asociación se mantuvo con significación estadística tras ajustar por factores de riesgo clínicos y demográficos. En este sentido, nuestra clasificación de riesgo puede ser útil para decidir, en la población de pacientes seropositivos para HCMV, si deben aplicarse la profilaxis con antivirales o el tratamiento preventivo en base al paciente.

Para concluir, a pesar de la necesidad de una mayor investigación y replicación del estudio en cohortes independientes, los hallazgos que aporta este estudio contribuyen al avance en el conocimiento actual de los mecanismos inmunológicos que modulan la susceptibilidad individual a la infección por HCMV en pacientes seropositivos para HCMV que reciben un trasplante renal, y finalmente, la implementación clínica de estrategias de prevención en esta población.

Artículo 3

El tercer artículo surge como respuesta al estudio realizado por Cantisán y colaboradores (2015), el cual, muestra una asociación sesgada entre la respuesta específica para HCMV y los genotipos HLA-A1 y HLA-A2. En nuestro estudio, esta asociación no se ha confirmado y podría haber tenido relación con el hecho de que el ensayo de QF-CMV detecta las células T CD8⁺ respondedoras frente a los epítomos NLVPMVATV en pp65 (HLA-A2) y VLEETSVML en IE-1 (HLA-A2), que se consideran inmunodominantes en Caucásicos. En este sentido, se requieren más estudios que evalúen la medición del IFN- γ producido por las células T CD8⁺ específicas para HCMV en paralelo por medio de QF-CMV y la técnica de citometría de flujo para tinción intracelular de citoquinas en cohortes que comprendan receptores de TOS homogéneas para resolver esta discrepancia.

El hallazgo de que el aumento de la edad esté ligado a una respuesta menor de las células T específicas para HCMV, está en consonancia con los estudios experimentales (Mattes et al., 2008) y con la experiencia clínica que muestra que la enfermedad por HCMV se diagnostica con frecuencia en pacientes de mayor edad que reciben trasplante renal (Fernández-Ruiz et al.,

Discusión Conjunta

2014b) y, además, sustenta el papel fundamental de las células T CD4⁺ en el mantenimiento a largo plazo de la inmunidad protectora de las células T (Fernández-Ruiz et al., 2014a).

La interpretación de la asociación encontrada entre los alelos HLA-I y la respuesta de las células T CD4⁺ específicas para HCMV no es sencilla. La hipótesis que se podría barajar sería el desequilibrio de ligamiento entre los alelos HLA-A1 y HLA-A2 con polimorfismos de un único nucleótido en los genes que codifican para HLA de clase II, promoviendo así un procesamiento y presentación de los antígenos más eficientes.

En conclusión, es bien sabido el papel de la inmunidad específica para HCMV pre-trasplante en pacientes que van a recibir un TOS y son seropositivos para HCMV. Por tanto, sería justificable la realización de más estudios que caracterizaran el papel del efecto de los alelos de los HLA de clase I y II sobre la magnitud de la respuesta de las células T específicas para HCMV.

Artículo 4

Son varios los estudios, incluido el segundo artículo de esta tesis, que muestran que ciertos SNPs localizados cerca o dentro del gen de la IL-28B pueden modular el riesgo de infección activa y la dinámica de replicación del HCMV en el entorno del trasplante (Bravo et al., 2014b; Egli et al., 2014; Manuel et al., 2015). En un estudio previo, se vio una tendencia hacia una menor incidencia en el desarrollo de episodios de infección activa por HCMV dentro de los primeros 100 días después del TPH en pacientes que portaban el genotipo TT del SNP rs12979860 de la IL-28B en comparación con sus

homólogos CT y CC (Bravo et al., 2014b). De igual manera, se informó que los pacientes que portaban el genotipo TT de la IL-28B tuvieron episodios de infección activa por HCMV significativamente menos duraderos que los que presentaban el alelo C en forma homocigótica o heterocigótica. Así, los datos apuntaban a un efecto protector del alelo T frente a la infección por HCMV. En este sentido, también se informó una disminución de la incidencia de la infección activa por HCMV en pacientes de alto riesgo sometidos a TOS, después de la suspensión de la profilaxis antiviral y en receptores de riñón seropositivos para HCMV manejados con estrategias de tratamiento anticipado y que portaban el genotipo TT de la IL-28B (Egli et al., 2014; Fernández-Ruiz et al., 2015). Del mismo modo, Manuel et al. (2015) mostraron que un polimorfismo funcional TT/-G (rs368234815) en la región CpG “río arriba” del gen de la IL-28B influye en la susceptibilidad a la replicación del HCMV en receptores TOS que no recibieron profilaxis antiviral. Por otro lado, se ha informado que la IL-28B afecta al cebado de la respuesta inmune adaptativa frente al HCMV (Egli et al., 2014). De acuerdo con esto, el IFN- λ recombinante promueve la expansión de las células T reguladoras Foxp3⁺ (Dolganiuc et al., 2012) in vitro, lo que podría ser perjudicial para el control de la replicación del HCMV (Egli et al., 2012).

En este contexto, el artículo 4 tuvo como objetivo determinar si el SNP rs12979860 de la IL-28B del donante, tuvo algún impacto en la magnitud de la respuesta de las células T específicas para HCMV en receptores de TPH.

En primer lugar, se investigó si este SNP ejercía alguna influencia sobre el nivel de las células T específicas para HCMV en un momento temprano después del TPH, alrededor del día +30. Para probar esta hipótesis, se seleccionó una cohorte de 85 pacientes que no había mostrado evidencia de DNAemia por HCMV antes de la monitorización inmunológica y se evaluó

Discusión Conjunta

la producción de pp65 e IE-1 a cargo de las células T CD8⁺ y CD4⁺ productoras de IFN- γ específicas para HCMV, ya que se ha demostrado que los niveles en sangre periférica de estas poblaciones de células T funcionales están estrechamente relacionados con la protección contra la viremia por HCMV (Solano et al., 2008; Tormo et al., 2011). En esta cohorte, se observó una tendencia hacia una menor incidencia de DNAemia por HCMV en pacientes que portaban el genotipo TT de la IL-28B. Curiosamente, los niveles de respuesta de las células T CD8⁺ IFN- γ específicas para HCMV, pero no los de las células T CD4⁺, se observaron con mayor frecuencia en los pacientes que portaban el genotipo TT, que en sus homólogos CT y CC. Es de destacar que, aunque se observaba esta tendencia, los niveles medios de los precursores de las células T CD8⁺ IFN- γ específicas para HCMV no eran significativamente diferentes entre los grupos comparativos. Merece especial atención, el hecho de que tanto la mediana como los niveles pico de la IL-28B medidos en plasma antes del primer análisis inmunológico, no difirieron significativamente entre los diferentes grupos de genotipos de la IL-28B.

El segundo objetivo del estudio fue determinar si la magnitud de la expansión de las células T específicas para HCMV desencadenadas por la replicación del virus, variaba en función del genotipo de SNP rs12979860 de la IL-28B. Para esclarecer este asunto, se seleccionó la cohorte B, que constaba de 57 pacientes que tuvieron un episodio de infección activa por HCMV antes de la monitorización inmunológica. En este grupo, el recuento de células T específicas para HCMV se realizó alrededor de 20 días después de la aparición de DNAemia por HCMV. Nuestros resultados indicaron que los pacientes que portaban el genotipo TT de la IL-28B parecían expandir las células T CD8⁺ IFN- γ específicas para HCMV a un nivel superior que sus homólogos CT y CC. Esto se observó, a pesar del hecho de que la magnitud de la carga de ADN de HCMV en el inicio de la DNAemia por HCMV fue

comparable entre los grupos. De acuerdo con estas observaciones, los niveles plasmáticos de ADN de HCMV durante los episodios de infección activa fueron marcadamente inferiores en los pacientes portadores del genotipo TT de la IL-28B que, en los otros grupos, y la terapia antiviral preventiva era menos probable que fuera prescrita a estos pacientes.

En los pacientes del grupo B, se encontró una correlación inversa significativa entre los niveles plasmáticos de la IL-28B medidos antes de la determinación de DNAemia por HCMV (y el tiempo de monitorización inmunológica) y el nivel de células T CD8⁺ específicas para HCMV.

Del mismo modo, se observó una tendencia hacia una correlación inversa entre los niveles plasmáticos medidos después de la detección de la DNAemia por HCMV y los niveles de células T CD8⁺ y CD4⁺ específicas para HCMV. Por el contrario, no se observó correlación entre los niveles de IL-28B y la respuesta de las células T específicas para HCMV en pacientes con viremia documentada. Estos datos sugieren, aunque sea de una manera especulativa, que el efecto perjudicial de la IL-28B en la activación y expansión de las células T CD8⁺ específicas para HCMV solamente puede ser evidente en el contexto de episodios de replicación de alto nivel de HCMV en el que el virus penetra en el compartimento sanguíneo.

En la actualidad, no existe una explicación mecanicista concluyente que represente el aparente efecto protector del alelo T del SNP (rs12979860) frente a la infección por HCMV en pacientes trasplantados. La hipótesis que se plantea aquí es la siguiente, los pacientes portadores del alelo T en homocigosis serían capaces de generar respuestas funcionales de las células T específicas de HCMV más fuertes frente a la replicación del virus que sus homólogos CT y CC, tal vez, a través de una activación más eficiente de las

Discusión Conjunta

células presentadoras de antígenos y un cebado de las células T, una expansión limitada de las células T_{reg} o ambas.

Las señales de la IL-28B se transmiten a través de un receptor heterodimérico que consiste en cadenas de IL28R1 e IL-10R β , induciendo así un estado antiviral, que puede superponerse parcialmente con el mediado con los IFNs tipo I, así como efectos inmunomoduladores (Kotenko et al., 2003; Sheppard et al., 2003). Para apoyar nuestra hipótesis, merece ser mencionado que el pretratamiento de fibroblastos CT con IL-28B condujo a un efecto inhibitorio dosis-dependiente sobre la expresión de ARNm de HCMV inducido por IFN- α_2 y en particular, un efecto supresor marcado sobre la expresión de genes estimulados por interferón (ISG, del inglés Interferon-Stimulated Genes). Por el contrario, los ISGs anti-inflamatorios (USP18 y SOCS1) se mantuvieron regulados al alza durante la infección por HCMV (Egli et al., 2014). Igualmente, el pre-tratamiento de fibroblastos con IL-28B bloqueó la fosforilación de STAT-2 inducida por IFN- α_2 (Egli et al., 2014). En este sentido, es bien sabido que la vía de señalización de JAK/STAT regula la expresión de una amplia gama de genes implicados en la activación de respuestas inmunes tras la interacción con interferones y citoquinas. Actualmente, estamos pensando en desarrollar algunos experimentos “in vitro”, que puedan apoyar nuestra hipótesis.

En resumen, los datos presentados en este documento sugieren que los receptores de alo-TPH que portan el genotipo TT del SNP rs12979860 de la IL-28B del donante, pueden expandir las células T funcionales específicas para HCMV en un grado mayor que en los pacientes que portan sus homólogos CT y CC, lo que puede dar lugar a un mejor control de la replicación temprana del HCMV después del trasplante.

Concluyendo, debido a las limitaciones que se exponen más adelante, se requieren más estudios que incluyan cohortes más grandes para validar nuestras observaciones.

En primer lugar, parece crucial demostrar que las observaciones anteriores, realizadas en los fibroblastos, pueden ser reproducidas en las células presentadoras de antígenos. En segundo lugar, la activación y expansión de las células T específicas para HCMV y la generación de las células T_{reg} después de la infección de las células mononucleares de sangre periférica con HCMV debe ser investigado en individuos que porten los genotipos TT, CT o CC del SNP rs12979860 de la IL-28B.

VI. LIMITACIONES METODOLÓGICAS

Artículo 1

El primer estudio, tiene dos limitaciones importantes.

La primera, es el número relativamente pequeño de pacientes incluidos en el estudio. Esta limitación, unida a la baja incidencia de enfermedad orgánica por HCMV, que fue inferior al 3%, impidió cualquier análisis estadístico significativo para la evaluación del impacto de ciertos SNPs en los genes que codifican para CCR-5, MCP-1, IL-10 y TLR-9.

En segundo lugar, al igual que en otros estudios de este tipo, no puede llegarse a la conclusión firme de que la asociación observada no es atribuible a variantes estrechamente vinculadas en otros genes.

Artículo 2

Este estudio presenta ciertas limitaciones que merecen ser comentadas.

En primer lugar, la incidencia acumulada a los 12 meses de enfermedad por HCMV, observada en un estudio clínico previo (3.6%) (Aguado et al., 2014), era demasiado baja como para poder evaluar el efecto de los SNPs en los genes analizados en este contexto clínico.

En segundo lugar, el tamaño muestral pudo no haber sido suficiente como para detectar asociaciones significativas en los genotipos con alelos menores en los genes analizados, como el alelo A en TLR-2 y el genotipo TT en IL-28B. Estas poblaciones estaban poco representadas en nuestra cohorte de pacientes y, por tanto, no se puede excluir un error de tipo 2 (error de tipo β o falso negativo). Esta limitación, muestra mayor evidencia cuando el

Limitaciones Metodológicas

análisis se restringe para tener en cuenta el impacto de la profilaxis antiviral. El escaso número de individuos portadores del genotipo TT del SNP rs12979860 de la IL-28B en el subgrupo de pacientes que recibió profilaxis antiviral impidió cualquier significación estadística, que sí se había alcanzado en el grupo global bien monitorizado.

En tercer lugar, la no homogeneidad tanto en las técnicas de detección de la infección por HCMV (antigenemia pp65 y diferentes ensayos de PCR en tiempo real), como en las estrategias de terapia preventiva entre los diferentes centros, puede alterar la interpretación de los datos.

Supone otra limitación importante, el hecho de que el análisis de genotipado se ha restringido a un único SNP en cada gen diana. Esto impidió el rendimiento de los análisis de haplotipo formal, que habían demostrado ser capaces de revelar variantes ocultas asociadas con un resultado clínico dado, o encontrar mutaciones en tándem que podrían haber sido perdidas de otra forma. Además, es posible que otras variantes dentro de estas regiones génicas puedan ser en realidad el motor impulsor para estas asociaciones observadas con la infección por HCMV.

Otra limitación importante, reside en el hecho de que todas las asociaciones se mantuvieron en un análisis de sensibilidad restringido a los pacientes de etnia caucásica, pero el bajo número de participantes de otros orígenes étnicos impide una mayor estratificación de la población.

Por último, las explicaciones mecanicistas que se han propuesto para las asociaciones observadas, deben ser consideradas hasta cierto punto como especulativas, ya que no se correlacionó ningún genotipo específico con marcadores de activación de las células dendríticas circulantes o las células T respondedoras específicas para HCMV.

Artículo 3

Las cohortes a comparar no eran homogéneas, ya que en el artículo de Cantisán y colaboradores (2015) la población de estudio estaba comprendida por pacientes sometidos a TOS de pulmón, hígado y riñón, y nuestro estudio, solo comprendía pacientes sometidos a TOS renal. Se ha visto un comportamiento inmune diferente en cuanto a los pacientes sometidos a trasplante renal, ya que el envejecimiento inmunológico en estos pacientes puede ser mayor que en el resto, debido a dos hechos fundamentales que suceden en estos pacientes, la diálisis y la uremia (Hauser et al., 2008), que afectan a la producción de citoquinas pro-inflamatorias.

Los hallazgos encontrados en cuanto a los linfocitos T CD4⁺ no se pudieron comparar con lo anterior, ya que la técnica QF-CMV solo evalúa la respuesta T mediada por los linfocitos T CD8⁺ productores de IFN- γ .

Por otro lado, no se han comparado los dos métodos en paralelo en la misma población de estudio, por lo que establecer, a priori, conclusiones sería muy aventurado.

Artículo 4

El presente estudio tiene varias limitaciones que merecen ser comentadas. En primer lugar, el número relativamente bajo de pacientes portadores del genotipo TT del SNP rs12979860 de la IL-28B del donante incluidos en el estudio, quebranta la robustez de los análisis estadísticos. De hecho, a través de estos análisis, se encuentran tendencias en lugar de asociaciones estadísticamente significativas. Es probable que, aunque solo sea

Limitaciones Metodológicas

de una manera especulativa, se pudieran haber obtenido datos más consistentes si se incluyeran más pacientes con el genotipo TT de la IL-28B. Desafortunadamente, dada la escasa presencia del genotipo TT entre la población caucásica, la inclusión de un número suficiente de pacientes TT estaba fuera de nuestro alcance. En este sentido, serían necesarios estudios multicéntricos y de potencia adecuada para probar nuestra hipótesis.

En segundo lugar, el uso de estrategias no uniformes entre centros en cuanto a la terapia antiviral preventiva, así como el uso de métodos de vigilancia virológica, presentando diferentes sensibilidades (antigenemia pp65 y métodos de PCR en tiempo real disponibles en el mercado con diferentes límites de detección y cuantificación), podrían haber influido en nuestras observaciones.

En tercer lugar, debido al carácter retrospectivo de nuestro estudio, no estuvieron disponibles un gran número de muestras para las mediciones inmunológicas.

En cuarto lugar, la falta de muestras de seguimiento hizo imposible determinar con precisión la cinética de la expansión de las células T específicas para HCMV después de la detección de la DNAemia por HCMV.

En quinto lugar, no se sabe si los niveles plasmáticos de la IL-28B se correlacionan con los de órganos y tejido. Del mismo modo, el efecto inmunomodulador de la IL-28B puede depender de la extensión de la expresión y distribución de los receptores de IFN- λ en los tejidos en lugar de en los niveles de IL-28B (Dolganiuc et al., 2012).

Por tanto, debido a las limitaciones expuestas con anterioridad, se requieren más estudios que incluyan cohortes más grandes para validar nuestras observaciones.

VII. CONCLUSIONES FINALES

Del trabajo realizado se pueden extraer las conclusiones que se enumeran a continuación.

- 1- Ninguno de los SNPs analizados en los genes MCP-1, IL-10 y TLR-9 del donante o del receptor modulan el riesgo de DNAemia por el CMV en el paciente que recibe un Alo-TPH.
- 2- Determinados SNPs en el gen CCR-5 modulan el nivel replicativo de HCVM durante la infección activa en el alo-TPH
- 3- Determinados SNPs en los genes que codifican para TLR-9, DC-SIGN y la IL-28B modulan el riesgo de infección activa por HCMV en pacientes receptores de trasplante renal seropositivos para el virus.
- 4- La investigación de los alelos HLA de clase I, HLA-A1 y/o HLA-2 permite estimar el riesgo de infección activa por el HCMV en pacientes sometidos a TOS renal, seropositivos para HCMV.
- 5- Los pacientes de edad avanzada que reciben un trasplante renal y son seropositivos para el HCMV desarrollan episodios replicativos por el HCMV de mayor magnitud que aquellos más jóvenes, en relación con su deficiente respuesta de células T CD4⁺ específicas funcionales.
- 6- Determinados polimorfismos en la proximidad del gen que codifica IL-28B podrían modular la dinámica de expansión de células T funcionales específicas frente al HCMV en respuesta a la replicación viral en pacientes que reciben un alo-TPH.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abate, D. A., Watanabe, S., & Mocarski, E. (2004). Major human cytomegalovirus structural protein pp65 (ppUL83) prevents interferon response factor 3 activation in the interferon response. *J Virol*, 78(20), 10995-11006. doi: 10.1128/JVI.78.20.10995-11006.2004.
- Aguado, J. M., Fernández-Ruiz, M., Arias, M., & Campistol, J. M. (2014). Impact of different prevention strategies on the risk of cytomegalovirus (CMV) infection and disease in seropositive kidney transplant (KT) recipients [abstract]. *Am J Transp*, 14, 765.
- Aguado, J. M., Navarro, D., San Juan, R., & Castón, J. J. (2012). Cytomegalovirus infection in solid organ transplantation. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 30 (Supl. 2), 57-62. doi: 10.1016/S0213-005X(12)70083-6.
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783-801. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.015.
- Alakulppi, N. S., Kyllönen, L. E., Salo, H. M. E., Partanen, J., Salmela, K. T., & Laine, J. T. (2006). The impact of donor cytokine gene polymorphisms on the incidence of cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transpl Immunol*, 16(3-4), 258-262. doi: 10.1016/j.trim.2006.09.007.

Bibliografía

- Alkhatib, G. (2009). The biology of CCR5 and CXCR4. *Curr Opin HIV AIDS*, 4(2), 96-103. doi: 10.1097/COH.0b013e328324bbec.
- Appelbaum, F. R. (2001). Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature*, 411(6835), 385-389. doi: 10.1038/35077251.
- Arav-Boger, R., Wojcik, G. L., Duggal, P., Ingersoll, R. G., Beaty, T., Pass, R. F., & Yolken, R. H. (2012). Polymorphisms in Toll-like receptor genes influence antibody responses to cytomegalovirus glycoprotein B vaccine. *BMC Res Notes*, 5, 140. doi: 10.1186/1756-0500-5-140.
- Atkinson, C., & Emery, V. C. (2011). Cytomegalovirus quantification: where to next in optimising patient management?. *J Clin Virol*, 51(4), 223-228. doi: 10.1016/j.jcv.2011.04.007.
- Awad, M. R., Webber, S., Boyle, G., Sturchioc, C., Ahmed, M., Martell, J., ... Zeevi, A. (2001). The effect of cytokine gene polymorphisms on pediatric heart allograft outcome. *J Heart Lung Transplant*, 20(6), 625-630.
- Beltran, P. M., & Cristea, I. M. (2014). The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: lessons from proteomics. *Expert Rev Proteomics*, 11(6), 697-711. doi: 10.1586/14789450.2014.971116.

- Bidwell, J., Keen, L., Gallagher, G., Kimberly, R., Huizinga, T., McDermott, ... D'Alfonso, S. (1999). Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes Immun*, 1(1), 3-19. doi: 10.1038/sj.gene.6363645.
- Binkowski, T. A., Marino, S. R., & Joachimiak, A. (2012). Predicting HLA class I non-permissive amino acid residues substitutions. *PLoS One*, 7(8), e41710. doi: 10.1371/journal.pone.0041710.
- Bochud, P. Y., Chien, J. W., Marr, K. A., Leisenring W. M., Upton, A., Janer, M., ... Boeckh, M. (2008). Toll-like receptor 4 polymorphisms and aspergillosis in stem-cell transplantation. *N Engl J Med*, 359(17), 1766-1777. doi: 10.1056/NEJMoa0802629.
- Bochud, P. Y., Hersberger, M., Taffe, P., Bochud, M., Stein, C. M., Rodrigues, S. D., ... Aderem, A. (2007). Polymorphisms in Toll-like receptor 9 influence the clinical course of HIV-1 infection. *AIDS*, 21(4), 441-446. doi: 10.1097/QAD.0b013e328012b8ac.
- Boeckh, M., & Geballe, A. P. (2011). Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *J Clin Invest*, 121(5), 1673-1680. doi: 10.1172/JCI45449.

Bibliografía

- Boeckh, M., & Ljungman, P. (2009). How we treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood*, 113(23), 5711-5719. doi: 10.1182/blood-2008-10-143560.
- Boeckh, M., Nichols, W. G., Papanicolaou, G., Rubin, R., Wingard, J. R., & Zaia, J. (2003). Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: Current status, known challenges, and future strategies. *Biol Blood Marrow Transplant*, 9(9), 543-558.
- Boehme, K.W., Guerrero, M., & Compton, T. (2006). Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. *J Immunol*, 177(10), 7094-7102.
- de Boer, M. G., Jolink, H., Halkes, C. J., van der Heiden, P. L., Kremer, D., Falkenburg, J. H., ... van Dissel, J. T. (2011). Influence of polymorphisms in innate immunity genes on susceptibility to invasive aspergillosis after stem cell transplantation. *PLoS One*, 6(4), e18403. doi: 10.1371/journal.pone.0018403.
- Bogunia-Kubik, K., Jaskula, E., & Lange, A. (2007). The presence of functional CCR5 and EBV, reactivation after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transpl*, 40(2), 145-150. doi: 10.1038/sj.bmt.1705703.

- Bravo, D., Clarí, M. A., Aguilar, G., Belda, J., Giménez, E., Carbonell, J. A., ... Navarro, D. (2014a). Looking for biological factors to predict the risk of active cytomegalovirus infection in non-immunosuppressed critically ill patients. *J Med Virol*, 86(5), 827-833. doi: 10.1002/jmv.23838.
- Bravo, D., Solano, C., Giménez, E., Remigia, M. J., Corrales, I., Amat, P., & Navarro, D. (2014b). 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*, 86(5), 838-844. doi: 10.1002/jmv.23865.
- Britt, W. J., & Boppana, S. (2004). Human Cytomegalovirus Virion Proteins. *Hum Immunol*, 65(5), 395-402. doi: 10.1016/j.humimm.2004.02.008.
- Brookes, A. J. (1999). The essence of SNPs. *Gene*, 234(2), 177-186.
- Brown, R. A., Gralewski, J. H., & Razonable, R. R. (2009). The R753Q polymorphism abrogates toll-like receptor 2 signaling in response to human cytomegalovirus. *Clin Infect Dis*, 49(9), e96-99. doi: 10.1086/644501.
- Browne, E. P., & Shenk, T. (2003). Human cytomegalovirus UL83-coded pp65 virion protein inhibits antiviral gene expression in infected cells.

Bibliografía

Proc Natl Acad Sci U.S.A., 100(20), 11439-11444. doi: 10.1073/pnas.1534570100.

Bunde, T., Kirchner, A., Hoffmeister, D. H., Hetzer, R., Cherepnev, G., Proesch, S., ... Kern, F. (2005). Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific CD8 T cells. *J Exp Med*, 201(7), 1031-1036.

Butcher, S. J., Aitken, J., Mitchell, J., Gowen, B., & Dargan, D. J. (1998). Structure of the Human Cytomegalovirus B Capsid by Electron Cryomicroscopy and Image Reconstruction. *J Struct Biol*, 124(1), 70-76. doi: 10.1006/jsbi.1998.4055.

Cantisán, S., Rodelo-Haad, C., Páez-Vega, A., Nieto, A., Vaquero, J. M., Poyato, A., ... Torre-Cisneros, J. (2015). Factors related to the development of CMV-specific CD8⁺ T cell response in CMV-seropositive solid organ transplant candidates. *Am J Transplant*, 15(3), 715-722. doi: 10.1111/ajt.13012.

Carvalho, A., Cunha, C., Carotti, A., Aloisi, T., Guarrera, O., Di Ianni, M., ... Romani, L. (2009). Polymorphisms in Toll-like receptor genes and susceptibility to infections in allogeneic stem cell transplantation. *Exp Hematol*, 37(9), 1022-1029. doi: 10.1016/j.exphem.2009.06.004.

- Carvalho, A., Osorio, N. S., Saraiva, M., Cunha, C., Almeida, A. J., Teixeira-Coelho, M., ... Rodrigues, F. (2011). The C allele of rs5743836 polymorphism in the human TLR9 promoter links IL-6 and TLR9 up-regulation and confers increased B-cell proliferation. *PLoS One* 2011; 6(11), e28256. doi: 10.1371/journal.pone.0028256.
- Cervera, C., Balderramo, D., Suárez, B., Prieto, J., Fuster, F., Linares, L., ... Navasa, M. (2009a). Donor mannose-binding lectin gene polymorphisms influence the outcome of liver transplantation. *Liver Transpl*, 15(10), 1217-1224. doi: 10.1002/lt.21834.
- Cervera, C., Lozano, F., Linares, L., Antón, A., Balderramo, D., Suárez, B., ... Moreno, A. (2009b). Influence of mannose-binding lectin gene polymorphisms on the invasiveness of cytomegalovirus disease after solid organ transplantation. *Transplant Proc*, 41(6), 2259-2261. doi: 10.1016/j.transproceed.2009.06.056.
- Cervera, C., Lozano, F., Saval, N., Gimferrer, I., Ibáñez, A., Suárez, B., ... Moreno, A. (2007). The influence of innate immunity gene receptors polymorphisms in renal transplant infections. *Transplantation*, 83(11), 1493-1500. doi: 10.1097/01.tp.0000264999.71318.2b.
- Ciáurriz, M., Zabalza, A., Beloki, L., Mansilla, C., Pérez-Valderrama, E., Lachén, M., ... Ramírez, N. (2015). The immune response to

Bibliografía

cytomegalovirus in allogenic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Cell Mol Life Sci*, 72(21), 4049-4062. doi: 10.1007/s00018-015-1986-z.

Clarí, M. A., Bravo, D., Costa, E., Muñoz-Cobo, B., Solano, C., Remigia, M. J., ... Navarro D. (2013). Comparison of the new Abbott Real Time CMV assay and the Abbott CMV PCR Kit for the quantitation of plasma cytomegalovirus DNAemia. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 75(2), 207-209. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.10.010.

Compton, T., Kurt-Jones, E. A., Boehme, K. W., Belko, J., Latz, E., Golenbock, D. T., & Finberg, R. W. (2003). Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J Virol*, 77(8), 4588-4596.

Conti, P., Kempuraj, D., Kandere, K., Gioacchino, M. D., Barbacane, R. C., Castellani, M. L., ... Theoharides, T. C. (2003). IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always. *Immunol Lett*, 86(2), 123-129.

Cook, C. H., Trgovcich, J., Zimmerman, P. D., Zhang, Y., & Sedmak, D. D. (2006). Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor alpha, or interleukin-1beta triggers reactivation of latent cytomegalovirus in

immunocompetent mice. *J Virol*, 80(18), 9151-9158. doi: 10.1128/JVI.00216-06.

Cristea, I. M., Moorman, N. J., Terhune, S. S., Cuevas, C. D., O'Keefe, E. S., Rout, M. P., ... Shenk, T. (2010). Human cytomegalovirus pUL83 stimulates activity of the viral immediate- early promoter through its interaction with the cellular IFI16 protein. *J Virol*, 84(15), 7803-7814. doi: 10.1128/JVI.00139-10.

Crough, T., & Khanna, R. (2009). Immunobiology of Human Cytomegalovirus: from Bench to Bedside. *Clin Microbiol Rev*, 22(1), 76-97. doi: 10.1128/CMR.00034-08.

Davison, A. J. (2010). Herpesvirus systematics. *Vet Microbiol*, 143(1), 52-69. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.02.014.

Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S., & Sawaya, B. E. (2009). Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J Interferon Cytokine Res*, 29(6), 313-326. doi: 10.1089/jir.2008.0027.

Dolganiuc, A., Kodys, K., Marshall, C., Saha, B., Zhang, S., Bala, S., & Szabo, G. (2012). Type III interferons, IL-28 and IL-29, are increased in chronic HCV infection and induce myeloid dendritic cell-mediated

Bibliografía

- FoxP3⁺ regulatory T cells. *PLoS One*. 7(10), e44915. doi: 10.1371/journal.pone.0044915.
- Dwinell, M. B., Eckmann, L., Leopard, J. D., Varki, N. M., & Kagnoff, M.F. (1999). Chemokine receptor expression by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, 117(2), 359-367.
- Egli, A., Levin, A., Santer, D. M., Joyce, M., O'Shea, D., Thomas, B. S., ... Humar, A. (2014). Immunomodulatory Function of Interleukin 28B During Primary Infection With Cytomegalovirus. *J Infect Dis*, 210(5), 717-727. doi: 10.1093/infdis/jiu144.
- Egli, A., Silva, M. Jr., O'Shea, D., Wilson, L. E., Baluch, A., Lisboa, L. F., ... Humar, A. (2012). An analysis of regulatory T-cell and Th-17 cell dynamics during cytomegalovirus replication in solid organ transplant recipients. *PLoS One*, 7(11), e43937. doi: 10.1371/journal.pone.0043937.
- Fernández-Ruiz, M., Corrales, I., Arias, M., Campistol, J. M., Giménez, E., Crespo, J., ... Navarro, D. (2015). Association between individual and combined SNPs in genes related to innate immunity and incidence of CMV infection in seropositive kidney transplant recipients. *Am J Transplant*, 15(5), 1323-1335. doi: 10.1111/ajt.13107.

- Fernández-Ruiz, M., Kumar, D., & Humar, A. (2014a). Clinical immune-monitoring strategies for predicting infection risk in solid organ transplantation. *Clin Trans Immunol*, 3(2), e12. doi: 10.1038/cti.2014.3.
- Fernández-Ruiz, M., López-Medrano, F., Allende, L. M., Andrés, A., García-Reyne, A., Lumbreras, C., ... Aguado, J. M. (2014b). Kinetics of peripheral blood lymphocyte subpopulations predicts the occurrence of opportunistic infection after kidney transplantation. *Transpl Int*, 27(7), 674-685. doi: 10.1111/tri.12321.
- Freeman, R. B. (2009). The 'indirect' effects of cytomegalovirus infection. *Am J Transplant*, 9(11), 2453-2458. doi: 10.1111/j.1600-6143.2009.02824.x.
- Freeman, R. B. Jr., Tran, C. L., Mattoli, J., Patel, K., Supran, S., Basile, F. G., ... Aihara, R. (1999). Tumor necrosis factor genetic polymorphisms correlate with infections after liver transplantation. NEMC TNF Study Group. New England Medical Center Tumor Necrosis Factor. *Transplantation*, 67(7), 1005-1010.
- Gandhi, M. K., & Khanna, R. (2004). Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *Lancet Infect Dis*, 4(12), 725-738. doi: 10.1016/S1473-3099(04)01202-2.

Bibliografía

Ge, D., Fellay, J., Thompson, A. J., Simon, J. S., Shianna, K. V., Urban, T. J., ... Goldstein, D. B. (2009). Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*, 461(7262), 399-401. doi: 10.1038/nature08309.

Gourley, I. S., Denofrio, D., Rand, W., Desai, S., Loh, E., & Kamoun, M. (2004). The effect of recipient cytokine gene polymorphism on cardiac transplantation outcome. *Hum Immunol*, 65(3), 248-254. doi: 10.1016/j.humimm.2004.01.008.

Green, N. M., & Marshak-Rothstein, A. (2011). Toll-like receptor driven B cell activation in the induction of systemic autoimmunity. *Semin Immunol*, 23(2), 106-112. doi: 10.1016/j.smim.2011.01.016.

Gringhuis, S. I., den Dunnen, J., Litjens, M., van Het Hof, B., van Kooyk, Y., & Geijtenbeek, T. B. (2007). C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB. *Immunity*, 26(5), 605-616. doi: 10.1016/j.immuni.2007.03.012.

Guerrero, A., Riddell, S. R., Storek, J., Stevens-Ayers, T., Storer, B., Zaia, J. A., ... Boeckh, M. (2012). Cytomegalovirus viral load and virus-specific immune reconstitution after peripheral blood stem cell versus bone

marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 18(1), 66-75. doi: 10.1016/j.bbmt.2011.05.010.

Hakki, M., Riddell, S. R., Storek, J., Carter, R. A., Stevens-Ayers, T., Sudour, P., ... Boeckh, M. (2003). Immune reconstitution to cytomegalovirus after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Impact of host factors, drug therapy, and subclinical reactivation. *Blood*, 102(8), 3060-3067. doi: 10.1182/blood-2002-11-3472.

Halary, F., Amara, A., Lortat-Jacob, H., Messerle, M., Delaunay, T., Houllès, C., ... Déchanet-Merville, J. (2002). Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity*, 17(5), 653-664.

Haspot, F., Lavault, A., Sinzger, C., Laib Sampaio, K., Stierhof, Y. D., Pilet, P., ... Halary, F. (2012). Human cytomegalovirus entry into dendritic cells occurs via a macropinocytosis-like pathway in a pH-independent and cholesterol-dependent manner. *PLoS One*, 7(4), e34795. doi: 10.1371/journal.pone.0034795.

Hauser, A. B., Stinghen, A. E., Kato, S., Bucharles, S., Aita, C., Yuzawa, Y., & Pecoits-Filho, R. (2008). Characteristics and causes of immune dysfunction related to uremia and dialysis. *Perit Dial Int*, 28(Supl. 3), S183-187.

Bibliografía

- Hayes, C. N., Imamura, M., Aikata, H., & Chayama, K. (2012). Genetics of IL28B and HCV response to infection and treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 9(7), 406-417. doi: 10.1038/nrgastro.2012.101.
- Hebart, H., & Einsele, H. (2004). Clinical aspects of CMV infection after stem cell transplantation. *Hum Immunol*, 65(5), 432-436. doi: 10.1016/j.humimm.2004.02.022.
- Hoffmann, T. W., Halimi, J. M., Büchler, M., Velge-Roussel, F., Goudeau, A., Al Najjar, A., ... Baron, C. (2008). Association between a polymorphism in the IL-12p40 gene and cytomegalovirus reactivation after kidney transplantation. *Transplantation*, 85(10), 1406-1411. doi: 10.1097/TP.0b013e31816c7dc7.
- Hoffmann, T. W., Halimi, J. M., Büchler, M., Velge-Roussel, F., Goudeau, A., Al-Najjar, ... Baron, C. (2010). Association between a polymorphism in the human programmed death-1 (PD-1) gene and cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *J Med Genet*, 47(1), 54-58. doi: 10.1136/jmg.2009.068841.
- Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdorfer, B., Giese, T., ... Hartmann, G. (2002). Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood

mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol*, 168(9), 4531-4537.

Humar, A., Lebranchu, Y., Vincenti, F., Blumberg, E. A., Punch, J. D., Limaye, A. P., ... Peeters, P. (2010). The efficacy and safety of 200 days valganciclovir cytomegalovirus prophylaxis in high risk kidney transplant recipients. *Am J Transplant*, 10(5), 1228-1237. doi: 10.1111/j.1600-6143.2010.03074.x.

Humar, A, Michaels, M., & AST ID Working Group on Infectious Disease Monitoring. (2006). American Society of Transplantation recommendations for screening, monitoring and reporting of infectious complications in immunosuppression trials in recipients of organ transplantation. *Am J Transplant*, 6(2), 262-274. doi: 10.1111/j.1600-6143.2005.01207.x.

Humar, A., Paya, C., Pescovitz, M. D., Domínguez, E., Washburn, K., Blumberg, E., ... Mueller, B. (2004). Clinical Utility of Cytomegalovirus Viral Load Testing for Predicting CMV Disease in D⁺/R⁻ Solid Organ Transplant Recipients. *Am J Transplant*, 4(4), 644-649. doi: 10.1111/j.1600-6143.2004.00391.x.

Bibliografía

- Hurme, M., Haanpää, M., Nurmikko, T., Wang, X. Y., Virta, M., Pessi, T., ... Helminen, M. (2003). IL-10 Gene Polymorphism and Herpesvirus Infections. *J Med Virol*, 70(Supl. 1), S48-50. doi: 10.1002/jmv.10320.
- Iversen, A. C., Steinkjer, B., Nilsen, N., Bohnhorst, J., Moen, S. H., Vik, R., ... Espevik, T. (2009). A proviral role for CpG in cytomegalovirus infection. *J Immunol*, 182(9), 5672-5681. doi: 10.4049/jimmunol.0801268.
- Jarvis, M. A., & Nelson J. A. (2002). Human cytomegalovirus persistence and latency in endotelial cells and macrophages. *Curr Opin in Microbiol*, 5(4), 403-407.
- Jaskula, E., Bochenska, J., Kocwin, E., Tarnowska, A., & Lange, A. (2012). CMV Serostatus of Donor-Recipient Pairs Influences the Risk of CMV Infection/Reactivation in HSCT Patients. *Bone Marrow Res*, 2012(375075), 1-8. doi: 10.1155/2012/375075.
- Kaden, J., & Priesterjahn, R. (2000). Increasing urinary IL-6 levels announce kidney graft rejection. *Transpl Int*, 13(Supl. 1), S34-41.
- Kalejta, R. F. Tegument Proteins of Human Cytomegalovirus. (2008). *Microbiol Mol Biol R*, 72(2), 249-265. doi: 10.1128/MMBR.00040-07.

Kang, S. H., Abdel-Massih, R. C., Brown, R. A., Dierkhising, R. A., Kremers, W. K., & Razonable, R. R. (2012). Homozygosity for the toll-like receptor 2 R753Q single-nucleotide polymorphism is a risk factor for cytomegalovirus disease after liver transplantations. *J Infect Dis*, 205(4), 639-646. doi: 10.1093/infdis/jir819.

Karki, R., Pandya, D., Elston, R. C., & Ferlini, C. (2015). Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. *BMC Med Genomics*, 8, 37. doi: 10.1186/s12920-015-0115-z.

Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, 11(5), 373-384. doi: 10.1038/ni.1863.

Kharfan-Dabaja, M. A., Boeckh, M., Wilck, M. B., Langston, A. A., Chu, A. H., Wloch, M. K., ... Kenney, R. T. (2012). A novel therapeutic cytomegalovirus DNA vaccine in allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation: a randomised, double-blind, placebo-controlled, Phase 2 trial. *Lancet Infect Dis*, 12(4), 290-299. doi: 10.1016/S1473-3099(11)70344-9.

Kijpittayarit, S., Eid, A. J., Brown, R. A., Paya, C. V., & Razonable, R. R. (2007). Relationship between Toll-like receptor 2 polymorphism and

Bibliografía

- cytomegalovirus disease after liver transplantation. *Clin Infect Dis*, 44(10), 1315-1320. doi: 10.1086/514339.
- Koldehoff, M., Beelen, D. W., & Elmaagacli, A. H. (2013). Increased susceptibility for aspergillosis and post-transplant immune deficiency in patients with gene variants of TLR4 after stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis*, 15(5), 533-539. doi: 10.1111/tid.12115.
- Kotenko, S. V., Gallagher, G., Baurin, V. V., Lewis-Antes, A., Shen, M., Shah, N. K., ... Donnelly, R. P. (2003). IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol*, 4(1), 69-77.
- Kotton, C. N., Kumar, D., Caliendo, A. M., Asberg, A., Chou, S., Snyderman, D. R., ... Humar, A. (2010). International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation. *Transplantation*, 89(7), 779-795. doi: 10.1097/TP.0b013e3181cee42f.
- Krieg, A. M. (2006). Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov*, 5(6), 471-484. doi: 10.1038/nrd2059.
- Krüger, B., Banas, M. C., Walberer, A., Böger, C. A., Farkas, S., Hoffmann, U., ... Kramer, B. K. (2010). A comprehensive genotype-phenotype interaction of different Toll-like receptor variations in a renal

transplant cohort. *Clin Sci (Lond)*, 119(12), 535-544. doi: 10.1042/CS20100190.

Kulkarni, A., Westmoreland, D., & Fox, J. D. (2001). Molecular-based strategies for assessment of CMV infection and disease in immunosuppressed transplant recipients. *Clin Microbiol Infect*, 7(4), 179-186.

La Rosa, C., & Diamond, D. J. (2012). The immune response to human CMV. *Future Virol*, 7(3), 279-293. doi: 10.2217/fvl.12.8.

Lachmann, R., Bajwa, M., Vita, S., Smith, H., Check, E., Akbar, A., & Kern, F. (2012). Polyfunctional T Cells Accumulate in Large Human Cytomegalovirus-Specific T Cell Responses. *J Virol*, 86(2), 1001-1009. doi: 10.1128/JVI.00873-11.

Lai, Z. Z., Ni-Zhang, Pan, X. L., & Song, L. (2013). Toll-like receptor 9 (TLR9) gene polymorphisms associated with increased susceptibility of human papillomavirus-16 infection in patients with cervical cancer. *J Int Med Res*, 41(4), 1027-1036. doi: 10.1177/0300060513483398.

Landolfo, S., Gariglio, M., Gribaudo, G., & Lembo, D. (2003). The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther*, 98(3), 269-297.

Bibliografía

- Lasker, M. V., & Nair, S. K. (2006). Intracellular TLR signaling: A Structural Perspective on Human Disease. *J Immunol*, 177(1), 11-16.
- Lazarus, R., Vercelli, D., Palmer, L. J., Klimecki, W. J., Silverman, E. K., Richter, B., ... Kwiatkowski, D. J. (2002). Single nucleotide polymorphisms in innate immunity genes: abundant variation and potential role in complex human disease. *Immunol Rev*, 190, 9-25.
- Le Page, A. K., Jager, M. M., Iwasenko, J. M., Scott, G. M., Alain, S., & Rawlinson, W. D. (2013). Clinical aspects of cytomegalovirus antiviral resistance in solid organ transplant recipients. *Clin Infect Dis*, 56(7), 1018-1029. doi: 10.1093/cid/cis1035.
- Lien, E., & Ingalls, R. R. (2002). Toll-like receptors. *Crit Care Med*, 30(Supl. 1), S1-11.
- Ljungman, P. (2008). CMV infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 42(Supl. 1), S70-72. doi: 10.1038/bmt.2008.120.
- Ljungman, P., Griffiths, P., & Paya, C. (2002). Definitions of Cytomegalovirus infection and Disease in Transplant Recipients. *Clin Infect Dis*, 34(8), 1094-1097. doi: 10.1086/339329.

- Loeffler, J., Steffens, M., Arlt, E. M., Toliat, M. R., Mezger, M., Suk, A., ... Einsele, H. (2006). 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*, 44(5), 1847-1850. doi: 10.1128/JCM.44.5.1847-1850.2006.
- Loré, K., Betts, M. R., Brenchley, J. M., Kuruppu, J., Khojasteh, S., Perfetto, S., ... Koup, R. A. (2003). Toll-like receptor ligands modulate dendritic cells to augment cytomegalovirus- and HIV-1-specific T cell responses. *J Immunol*, 171(8), 4320-4328.
- Lui, Y. Y., Chik, K. W., Chiu, R. W., Ho, C. Y., Lam, C. W., & Lo, Y. M. (2002). Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clin Chem*, 48(3), 421-427.
- Mannino, M. H., Zhu, Z., Xiao, H., Bai, Q., Wakefield, M. R., & Fang, Y. (2015). The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer Lett*, 367(2), 103-107. doi: 10.1016/j.canlet.2015.07.009.
- Manuel, O., Pascual, M., Trendelenburg, M., & Meylan, P. R. (2007). Association between mannose-binding lectin deficiency and

Bibliografía

cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transplantation*, 83(3), 359-362. doi: 10.1097/01.tp.0000251721.90688.c2.

Manuel, O., Wójtowicz, A., Bibert, S., Mueller, N. J., van Delden, C., Hirsch, H. H., ... Bochud, P. Y. (2015). Influence of IFNL3/4 polymorphisms on the incidence of cytomegalovirus infection after solid-organ transplantation. *J Infect Dis*, 211(6), 906-914. doi: 10.1093/infdis/jiu557.

Marcos, M. A. (2011). Estudios de resistencia. ¿Cuándo están indicados?. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, (Supl. 6), 24-27. doi: 10.1016/S0213-005X(11)70053-2.

Mattes, F. M., Vargas, A., Kopycinski, J., Hainsworth, E. G., Sweny, P., Nebbia, G., ... Emery, V. C. (2008). Functional impairment of cytomegalovirus specific CD8 T cells predicts high-level replication after renal transplantation. *Am J Transplant*, 8(5), 990-999. doi: 10.1111/j.1600-6143.2008.02191.x.

McCormick, A. L., & Mocarski, E. S. (2015). The immunological underpinnings of vaccinations to prevent cytomegalovirus disease. *Cell Mol Immunol*, 12(2), 170-179. doi: 10.1038/cmi.2014.120.

McDermott, D. H., Conway, S. E., Wang, T., Ricklefs, S. M., Agovi, M. A., Porcella, S. F., ... Abdi, R. (2010). Donor and recipient chemokine receptor CCR5 genotype is associated with survival after bone marrow transplantation. *Blood*, 115(11), 2311-2318. doi: 10.1182/blood-2009-08-237768.

McDermott, D. H., Zimmerman, P. A., Guignard, F., Kleeberger, C. A., Leitman, S. F., & Murphy, P. H. (1998). CCR5 promoter polymorphism and HIV-1 disease progression. Multicenter AIDS Cohort Study (MACS). *Lancet*, 352(9131), 866-870.

Mensah, N. Y., Peterlongo, P., Steinherz, P., Pamer, E. G., Satagopan, J., & Papanicolaou, G. A. (2009). Toll-like receptor 4 polymorphisms and risk of gram-negative bacteraemia after allogeneic stem cell transplantation. A prospective pilot study. *Biol Blood Marrow Transplant*, 15 (9), 1130-1133. doi: 10.1016/j.bbmt.2009.04.012.

Mezger, M., Steffens, M., Semmler, C., Arlt, E. M., Zimmer, M., Kristjanson, G. I., ... Loeffler, J. (2008). Investigation of promoter variations in dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) (CD209) and their relevance for human cytomegalovirus reactivation and disease after allogeneic stem-cell transplantation. *Clin Microbiol Infect*, 14(3), 228-234. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01902.x.

Bibliografía

Mitsani, D., Nguyen, M. H., Girnita, D. M., Spichty, K., Kwak, E. J., Silveira, F. P., ... Clancy, C. J. (2011). 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*, 30(5), 523-529. doi: 10.1016/j.healun.2010.11.008.

Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., & O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*, 19, 683-765. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.683.

Morrison, L. A. (2004). The Toll of herpes simplex virus infection. *Trends Microbiol*, 12(8), 353-356.

Mossa, P., & Khana, N. (2004). CD8⁺ T-cell immunity to cytomegalovirus. *Hum Immunol*, 65(5), 456-464. doi: 10.1016/j.humimm.2004.02.014.

Murawski, M. R., Bowen, G. N., Cerny, A. M., Anderson, L. J., Haynes, L. M., Tripp, R. A., ... Finberg, R. W. (2009). Respiratory syncytial virus activates innate immunity through Toll-like receptor 2. *J Virol*, 83(3), 1492-1500. doi: 10.1128/JVI.00671-08.

- Netea, M. G., van de Veerdonk, F. L., & van der Meer, J. W. (2012). Primary immunodeficiencies of pattern recognition receptors. *J Intern Med*, 272(6), 517-527. doi: 10.1111/j.1365-2796.2012.02583.x.
- Nordøy, I., Müller, F., Nordal, K. P., Rollag, H., Aukrust, P., & Frøland, S. S. (2000). Chemokines and soluble adhesion molecules in renal transplant recipients with cytomegalovirus infection. *Clin Exp Immunol*, 120(2), 333-337.
- Ozdemir, E., St John, L. S., Gillespie, G., Rowland-Jones, S., Champlin, R. E., Molldrem, J. J., & Komanduri, K. V. (2002). Cytomegalovirus reactivation following allogeneic stem cell transplantation is associated with the presence of dysfunctional antigen-specific CD8⁺ T cells. *Blood*, 100(10), 3690-3697. doi: 10.1182/blood-2002-05-1387.
- Paulus, C., Krauss, S., & Nevels, M. (2006). A human cytomegalovirus antagonist of type 1 IFN-dependent signal transducer and activator of transcription signaling. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 103(10), 3840-3845.
- Pérez-Romero, P., Blanco, P., Giménez, E., Solano, C., & Navarro, D. (2015). An update on the management and prevention of cytomegalovirus infection following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Future Virol*, 10(2), 113-134. doi:10.2217/fvl.14.102.

Bibliografía

- Pine, S. O., McElrath, M. J., & Bochud, P. Y. (2009). Polymorphisms in toll-like receptor 4 and toll-like receptor 9 influence viral load in a sero-incident cohort of HIV-1-infected individuals. *AIDS*, 23(18), 2387-2395. doi: 10.1097/QAD.0b013e328330b489.
- Plotkin, S. A., Smiley, M. L., Friedman, H. M., Starr, S. E., Fleisher, G. R., Wlodaver C, ... Barker, C. F. (1984). Towne-vaccine-induced prevention of cytomegalovirus disease after renal transplants. *Lancet*, 1(8376), 528-530.
- Poole, E., & Sinclair, J. (2015). Sleepless latency of human cytomegalovirus. *Med Microbiol Immunol*, 204(3), 421-429.
- Pourghneysari, B., Piper, K. P., McLarnon, A., Arrazi, J., Bruton, R., Clark, F., ... Moss, P. A. (2009). Early reconstitution of effector memory CD4⁺ CMV-specific T cells protects against CMV reactivation following allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant*, 43(11), 853-861. doi: 10.1038/bmt.2008.403.
- Ramanan, P., & Razonable, R. R. (2013). Cytomegalovirus Infections in Solid Organ Transplantation: A Review. *Infect Chemother*, 45(3), 260-271. doi: 10.3947/ic.2013.45.3.260.

Razonable, R. R., Åsberg, A., Rollag, H., Duncan, J., Boisvert, D., Yao, J. D., ... Do, T. D. (2013). Virologic suppression measured by a cytomegalovirus (CMV) DNA test calibrated to the World Health Organization international standard is predictive of CMV disease resolution in transplant recipients. *Clin Infect Dis*, 56(11), 1546-1553. doi: 10.1093/cid/cit096.

Reyda, S., Tenzer, S., Navarro, P., Gebauer, W., Saur, M., Krauter, S., ... Plachter, B. (2014). The tegument protein pp65 of human cytomegalovirus acts as an optional scaffold protein that optimizes protein uploading into viral particles. *J Virol*, 88(17), 9633-9646. doi: 10.1128/JVI.01415-14.

de Rooij, B. J., van der Beek, M. T., van Hoek, B., Vossen, A. C., Rogier Ten Hove, W., Roos, A., ... Verspaget, H. W. (2011). Mannose-binding lectin and ficolin-2 gene polymorphisms predispose to cytomegalovirus (re)infection after orthotopic liver transplantation. *J Hepatol*, 55(4), 800-807. doi: 10.1016/j.jhep.2011.01.039.

Rovira, M., & Ruiz, I. (2007). Infecciones en el Trasplante de Precursores Hematopoyéticos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 25(7), 477-486.

Saadi, M. I., Yaghibi, R., Karimi, M. H., Geramizadeh, B., Ramzi, M., & Zakerinia, M. (2013). Association of the costimulatory molecule gene

Bibliografía

- polymorphisms and active cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell transplant patients. *Mol Biol Rep*, 40(10), 5833-5842. doi: 10.1007/s11033-013-2689-x.
- Sahoo, S., Kang, S., Supran, S., Saloman, R., Wolfe, H., & Freeman, R. B. (2000). Tumor necrosis factor genetic polymorphisms correlate with infections after renal transplantation. *Transplantation*, 69(5), 880-884.
- Samson, M., Libert, F., Doranz, B. J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C. M., Saragosti, S., ... Parmentier, M. (1996). Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*, 382(6593), 722-725. doi: 10.1038/382722a0.
- Sanbonmatsu, S., Pérez, M., & Navarro, J. M. (2014). Infección por Citomegalovirus Humano. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 32 (Supl. 1), 15-22. doi: 10.1016/S0213-005X(14)70145-4.
- Satoh, S., Saito, M., Inoue, K., Miura, M., Komatsuda, A., & Habuchi, T. (2007). Association of cytokine polymorphisms with subclinical progressive chronic allograft nephropathy in Japanese renal transplant recipients: Preliminary study. *Int J Urol*, 14(11), 990-994. doi: 10.1111/j.1442-2042.2007.01886.x.

- Sester, M., U. Sester, B., Gärtner, G., Heine, M., Girndt, N., Mueller-Lantzsch, ... Kohler, H. (2001). Levels of virus-specific CD4 T cells correlate with cytomegalovirus control and predict virus-induced disease after renal transplantation. *Transplantation*, 71(9), 1287-1294.
- Sester, M., Sester, U., Gärtner, B., Kubuschok, B., Girndt, M., Meyerhans, A., & Köhler, H. (2002). Sustained High Frequencies of Specific CD4 T Cells Restricted to a Single Persistent Virus. *J Virol*, 76(8), 3748-3755.
- Sheppard, P., Kindsvogel, W., Xu, W., Henderson, K., Schlutsmeyer, S., Whitmore, T. E., ... Klucher, K. M. (2003). IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol*, 4(1), 63-68. doi: 10.1038/ni873.
- Sia, I. G., & Patel, R. (2000). New Strategies for Prevention and Therapy of Cytomegalovirus Infection and Disease in Solid-Organ Transplant Recipients. *Clin Microbiol Rev*, 13(1), 83-121.
- Sinclair, J. (2008). Human cytomegalovirus: Latency and reactivation in the myeloid lineage. *J Clin Virol*, 41(3), 180-185. doi: 10.1016/j.jcv.2007.11.014.
- Sinzger, C., Kahl, M., Laib, K., Klingel, K., Rieger, P., Plachter, B., & Jahn, G. (2000). Tropism of human cytomegalovirus for endothelial cells is

Bibliografía

determined by a post-entry step dependent on efficient translocation to the nucleus. *J Gen Virol*, 81(Pt12), 3021-3035. doi: 10.1099/0022-1317-81-12-3021.

Solano, C., Benet, I., Clarí, M. A., Nieto, J., de la Cámara, R., López, J., ... Navarro D. (2008). Enumeration of cytomegalovirus-specific interferon gamma CD8⁺ and CD4⁺ T cells early after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk of active cytomegalovirus infection. *Haematologica*, 93(9), 1434-1436. doi: 10.3324/haematol.12880.

Solano, C., Muñoz, I., Gutiérrez, A., Farga, A., Prósper, F., García-Conde, ... Gimeno, C. (2001). Qualitative plasma PCR assay (AMPLICOR CMV test) versus pp65 antigenemia assay for monitoring cytomegalovirus viremia and guiding preemptive ganciclovir therapy in allogeneic stem cell transplantation. *J Clin Microbiol*, 39(11), 3938-3941. doi: 10.1128/JCM.39.11.3938-3941.2001.

Soriano-Sarabia, N., Vallejo, A., Ramírez-Lorca, R., Rodríguez, M. M., Salinas, A., Pulido, I., ... Leal, M. (2008). Influence of the Toll-like receptor 9 1635A/G polymorphism on the CD4 count, HIV viral load, and clinical progression. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 49(2), 128-135. doi: 10.1097/QAI.0b013e318184fb41.

- Staras, S. A., Dollard, S. C., Radford, K. W., Flanders, W. D., Pass, R. F., & Cannon, M. J. (2006). Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. *Clin Infect Dis*, 43(9), 1143-1151. doi: 10.1086/508173.
- Streblow, D. N., Kreklywich, C., Yin, Q., De La Melena, V. T., Corless, C. L., Smith, P. A., ... Orloff, S. L. (2003). Cytomegalovirus-mediated upregulation of chemokine expression correlates with the acceleration of chronic rejection in rat heart transplants. *J Virol*, 77(3), 2182-2194.
- Sugiyama, M., Tanaka, Y., Wakita, T., Nakanishi, M., & Mizokami, M. (2011). Genetic variation of the IL-28B promoter affecting gene expression. *PLoS One*, 6(10), e26620. doi: 10.1371/journal.pone.0026620.
- Tabeta, K., Georgel, P., Janssen, E., Du, X., Hoebe, K., Crozat, K., ... Beutler B. (2004). Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(10), 3516-3521. doi: 10.1073/pnas.0400525101.
- Taniguchi, R., Koyano, S., Suzutani, T., Goishi, K., Ito, Y., Morioka, I., ... Inoue, N. (2013). Polymorphisms in TLR-2 are associated with congenital cytomegalovirus (CMV) infection but not with congenital CMV disease. *Int J Infect Dis*, 17(12), e1092-e1097. doi: 10.1016/j.ijid.2013.06.004.

Bibliografía

- Texereau, J., Chiche, J. D., Taylor, W., Choukroun, G., Comba, B., & Mira, J. P. (2005). The importance of Toll-like receptor 2 polymorphisms in severe infections. *Clin Infect Dis*, 41 (Supl. 7), S408-415. doi: 10.1086/431990.
- Thio, C. L., Astemborski, J., Bashirova, A., Mosbruger, T., Greer, S., Witt, M. D., ... Carrington, M. (2007). Genetic protection against hepatitis B virus conferred by CCR5Delta32: Evidence that CCR5 contributes to viral persistence. *J Virol*, 81(2), 441-445. doi: 10.1128/JVI.01897-06.
- Thomas, D. L., Thio, C. L., Martin, M. P., Qi, Y., Ge, D., O'Huigin, C., ... Carrington, M. (2009). Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*, 461(7265), 798-801. doi: 10.1038/nature08463.
- Tormo, N., Solano, C., Benet, I., Clarí, M. A., Nieto, J., de la Cámara, R., ... Navarro, D. (2010). Lack of prompt expansion of cytomegalovirus pp65 and IE-1-specific IFN-gamma CD8⁺ and CD4⁺ T cells is associated with rising levels of pp65 antigenemia and DNAemia during pre-emptive therapy in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*, 45(3), 543-549. doi: 10.1038/bmt.2009.172.

- Tormo, N., Solano, C., Benet, I., Nieto, J., de la Cámara, R., López, J., ... Navarro D. (2011). Reconstitution of CMV pp65 and IE-1-specific IFN- γ CD8(+) and CD4(+) T-cell responses affording protection from CMV DNAemia following allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*, 46(11), 1437-1443. doi: 10.1038/bmt.2010.330.
- de la Torre-Cisneros, J., Fariñas, M. C., Castón, J. J., Aguado, J. M., Cantisán, S., Carratalá, J., & Zurbano, F. (2011). GESITRA-SEIMC/REIPI recommendations for the management of cytomegalovirus infection in solid-organ transplant patients. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 29(10), 735-758. doi: 10.1016/j.eimc.2011.05.022.
- Traub, S., Demaria, O., Chasson, L., Serra, F., Desnues, B., & Alexopoulou, L. (2012). Sex bias in susceptibility to MCMV infection: Implication of TLR9. *PLoS One*, 7(9), e45171. doi: 10.1371/journal.pone.0045171.
- Trikalinos, T. A., Salanti, G., Khoury, M. J., & Ioannidis, J. P. (2006). Impact of violations and deviations in Hardy-Weinberg equilibrium on postulated gene-disease associations. *Am J Epidemiol*, 163(4), 300-309. doi: 10.1093/aje/kwj046.
- Trilling, M., Le, T. K., & Hengel, H. (2012). Interplay between CMVs and interferon signaling: implications for pathogenesis and therapeutic

Bibliografía

- intervention. *Future Microbiol*, 7(11), 1269-1282. doi: 10.2217/fmb.12.109.
- Ueda, A., Ishigatsubo, Y., Okubo, T., & Yoshimura, T. (1997). Transcriptional regulation of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. Cooperation of two NF-kappaB sites and NF-kappaB/Rel subunit specificity. *J Biol Chem*, 272(49), 31092-31099.
- Vaidya, S. A., & Cheng, G. (2003). Toll-like receptors and innate antiviral responses. *Curr Opin Immunol*, 15(4), 402-407.
- Varani, S., Cederarv, M., Feld, S., Tammik, C., Frascaroli, G., Landini, M. P., & Söderberg-Nauclér, C. (2007). Human cytomegalovirus differentially controls B cell and T cell responses through effects on plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol*, 179(11), 7767-7776.
- Varani, S., Frascaroli, G., Homman-Loudivi, M., Feld, S., Landini, M. P., & Soderberg-Naucler, C. (2005). Human cytomegalovirus inhibits the migration of immature dendritic cells by down-regulating cell-surface CCR1 and CCR5. *J Leukoc Biol*, 77(2), 219-228. doi: 10.1189/jlb.0504301.
- Varnum, S. M., Streblow, D. N., Monroe, M. E., Smith, P., Auberry, K. J., Pasa-Tolic, L., ... Nelson, J. A. (2004). Identification of Proteins in

- Human Cytomegalovirus (HCMV) Particles: the HCMV Proteome. *J Virol*, 78(20), 10960-10966. doi: 10.1128/JVI.78.20.10960-10966.2004.
- Vu, D., Shah, T., Ansari, J., Sakharkar, P., Yasir, Q., Naraghi, R., ... Min, D. (2014). Interferon-gamma gene polymorphism +874 A/T is associated with an increased risk of cytomegalovirus infection among Hispanic renal transplant recipients. *Transpl Infect Dis*, 16(5), 724-732. doi: 10.1111/tid.12285.
- Woitas, R. P., Ahlenstiel, G., Iwan, A., Rockstroh, J. K., Brackmann, H. H., Kupfer, B., ... Spengler, U. (2002). Frequency of the HIV-protective CC chemokine receptor 5-Delta32/Delta32 genotype is increased in hepatitis C. *Gastroenterology*, 122(7), 1721-1728.
- Xiao, H. W., Luo, Y., Lai, X. Y., Shi, J. M., Tan, Y. M., He, J. S., ... Huang, H. (2014). Donor TLR9 gene tagSNPs influence susceptibility to aGVHD and CMV reactivation in the allo-HSCT setting without polymorphisms in the TLR4 and NOD2 genes. *Bone Marrow Transplant*, 49(2), 241-247. doi: 10.1038/bmt.2013.160.
- Ye, S., Dhillon, S., Ke, X., Collins, A. R., & Day, I. N. (2001). An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res*, 29(17): E88-8.

Bibliografía

- Yew, K. H., Carpenter, C., Duncan, R. S., & Harrison, C. J. (2012). Human cytomegalovirus induces TLR4 signaling components in monocytes altering TIRAP, TRAM and downstream interferon-beta and TNF-alpha expression. *PLoS One*, 7(9), e44500. doi: 10.1371/journal.pone.0044500.
- Yoshimura, T., & Leonard, E. J. (1991). Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Adv Exp Med Biol*, 305, 47-56.
- Zhou, W., Longmate, J., Lacey, S. F., Palmer, J. M., Gallez-Hawkins, G., Thao, L., ... Diamond, D. J. (2009). Impact of donor CMV status on viral infection and reconstitution of multifunction CMV-specific T cells in CMV-positive transplant recipients. *Blood*, 113(25), 6465-6476. doi: 10.1182/blood-2009-02-203307.

IX. ARTÍCULOS ORIGINALES

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

Isabel Corrales,¹ Estela Giménez,¹ Carlos Solano,^{2,3} Paula Amat,^{2a} Rafael de la Cámara,⁴ José Nieto,⁵ Ana García-Noblejas,⁴ and David Navarro^{1,6*}

¹Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Fundación INCLIVA, Valencia, Spain

²Hematology and Medical Oncology Service, Hospital Clínico Universitario, Fundación INCLIVA, Valencia, Spain

³Department of Medicine, School of Medicine, University of Valencia, Spain

⁴Hematology Service Hospital de La Princesa, Madrid, Spain

⁵Hematology Service, Hospital Morales Meseguer, Murcia, Spain

⁶Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes involved in the activation or regulation of innate and adaptive immune responses may modulate the susceptibility to and the natural history of certain chronic viral infections. The current study aimed to investigate whether donor and recipient SNPs in the chemokine receptor 5 (rs1800023), monocyte chemoattractant protein 1 (rs13900), interleukin-10 (rs1878672), and Toll-like receptor 9 (rs352140) genes would exert any influence on the rate of incidence and features of CMV DNAemia in the allogeneic stem cell transplantation setting. This was a retrospective observational multicenter study. The cohort consisted of 102 non-consecutive allogeneic stem cell transplant recipients. SNP genotyping was performed by allele-specific real-time PCR. CMV surveillance was performed by the pp65 antigenemia assay/ and or by real-time PCR. Seventy-three patients developed CMV DNAemia within the first 100 days after transplantation (71.5%). Neither donor nor recipient SNPs were associated significantly with the rate of incidence of active CMV infection, nor with the need for pre-emptive antiviral therapy. Both the duration of CMV DNAemia and the plasma CMV DNA peak load during episodes were significantly higher in patients harboring the donor (but not the recipient) chemokine receptor 5 A/A genotype, than in their A/G and G/G counterparts ($P=0.022$ and $P=0.045$, respectively). The data reported suggest that SNPs in chemokine receptor 5 may influence the dynamics of CMV

infection in the Allo-SCT setting. *J. Med. Virol.* 9999: XX-XX, 2014.

© 2014 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: Cytomegalovirus (CMV); Single nucleotide polymorphisms; CMV DNAemia; allogeneic stem cell transplantation

INTRODUCTION

Cytomegalovirus (CMV) remains a significant cause of morbidity and mortality among allogeneic stem cell transplant recipients [Solano and Navarro, 2010]. Several clinical factors, such the type of transplant,

Grant sponsor: Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain; Grant numbers: 09/1117.

Conflicts of Interest and Source of Funding: This research was supported by grants 09/1117 and 12/1992 from Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain. All authors declare no conflict of interest.

*Paula Amat is a research fellow of the Asociación Española contra el Cáncer (AECC).

*Correspondence to: David Navarro, Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, and Department of Microbiology, School of Medicine, Av. Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia, Spain. E-mail: david.navarro@uv.es

Accepted 18 July 2014

DOI 10.1002/jmv.24050

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

the source of stem cells, and the severity of acute graft versus host disease, and immunological factors, such as the degree of reconstitution of adaptive T-cell immunity following transplantation have been shown consistently to determine the risk of active CMV infection and CMV end-organ disease in this clinical setting; Nevertheless, their positive predictive value is rather suboptimal [Solano and Navarro, 2010].

A growing body of experimental evidence indicates that single nucleotide polymorphisms (SNPs) in several genes involved in the activation or regulation of innate and adaptive immune responses may modulate the susceptibility to and the natural history of certain chronic viral infections [Ge et al., 2009]. The identification of genetic traits predisposing to active CMV infection and CMV end-organ disease may allow physicians to design preventative therapy strategies to anticipate and avoid CMV-related complications on an individual basis, which may translate into tangible clinical benefits for patients. In this context, certain polymorphisms in the chemokine receptor 5 (CCR5), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), interleukin-10 (IL-10), Toll-like receptor 9 (TLR-9), dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin (DC-SIGN), and interferon lambda type III (IL28B) genes have been associated with a higher risk of active CMV infection, CMV end-organ disease, or both in Allo-SCT patients [Loeffler et al., 2006; Mezger et al., 2008; Bravo et al., 2014b]. The purpose of this study was to investigate further whether certain donor and recipient SNPs in CCR5, MCP-1, IL-10, and TLR-9 genes would exert any influence on the incidence and the dynamics of CMV DNAemia developing within the first 100 days after transplantation in the allogeneic stem cell transplantation setting.

MATERIAL AND METHODS

Patients

This was a retrospective observational study. The cohort consisted of 102 non-consecutive allogeneic stem cell transplant recipients (62 males and 40 females) who attended the participating hospitals from 2006 to 2011 (60 patients at the University Clinic Hospital, between 2006 and 2011; 25 patients at Morales Meseguer Hospital, between 2010 and 2011; 17 patients at La Princesa Hospital, between 2010 and 2011). Only patients attended at the participating hospitals within the referred time periods and from whom a sufficient volume of plasma obtained prior to the time of transplantation was available for SNP genotyping (receptor SNPs) were included in the current study. The median age of patients was 49 years (range, 15–70). Clinical and demographic data of the patients are summarized in Table I. The study period comprised the first 100 days following transplantation. The study was approved by the Review Board and Ethics Commit-

tees of the participating hospitals. Informed consent to participate in this study was obtained from patients, parents, or relatives.

Management of Active CMV Infection

The strategy for surveillance of active CMV infection and for the inception and cessation of antiviral therapy has been described elsewhere [Tormo et al., 2011]. Briefly, for patients attending the University Clinic Hospital between February 2006 and April 2010, CMV monitoring was performed by both the pp65 antigenemia assay and a real-time PCR (CMV real-time PCR, Abbott Molecular, Des Plaines, IL). Initiation of preemptive therapy was based exclusively on the result of the antigenemia assay (> 1 pp65-positive cell/200,000 polymorphonuclear leukocytes). For those patients undergoing allogeneic stem cell transplantation after April 2010, CMV surveillance was performed exclusively by real-time PCR, and the threshold for initiation of preemptive therapy was 500 copies/ml in plasma. For patients attending the other two centers, CMV surveillance was performed by a real-time PCR (LightCycler CMV Quant Kit, Roche, Branchburg, NJ), and inception of antiviral therapy was done upon detection of 150 or 500 copies/ml. Antiviral therapy was interrupted in all programs upon two consecutive negative pp65 antigenemia or PCR test results in specimens drawn 1 week apart. CMV surveillance was conducted once a week (twice a week for most patients during episodes of active CMV infection). CMV DNA loads measured by the Abbott and the Roche real-time PCR assays were comparable, differing by less than 0.5 \log_{10} copies/ml across the entire range of quantification [Clari et al., 2013].

Single Nucleotide Polymorphism Analyses

Donor and recipient CCR5 (rs1800023), MCP-1 (rs13900), IL-10 (rs1878672), and TLR-9 (rs352140) genotyping was performed by allele-specific real-time PCR in a StepOne Real-Time PCR system (Applied Biosystems, CA) using consensus primers, as detailed previously [Loeffler et al., 2006; Mezger et al., 2008]. Single nucleotide polymorphisms chosen for the analyses described in the current study were those linked more significantly with the occurrence of active CV infection, CMV end-organ disease or both in the referenced studies [Loeffler et al., 2006; Mezger et al., 2008]. Whole blood or plasma samples obtained from patients before transplantation and following engraftment (around 30 days after allogeneic stem cell transplantation) were used to determine receptor and donor SNPs, respectively. Previous studies showed that cell-free DNA in plasma once patients had converted to full donor chimeras was predominantly of a hematopoietic origin [Lui et al., 2002]. Specimens had been cryopreserved at -70°C , and were retrieved for analysis. DNA was extracted with the QIAamp DNA blood Mini QIAcube Kit (Qiagen,

TABLE I. Demographic and Clinical Characteristics of the Patients

Parameter	no. (%)
Sex	
Male	62 (60.8)
Female	40 (39.2)
Underlying disease	
Acute myeloid leukaemia	43 (42.2)
Non-Hodgkin's lymphoma	24 (23.5)
Myelodysplastic syndrome	9 (8.8)
Acute lymphocytic leukaemia	5 (4.9)
Chronic lymphocytic leukaemia	4 (3.9)
Hodgkin's lymphoma	3 (2.9)
Chronic myeloid leukaemia	2 (2.0)
Multiple Myeloma	6 (5.9)
Aplastic Anemia	2 (2.0)
Others	4 (3.9)
HLA-matching	
Matched	81 (79.4)
Mismatched	21 (20.6)
Donor type	
Related	49 (48.0)
Unrelated	53 (52.0)
Stem cell source	
Peripheral blood	86 (84.3)
Umbilical cord blood	12 (11.8)
Bone marrow	4 (3.9)
Conditioning regimen	
Myeloablative	46 (45.1)
Non-myeloablative	56 (54.9)
GvHD prophylaxis	
Cyclosporin A/Methotrexate/ Corticosteroids/Thymoglobulin	16 (15.7)
Cyclosporin A/Methotrexate/ Cyclosporin A/Mycophenolate mofetil	51 (50.0)
Others	15 (14.7)
CMV serostatus	
D+/R+	44 (43.1)
D-/R+	39 (38.2)
D+/R-	11 (10.8)
D-/R-	8 (7.8)
Acute GvHD	
0-I	62 (60.8)
II-IV	40 (39.2)

CMV, Cytomegalovirus; D, donor; GvHD, graft versus host disease; HLA, human leukocyte antigen; R, recipient.

Valencia, CA) using the QIAcube extraction platform (Qiagen, Valencia, CA), following the instructions of the manufacturer.

Definitions

An episode of active CMV infection was defined by a positive real-time PCR result (any plasma CMV DNA load level). The duration of a given episode of active CMV infection was the interval between the time at which CMV DNAemia was detected and that at which it was cleared. Only first episodes of active CMV infection were taken into consideration for analyses.

Statistical Analysis

Data were analyzed with the assistance of SPSS statistical package (version 20.0). First, separate

pairwise comparisons among the different genotype groups for each parameter were performed. Then, three potential genetic models were examined: dominant (one allele suffices for the effect); recessive (the effect requires two alleles); and co-dominant, where a per-allele effect that places the heterozygous genotype mid-way between the homozygous genotypes is assumed. These different genetic models were screened for their association with the occurrence of active CMV infection and the dynamics of plasma CMV DNAemia (need for preemptive antiviral therapy, duration of the episodes, and peak CMV DNA load during the episodes). In addition, all possible combinations of the different SNPs (haplotypes) were screened for their potential association with the occurrence of active CMV infection. Frequency comparisons were carried out using the χ^2 test (Fisher exact test) for categorical variables. Differences between medians were compared using the Mann-Whitney U test (two independent variables). Two-sided exact *P* values are reported. A *P* value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

The SNPs subjected to analysis were in Hardy-Weinberg equilibrium in the study group, as determined by a chi-square test using one degree of freedom (*P* = 0.204 for CCR5; *P* = 0.457 for MCP-1; *P* = 0.769 for IL-10; *P* = 0.105 for TLR-9). Seventy-three patients developed CMV DNAemia within the first 100 days after allogeneic stem cell transplantation (71.5%), at a median of 35 days following transplantation (range, 2–65 days). In this cohort, the occurrence of active CMV infection was associated significantly with the development of grade II–IV acute graft versus host disease (*P* = 0.02). A trend towards a higher incidence of active CMV infection was observed in HLA-mismatched and unrelated allogeneic stem cell transplants, although statistical significance was not reached (*P* = 0.29 and *P* = 0.36, respectively). Neither the source of stem cells nor the conditioning regimen had a significant impact on the incidence of active CMV infection (not shown).

Neither donor nor recipient SNPs in CCR5, MCP-1, IL-10, or TLR-9 genes were associated significantly with the rate of incidence of active CMV infection (Tables II and III, respectively). Likewise, none of the possible SNP haplotypes was found to associate significantly with the occurrence of CMV DNAemia (not shown). A total of 62 patients with active CMV infection required the inception of antiviral agents for treatment of first episodes of active CMV infection, 36 on the basis of PCR results and 26 on the basis of pp65 antigenemia results. The remaining 11 patients were able to resolve the episode spontaneously. The number of patients receiving antiviral therapy was comparable irrespective of donor or recipients SNPs (not shown).

Next it was investigated whether there was a relationship between donor and recipient SNPs and

TABLE II. Effect of Donor Single Nucleotide Polymorphism Genotypes on the Incidence Rate of Active Cytomegalovirus Infection in Allogeneic Stem Cell Transplant Patients

Gene	Single Nucleotide Polymorphism	Active CMV infection		P value ^d
		Yes (N = 73)	No (N = 29)	
CCR5	A/A ^a	28 (38.4)	11 (37.9)	0.89
	A/G	35 (47.9)	15 (51.7)	
	G/G	10 (13.7)	3 (10.3)	
	A/A-A/G ^b	63 (86.3)	26 (89.7)	
	G/G	10 (13.7)	3 (10.3)	
MCP1	A/G-G/G ^c	45 (61.6)	18 (62.1)	0.97
	A/A	28 (38.4)	11 (37.9)	
	C/C ^a	40 (54.8)	15 (51.7)	
	C/T	24 (32.9)	10 (34.5)	
	T/T	9 (12.3)	4 (13.8)	
IL-10	T/T-C/T ^b	33 (45.2)	14 (48.3)	0.78
	C/C	40 (54.8)	15 (51.7)	
	C/C-C/T ^c	64 (87.7)	25 (86.2)	
	T/T	9 (12.3)	4 (13.8)	
	A/A ^a	14 (19.2)	5 (17.2)	
TLR9	G/A	37 (50.7)	17 (58.6)	0.76
	G/G	22 (30.1)	7 (24.1)	
	A/A-G/A ^b	51 (69.9)	22 (75.9)	
	G/G	22 (30.1)	7 (24.1)	
	G/A-G/G ^c	59 (80.8)	24 (82.8)	
TLR9	A/A	14 (19.2)	5 (17.2)	0.87
	C/C ^a	18 (24.7)	8 (27.6)	
	C/T	37 (50.7)	13 (44.8)	
	T/T	18 (24.7)	8 (27.6)	
	C/C-C/T ^b	55 (75.3)	21 (72.4)	
TLR9	T/T	18 (24.7)	8 (27.6)	0.76
	C/T-T/T ^c	55 (75.3)	21 (72.4)	
	C/C	18 (24.7)	8 (27.6)	

CMV, Cytomegalovirus; CCR5, chemokine receptor 5; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; IL-10, interleukin-10; TLR-9, Toll-like receptor 9.

^aCo-dominant model of inheritance.

^bDominant model of inheritance.

^cRecessive model of inheritance.

^dFrequency comparisons were carried out using the χ^2 for categorical variables. Two-sided exact P values are reported. A P value < 0.05 was considered statistically significant

the duration of CMV DNAemia and the plasma CMV DNA peak load during episodes. As shown in Tables IV and V, both parameters were significantly higher in patients harboring the donor (but not the recipient) CCR5 A/A genotype than in their A/G and G/G counterparts. The Mendelian co-dominant model provided the best fit for these data. This effect did not seem to be related to differences in pre- or post-transplant clinical factors between SNP groups (not shown). In particular, grade II-IV graft versus host disease occurred at a similar rate in patients harboring the donor A/A, A/G, and G/G SNP genotypes ($P = 0.592$).

SNPs in the MCP-1, IL-10, and TLR-9 genes had no apparent impact on the features of active CMV infection in this cohort. Of note, there were no differences between comparative groups (for any SNP) regarding the method employed for plasma CMV DNA testing, the strategy of preemptive antiviral therapy guidance, the antiviral used for treatment, or the time frame in which the episodes of active CMV infection occurred (not shown).

DISCUSSION

The current study was undertaken to assess the impact of certain SNPs in CCR5, MCP-1, IL-10, and TLR-9 genes on the incidence rate and features of active CMV infection in a cohort of non-consecutive allogeneic stem cell transplant recipients attending three Spanish hospitals. The low incidence of CMV end-organ disease in the current cohort (< 3%) precluded any meaningful statistical analysis. Previously published data [Loeffler et al., 2006; Mezger et al., 2008] pointed to a relationship between certain donor CCR5, MCP-1, IL-10, and TLR-9 SNPs and the occurrence of either CMV reactivation (MCP-1) or CMV end-organ disease (MCP-1, CCR5, IL-10, TLR-9, $P = 0.068$ for the last). These associations were deemed to be plausible biologically, as these genes are targeted by CMV in its strategy to evade from immune mechanisms elicited by viral infection.

The current study differs from those referred above in two major aspects. First, not only the potential impact of the donor SNPs, but also those of the

TABLE III. Effect of Recipient Single Nucleotide Polymorphism Genotypes on the Incidence Rate of Active Cytomegalovirus Infection in Allogeneic Stem Cell Transplant Patients

Gene	Single Nucleotide Polymorphism	Active CMV infection		P value ^d
		Yes (N = 73)	No (N = 29)	
CCR5	A/A ^a	23 (31.5)	7 (24.1)	0.74
	A/G	40 (54.8)	17 (58.6)	
	G/G	10 (13.7)	5 (17.2)	
	A/A-A/G ^b	63 (86.3)	24 (82.8)	
	G/G	10 (13.7)	5 (17.2)	
MCP1	A/G-G/G ^c	50 (68.5)	22 (75.9)	0.46
	A/A	23 (31.5)	7 (24.1)	
	C/C ^a	36 (49.3)	13 (44.8)	
	C/T	30 (41.1)	11 (37.9)	
	T/T	7 (9.6)	5 (17.2)	
IL-10	T/T-C/T ^b	37 (50.7)	16 (55.2)	0.68
	C/C	36 (49.3)	13 (44.8)	
	C/C-C/T ^c	66 (90.4)	24 (82.8)	
	T/T	7 (9.6)	5 (17.2)	
	A/A ^a	15 (20.5)	3 (10.3)	
TLR9	G/A	31 (42.5)	15 (51.7)	0.44
	G/G	27 (37.0)	11 (37.9)	
	A/A-G/A ^b	46 (63.0)	18 (62.1)	
	G/G	27 (37.0)	11 (37.9)	
	G/A-G/G ^c	58 (79.5)	26 (89.7)	
TLR9	A/A	15 (20.5)	3 (10.3)	0.48
	C/C ^a	26 (35.6)	14 (48.3)	
	C/T	33 (45.2)	10 (34.5)	
	T/T	14 (19.2)	5 (17.2)	
	C/C-C/T ^b	59 (80.8)	24 (82.8)	
TLR9	T/T	14 (19.2)	5 (17.2)	0.82
	C/T-T/T ^c	47 (64.4)	15 (51.7)	
	C/C			

CMV, Cytomegalovirus; CCR5, chemokine receptor 5; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; IL-10, interleukin-10; TLR-9, Toll-like receptor 9.

^aCo-dominant model of inheritance.

^bDominant model of inheritance.

^cRecessive model of inheritance.

^dFrequency comparisons were carried out using the χ^2 for categorical variables. Two-sided exact P values are reported. A P value < 0.05 was considered statistically significant.

recipient SNPs were investigated. The interest in assessing the effect of the patient's SNP genotype stems from several facts: (i) although CCR5 is expressed predominantly on T cells, macrophages, and dendritic cells, which are of donor origin, human colonic cells, which are a natural target of CMV in vivo, also appear to express abundantly this receptor on the apical surface [Dwinell et al., 1999]; (ii) MCP-1 is produced by many cell types in addition to monocytes (of donor origin), including endothelial, fibroblasts, and epithelial, smooth muscle cells, all of which are infected productively by CMV in vivo [Yoshimura and Leonard, 1991]; (iii) in addition to CD4⁺ T cells, normal bronchial and intestinal epithelial cells produce constitutively IL-10 [Moore et al., 2001]; and (iv) TLR-9 is expressed in a wide array of non-immune cell types [Lien and Ingalls, 2002]. Second, highly sensitive real-time PCRs were used in this study for surveillance of active CMV infection, whereas, although not stated explicitly, less sensitive methods, such as the pp65 antigenemia assay or qualitative or end-point

quantitative PCR assays might have been employed in a fraction of patients in the above studies.

Despite these differences, our data seem to support the conclusions of Loeffler et al. [2006] and Mezger et al. [2008] in that donor SNPs in CCR5, IL-10, and TLR-9 were not associated significantly with the rate of occurrence of active CMV infection. As for the SNP in MCP-1, Loeffler et al. [2006] found a marginally significant association ($P=0.021$). The more limited number of patients included in the current series, the use of more sensitive assays in this study to detect active CMV infection, or differences in the baseline characteristics of the patient cohorts (CD34⁺ cell selection in the above quoted studies) may account for this discrepancy.

Novel observations of the current study are as follows: (i) data against the existence of an association between the recipient SNP genotypes and the rate of incidence of active CMV infection are provided; (ii) no relationship was found between donor and recipient SNP genotypes and the need for preemptive antiviral therapy; and (ii) most importantly, patients carrying

TABLE IV. Duration of Plasma CMV DNAemia and Peak CMV DNA load in First Episodes of Active CMV Infection According to the Donor Single Nucleotide Polymorphism Genotype

Gene	Single Nucleotide Polymorphism	Duration (days)	<i>P</i> value ^d	CMV DNA peak load (copies/ml)	<i>P</i> value ^d		
CCR5	A/A ^a	46 (7–257)	0.02	1849 (77–917791)	0.062		
	A/G	33 (7–217)		801 (28–23076)			
	G/G	21 (4–36)		189 (20–4244)			
	A/A-A/G ^b	39 (7–257)		1230 (28–917791)			
	G/G	21 (4–36)		189 (20–4244)			
MCP1	A/G-G/G ^c	30 (4–217)	0.046	737 (20–23076)	0.046		
	A/A	46 (7–257)		1849 (77–917791)			
	C/C ^a	36 (4–217)		805 (20–29792)			
	C/T	42 (7–257)		2109 (28–917791)			
	T/T	28 (7–63)		797 (77–4828)			
IL-10	T/T-C/T ^b	37 (7–257)	0.96	1473 (28–917791)	0.30		
	C/C	36 (4–217)		805 (20–29792)			
	C/C-C/T ^c	38 (4–257)		1308 (20–917791)			
	T/T	28 (7–63)		797 (77–4828)			
	A/A ^a	64 (7–257)		0.23		135 (28–917791)	0.33
G/G	32,5 (4–217)	1296 (20–29792)					
A/A-G/A ^b	42 (8–102)	1460 (29–15224)					
G/G	35 (4–257)	797 (20–917791)					
G/A-G/G ^c	42 (8–102)	1460 (29–15224)					
TLR9	A/A	35 (4–217)	0.15	1308 (20–29792)	0.14		
	C/C ^a	26 (8–90)		0.27		481 (80–17777)	0.67
	C/T	38 (4–257)				1219 (20–917791)	
	T/T	39 (7–217)				1794 (29–29792)	
	C/C-C/T ^b	39 (7–217)				1794 (29–29792)	
T/T	35 (4–257)	1149 (20–917791)					
TLR9	C/T-T/T ^c	39 (7–217)	0.66	1794 (29–29792)	0.66		
	C/C	39 (4–257)		1447 (20–917791)			
	A/A ^a	26 (8–90)		481 (80–17777)			
	C/C	39 (4–257)		1447 (20–917791)			
	A/A ^a	26 (8–90)		481 (80–17777)			

CMV, Cytomegalovirus; CCR5, chemokine receptor 5; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; IL-10, interleukin-10; TLR-9, Toll-like receptor 9.

^aCo-dominant model of inheritance.

^bDominant model of inheritance.

^cRecessive model of inheritance.

^dFrequency comparisons were carried out using the χ^2 for categorical variables. Two-sided exact *P* values are reported. A *P* value < 0.05 was considered statistically significant.

the donor (but not the recipient) CCR5 A/A genotype displayed episodes of active CMV infection with a higher level of CMV replication (as judged by the peak CMV DNA load in plasma within episodes) that lasted longer than those observed in their A/G and G/G counterparts. This effect was not related to significant differences between comparative groups regarding their clinical and demographic characteristics, the method employed for plasma CMV DNA testing, the strategy of preemptive antiviral therapy guidance, the antiviral used for treatment, or the time frame in which the episodes occurred. Contrarily, donor and recipient SNPs in the MCP-1, IL-10, and TLR-9 genes had no impact on the dynamics of active CMV infection in this cohort.

Reminiscent of the above observation is that non-immunosuppressed critically ill patients harboring the CCR5 A/A SNP genotype develop episodes of active CMV infection in which CMV appears to replicate at a high level in the lower respiratory tract [Bravo et al., 2014a]. CCR5 mediates recruitment, activation, and differentiation of Th1 CD4⁺ and

functional CD8⁺ T cells [Alkhatib, 2009]. CCR5 deficiency, which is observed in individuals carrying the CCR5Δ32 homozygous mutation, protects against HIV [Samson et al., 1996; McDermott et al., 1998] and may provide protection against HBV persistence [Thio et al., 2007], but appears to enhance HCV replication in chronically infected individuals [Woitas et al., 2002]. Allogeneic stem cell transplant patients carrying the CCR5Δ32 deletion allele appear to display a significantly lower incidence of EBV reactivation early after transplantation (<100 days) than those harboring the wild-type genotype [Bogunia-Kubik et al., 2007].

The rs1800023 SNP is located in exon 2 (-2086) of the CCR5 gene, a site from which the majority of transcripts originate. rs1800023 is thus a promoter polymorphism in the proximal promoter of the gene [McDermott et al., 1998]. It is unknown whether this SNP affects the expression of functional CCR5 on the surface of immune or non-immune cells. Thus, it is simply speculative to postulate a mechanistic explanation for our findings. Nevertheless, suboptimal

TABLE V. Duration of Plasma CMV DNAemia and Peak CMV DNA Load in First Episodes of Active CMV Infection According to the Recipient Single Nucleotide Polymorphism Genotype

Gene	Single Nucleotide Polimorphism	Duration (days)	<i>P</i> value ^d	CMV DNA peak load (copies/mL)	<i>P</i> value ^d		
CCR5	A/A ^a	35 (7–257)	0.64	1230 (58–917791)	0.77		
	A/G	37 (4–217)		1003 (20–29792)			
	G/G	30 (11–90)		1139 (20–17777)			
	A/A-A/G ^b	37 (4–257)		1207 (20–917791)			
	G/G	30 (11–90)		1139 (20–17777)			
	A/G-G/G ^c	36 (4–217)		1033 (20–29792)			
MCP1	A/A	35 (7–257)	0.44	1230 (58–917791)	0.47		
	C/C ^a	36 (4–217)		1362 (20–35432)			
	C/T	41 (4–257)		676 (20–917791)			
	T/T	20 (7–39)		481 (77–4828)			
	T/T-C/T ^b	35 (4–257)		666 (20–917791)			
	C/C	36 (4–217)		1362 (20–35432)			
	C/C-C/T ^c	37 (4–257)		1242 (20–917791)			
	T/T	20 (7–39)		481 (77–4828)			
	A/A ^a	31 (7–94)		0.86		797 (58–7352)	0.37
	G/G	36 (4–217)				2109 (20–29792)	
IL-10-1	A/A-G/A ^b	37 (4–257)	0.99	858 (20–917791)	0.76		
	G/G	35 (4–217)		1423 (20–29792)			
	G/A-G/G ^c	37 (4–257)		858 (20–917791)			
	A/A	37 (4–257)		1242 (20–97791)			
		31 (7–94)		797 (58–7352)			
TLR9	C/C ^a	35 (4–124)	0.51	858 (20–17047)	0.88		
	C/T	30 (7–257)		1296 (20–917791)			
	T/T	40 (7–217)		1033 (38–23076)			
	C/C-C/T ^b	34 (4–257)		1230 (20–917791)			
	T/T	40 (7–217)		1033 (38–23076)			
	C/T-T/T ^c	36 (7–257)		1219 (20–917791)			
	C/C	35 (4–124)		858 (20–17047)			
	A/A ^a						

^aCo-dominant model of inheritance.

^bDominant model of inheritance.

^cRecessive model of inheritance.

^dComparisons between medians were performed by the Mann–Whitney T-test. Two-sided exact *P* values are reported. A *P* value < 0.05 was considered statistically significant.

expression of CCR5 on CMV-specific T cells would likely result in an impairment in trafficking of these cells to mucosa and parenchyma tissues, thereby facilitating local viral replication and dissemination to the systemic compartment, despite treatment with antiviral agents. Alternatively, increased expression of CCR5 would promote local inflammatory responses. In this context, a greater possibility of developing severe acute graft versus host disease was observed in allogeneic stem cell transplant recipients harboring the so-called donor CCR5 H1/H1 genotype (which includes the A/A genotype for the rs1800023 SNP) [McDermott et al., 2010]. In turn, inflammation is known to trigger CMV reactivation and promote CMV replication [Cook et al., 2006]. In this context, an investigation of the effect of the CCR5Δ32 deletion allele on the features of active CMV infection in this clinical setting might shed light on this issue.

The current study has two major limitations. The first is the relatively few number of patients included. Second, as in other studies of this type, it cannot be concluded firmly that the association observed is not attributable to closely linked variants in other genes.

In summary, the data presented suggest that the donor SNP rs1800023 in exon 2 of the CCR5 gene may modulate the dynamics of CMV replication in allogeneic stem cell transplant recipients. Further studies involving larger cohorts are required to prove the validity of this observation. If the data held true, they may help to improve current strategies in the prevention of CMV-related morbidity and mortality in allogeneic stem cell transplant patients.

REFERENCES

- Alkhatib G. 2009. The biology of CCR5 and CXCR4. *Curr Opin HIV AIDS* 4:96–103.
- Bogunia-Kubik K, Jaskula E, Lange A. 2007. The presence of functional CCR5 and EBV, reactivation after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transpl* 40:145–150.
- Bravo D, Clari MA, Aguilar G, Belda J, Giménez E, Carbonell JA, Henaó L, Navarro D. 2014. Looking for biological factors to predict the risk of active cytomegalovirus infection in non-immunosuppressed critically ill patients. *J Med Virol* 86:827–833.
- Bravo D, Solano C, Giménez E, Remigia MJ, Corrales I, Amat P, Navarro D. 2014. 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* 86:838–844.
- Clari MÁ, Bravo D, Costa E, Muñoz-Cobo B, Solano C, Remigia MJ, Giménez E, Benmarzouk-Hidalgo OJ, Pérez-Romero P, Navarro D. 2013. Comparison of the new Abbott Real Time CMV assay and the Abbott CMV PCR Kit for the quantitation of plasma cytomegalovirus DNAemia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 75:207–209.
- Cook CH, Trgovcich J, Zimmerman PD, Zhang Y, Sedmak DD. 2006. Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor alpha, or interleukin-1beta triggers reactivation of latent cytomegalovirus in immunocompetent mice. *J Virol* 80:9151–9158.
- Dwinell MB1, Eckmann L, Leopard JD, Varki NM, Kagnoff MF. 1999. Chemokine receptor expression by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 117:359–367.
- Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen EL, Qiu P, Bertelsen AH, Muir AJ, Sulkowski M, McHutchison JG, Goldstein DB. 2009. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 461:399–401.
- Lien E, Ingalls RR. 2002. Toll-like receptors. *Crit Care Med* 30:S1–11.
- Loeffler J, Steffens M, Arlt EM, Toliat MR, Mezger M, Suk A, Wienker TF, Hebart H, Nürnberg P, Boeckh M, Ljungman P, Trenschele R, Einsele H. 2006. 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* 44:1847–1850.
- Lui YY, Chik KW, Chiu RW, Ho CY, Lam CW, Lo YM. 2002. Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clin Chem* 48:421–427.
- McDermott DH, Conway SE, Wang T, Ricklefs SM, Agovi MA, Porcella SF, Tran HT, Milford E, Spellman S, Abdi R. 2010. Donor and recipient chemokine receptor CCR5 genotype is associated with survival after bone marrow transplantation. *Blood* 115:2311–2318.
- McDermott DH, Zimmerman PA, Guignard F, Kleeberger CA, Leitman SF, Murphy PH. 1998. CCR5 promoter polymorphism and HIV-1 disease progression. Multicenter AIDS Cohort Study (MACS). *Lancet* 352:866–870.
- Mezger M, Steffens M, Semmler C, Arlt EM, Zimmer K, Kristjansson GI, Wienker TF, Toliat MR, Kessler T, Einsele H, Loeffler J. 2008. Investigation of promoter variations in dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) (CD209) and their relevance for human cytomegalovirus reactivation and disease after allogeneic stem-cell transplantation. *Clin Microbiol Infect* 14:228–234.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19:683–765.
- Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, Saragosti S, Lapoumeroulie C, Cognaux J, Forceille C, Muyldermans G, Verhofstede C, Burtonboy G, Georges M, Imai T, Rana S, Yi Y, Smyth RJ, Collman RG, Doms RW, Vassart G, Parmentier M. 1996. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 382:722–725.
- Solano C, Navarro D. 2010. Clinical virology of cytomegalovirus infection following hematopoietic transplantation. *Future Virol* 5:111–124.
- Thio CL, Astemborski J, Bashirova A, Mosbrugger T, Greer S, Witt MD, Goedert JJ, Hilgartner M, Majeske A, O'Brien SJ, Thomas DL, Carrington M. 2007. Genetic protection against hepatitis B virus conferred by CCR5Delta32: Evidence that CCR5 contributes to viral persistence. *J Virol* 81:441445.
- Tormo N, Solano C, Benet I, Nieto J, de la Cámara R, López J, Garcia-Noblejas A, Muñoz-Cobo B, Costa E, Clari MA, Hernández-Boluda JC, Remigia MJ, Navarro D. 2011. Reconstitution of CMV pp65 and IE-1-specific IFN- γ CD8(+) and CD4(+) T-cell responses affording protection from CMV DNAemia following allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transpl* 46:1437–1443.
- Woitars RP, Ahlenstiel G, Iwan A, Rockstroh JK, Brackmann HH, Kupfer B, Matz B, Offergeld R, Sauerbruch T, Spengler U. 2002. Frequency of the HIV-protective CC chemokine receptor 5-Delta32/Delta32 genotype is increased in hepatitis C. *Gastroenterology* 122:1721–1728.
- Yoshimura T, Leonard EJ. 1991. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Adv Exp Med Biol* 305:47–56.

Association Between Individual and Combined SNPs in Genes Related to Innate Immunity and Incidence of CMV Infection in Seropositive Kidney Transplant Recipients

M. Fernández-Ruiz^{1,†}, I. Corrales^{2,†}, M. Arias³,
J. M. Campistol⁴, E. Giménez², J. Crespo⁵,
M. O. López-Oliva⁶, I. Beneyto⁷,
P. L. Martín-Moreno⁸, F. Llamas-Fuente⁹,
A. Gutiérrez¹⁰, T. García-Álvarez¹¹,
R. Guerra-Rodríguez¹², N. Calvo¹³,
A. Fernández-Rodríguez¹⁴,
J. M. Taberno-Romo¹⁵, M. D. Navarro¹⁶,
A. Ramos-Verde¹⁷, J. M. Aguado¹
and D. Navarro^{2,*} on behalf of the OPERA
Study Group[‡]

¹Unit of Infectious Diseases, Hospital Universitario 12 de Octubre, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

²Department of Microbiology, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

³Department of Nephrology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla (IFIMAV), Santander, Spain

⁴Department of Nephrology, Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

⁵Department of Nephrology, Hospital Universitario Doctor Peset, Valencia, Spain

⁶Department of Nephrology, Hospital Universitario La Paz, Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ), Madrid, Spain

⁷Department of Nephrology, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain

⁸Department of Nephrology, Clínica Universidad de Navarra, Pamplona, Spain

⁹Department of Nephrology, Hospital General Universitario, Albacete, Spain

¹⁰Department of Nephrology, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, Spain

¹¹Department of Nephrology, Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz, Spain

¹²Department of Nephrology, Hospital Universitario Insular de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

¹³Department of Nephrology, Hospital Clínico Universitario San Carlos, Madrid, Spain

¹⁴Department of Nephrology, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain

¹⁵Department of Nephrology, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain

¹⁶Department of Nephrology, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, Spain

¹⁷Department of Nephrology, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

*Corresponding author: David Navarro, david.navarro@uv.es

[†]Both authors contributed equally to this work.

[‡]A full listing of the members of the OPERA Study Group is provided in the Acknowledgments section.

This study was in part presented at the World Transplant Congress (WTC) 2014, San Francisco, CA (July 26–31, 2014).

In this study, we assessed the association between single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in seven candidate genes involved in orchestrating the immune response against cytomegalovirus (CMV) and the 12-month incidence of CMV infection in 315 CMV-seropositive kidney transplant (KT) recipients. Patients were managed either by antiviral prophylaxis or preemptive therapy. CMV infection occurred in 140 patients (44.4%), including 13 episodes of disease. After adjusting for various clinical covariates, patients harboring T-allele genotypes of interleukin-28B (*IL28B*) (rs12979860) SNP had lower incidence of CMV infection (adjusted hazard ratio [aHR]: 0.66; 95% confidence interval [CI]: 0.46–0.96; p-value = 0.029). In the analysis restricted to patients not receiving prophylaxis, carriers of the TT genotype of toll-like receptor 9 (*TLR9*) (rs5743836) SNP had lower incidence of infection (aHR: 0.61; 95% CI: 0.38–0.96; p-value = 0.035), whereas the GG genotype of dendritic cell-specific ICAM 3-grabbing nonintegrin (*DC-SIGN*) (rs735240) SNP exerted the opposite effect (aHR: 1.86; 95% CI: 1.18–2.94; p-value = 0.008). An independent association was found between the number of unfavorable SNP genotypes carried by the patient and the incidence of CMV infection. In conclusion, specific SNPs in *IL28B*, *TLR9* and *DC-SIGN* genes may play a role in modulating the susceptibility to CMV infection in CMV-seropositive KT recipients.

Abbreviations: Allo-SCT, allogeneic stem cell transplantation; ATG, antithymocyte globulin; CCR5, chemokine (C-C motif) receptor 5; CI, confidence interval;

Fernández-Ruiz et al

CMV, cytomegalovirus; D, donor; DC, dendritic cell; DC-SIGN, dendritic cell-specific ICAM 3-grabbing nonintegrin; eGFR, estimated glomerular filtration rate; HR, hazard ratio; HWE, Hardy-Weinberg equilibrium; ID, identification; IFN, interferon; IL, interleukin; IQR, interquartile range; KT, kidney transplantation; MBL, mannose-binding lectin; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; MDDC, monocyte-derived dendritic cell; MDRD, Modification of Diet in Renal Disease; OR, odds ratio; PCR, polymerase chain reaction; PD-1, programmed death-1; R, recipient; SD, standard deviation; SNP, single-nucleotide polymorphism; SOT, solid organ transplantation; TLR, toll-like receptor

Received 10 September 2014, revised 04 November 2014 and accepted for publication 08 November 2014

Introduction

Human cytomegalovirus (CMV) continues to be a leading cause of morbidity and mortality in solid organ transplant (SOT) recipients, particularly in those with no pre-existing CMV-specific immunity acquiring a primary infection (D+/R-) (1,2). CMV-seropositive recipients frequently develop episodes of CMV replication resulting either from viral reactivation or virus reinfection by a heterotypic strain transmitted by the allograft (1). The factors modulating the susceptibility to CMV infection in this intermediate-risk category have been incompletely characterized. Both the administration of antiviral prophylaxis and the inception of antiviral therapy upon detection of viremia (preemptive therapy) are currently deemed as effective preventive approaches for minimizing the incidence of CMV disease (3–5). This might explain the considerable heterogeneity across centers regarding CMV management strategies (4). Therefore, the precise delineation of clinical and biological factors predisposing to CMV-related morbidity would critically help to choose the optimal option on an individual basis.

An increasing body of experimental evidence suggests that single nucleotide polymorphisms (SNPs) in several genes involved in the activation or regulation of innate and adaptive immune responses may have an impact on the susceptibility to and clinical outcome of certain chronic viral infections (6). In the SOT setting, a number of SNPs in donor and/or recipient genes encoding pattern recognition molecules and receptors (mannose-binding lectin [MBL], ficolin-2, toll-like receptors [TLRs] 2 and 4), cytokines (interleukin [IL] 12, IL10, interferon [IFN]- γ , IFN- λ 3 or IL28B), and immune regulatory membrane-associated proteins (human programmed death-1 [PD-1]) have been linked with an increased risk of CMV infection, or with a higher incidence of CMV syndrome or tissue-invasive disease among different organ transplant populations (7–16). SNPs in other relevant immune-related genes, such as those encoding chemokine (C-C motif) receptor 5 (CCR5), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), IL10, TLR9, or dendritic cell-specific intercellular adhesion mole-

cule-3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN), have also been shown to exert an influence on either the risk of CMV infection or disease, or over the dynamics of CMV replication in the allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) setting and in critically ill patients (17–20).

To further explore the potential impact of SNPs in genes critically involved in eliciting virus-specific immune responses on the natural history of CMV in the SOT setting, we investigated the individual and combined effect of selected SNPs in *CCR5*, *MCP1*, *IL10*, *TLR2*, *TLR9*, *DC-SIGN* and *IL28B* genes (detailed in Table 1) on the risk of CMV infection in a prospective cohort of CMV-seropositive kidney transplant (KT) recipients.

Methods

Study population and design

The OPERA Study is a prospective, observational, cohort study performed between March 2011 and December 2012 at 25 Spanish transplant centers, as detailed elsewhere (21). In brief, eligibility criteria included adult patients that underwent single KT during the recruitment period and were CMV-seropositive at pre-transplant evaluation. The Clinical Research Ethics Committees of the participating centers approved the study protocol, and written informed consent was obtained at recruitment. Participants were enrolled at the time of transplantation and followed-up for 12 months, unless death or graft loss occurred earlier. A number of pre-transplant, perioperative and posttransplant variables were prospectively recorded by means of a standardized data collect forms. Both the choice and the implementation of the CMV prevention strategy were not uniform across participating centers, but rather based on local site protocols.

The occurrence of CMV disease observed in the clinical study (12-month cumulative incidence of 3.6%) was too low to assess the effect of SNPs in the analyzed genes on this outcome (21). Therefore, the 12-month cumulative incidence of laboratory-confirmed CMV infection (either asymptomatic infection or CMV disease) was selected as study outcome.

SNP analyses

Whole blood specimens that have been stored at -70°C were retrieved for the analyses described herein. DNA was extracted with the QIAamp DNA blood Mini QIAcube Kit (Qiagen, Valencia, CA) using the QIAcube extraction platform (Qiagen), following the instructions of the manufacturer. *IL10* (rs1878672), *CCR5* (rs1800023), *TLR2* (rs5743708), *TLR9* (rs5743836), *DC-SIGN* (rs735240), *MCP1* (rs13900) and *IL28B* (rs12979860) genotyping was performed at the Department of Microbiology of the Hospital Clínico Universitario de Valencia by validated pre-made TaqMan[®] assays (allele-specific real-time polymerase chain reaction [PCR] in an Applied Biosystem 7500 Real-Time PCR system-software, version 2.0.6 [Applied Biosystems, Foster City, CA]) and consensus primers (22,23). SNP and allele (genotype) calling was made by a standard end-point analysis with the aid of a commercial genotype-calling software (TaqMan[®] Genotyper Software version 1.0, Applied Biosystems). Twenty-five random individuals were genotyped in duplicate for each SNP to estimate the overall reproducibility. The error rate per reaction (i.e. number of genotypes that differed divided by the total number of comparisons made) was 0%, and thus the call rate was 100%. Selection of the above SNPs for the current study was made in an effort to replicate data from prior reports pointing to an association of these SNPs with either CMV infection, CMV disease or both in allo-SCT or SOT recipients (7,9,15,17–19,22,23). This paper was prepared in accordance with

SNPs and CMV Infection in R+ KT Recipients

Table 1: Description of the selected candidate SNPs for the present genetic association study

Gene	Encoded protein	Function	SNP ID number	Nucleotide substitution	Genotype distribution				Rationale (reference)
					European ¹	African American ²	Asian ³		
<i>IL10</i>	Interleukin 10 (human cytokine synthesis inhibitory factor)	Anti-inflammatory cytokine	rs1878672	C/G	CC: 21% CG: 52% GG: 27%	CC: 53% CG: 37% GG: 10%	CC: 91% CG: 9%		Association with CMV disease in allo-HSCT recipients (17)
<i>CCR5</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 5	Regulation of trafficking and effector functions of macrophages, immature DCs and memory/effector T cells	rs1800023	A/G	NA	NA	NA		Association with CMV infection and disease in allo-HSCT recipients (17,20,22)
<i>TLR2</i>	Toll-like receptor 2 (membrane-bound pattern recognition receptor)	Recognition of CMV envelope glycoproteins	rs5743708	A/G	AA: 11% GG: 89%	NA	GG: 100%		Association with CMV infection and disease in SOT recipients (7,15)
<i>TLR9</i>	Toll-like receptor 9 (endocytic pattern recognition receptor)	Recognition of unmethylated CpG motif-containing DNA	rs5743836	C/T	CT: 32% TT: 68%	NA	CT: 5%		Association with CMV infection in allo-HSCT recipients (28)
<i>DC-SIGN</i>	Dendritic cell-specific ICAM 3-grabbing nonintegrin (endocytic C-type lectin receptor)	Docking and internalization of CMV on monocyte-derived DCs	rs735240	A/G	AA: 20% AG: 51% GG: 29%	AA: 10% AG: 11% GG: 59%	AA: 2% AG: 49% GG: 49%		Association with CMV infection and disease in allo-HSCT recipients (18)
<i>MCP1</i>	Monocyte chemoattractant protein 1 (chemokine [C-C motif] ligand 2)	Recruitment of monocytes, DCs and memory T cells	rs13900	C/T	CC: 45% CT: 40% TT: 5%	CC: 57% CT: 39% TT: 4%	CC: 14% CT: 56% TT: 30%		Association with CMV infection in allo-HSCT recipients (17)
<i>IL28B</i>	Interleukin 28B (interferon-λ3)	Antiviral cytokine	rs12979860	C/T	CC: 48% CT: 41% TT: 11%	NA	CC: 93% CT: 7%		Association with CMV infection in allo-HSCT (23) and SOT recipients (16)

Allo-HSCT, allogeneic stem-cell transplantation; CMV, cytomegalovirus; CCR5, chemokine (C-C motif) receptor 5; DC, dendritic cell; DC-SIGN, dendritic cell-specific ICAM 3-grabbing nonintegrin; ID, identification; IL, interleukin; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; NA, not available; SNP, single-nucleotide polymorphism; SOT, solid-organ transplantation; TLR, toll-like receptor.

¹Utah residents from Northern and Western European ancestry (phase I and II HapMap population).

²Southwest US residents from African ancestry (phase III HapMap population).

³Han Chinese (phase I and II HapMap population).

Fernández-Ruiz et al

the methodological recommendations drawn by the “Strengthening the Reporting of Genetic Association studies” initiative (24).

Definitions

Asymptomatic CMV infection was defined by the laboratory confirmation of CMV replication by pp65 antigenemia or PCR-based assay in the absence of attributable symptoms. We deemed as significant any antigenemia value and/or any CMV DNAemia level irrespective of the threshold established in each institution for initiating therapy. Episodes separated by both a minimum 2 week-interval and at least one negative specimen were considered as different episodes. *CMV disease* was defined as viral syndrome or end-organ disease (25). *Antiviral prophylaxis* was defined as the administration of a course of ganciclovir or valganciclovir within the first 3 weeks after transplantation, irrespective of its planned duration. The remaining patients were assumed to have been managed by preemptive therapy, unless the local researcher at each participating center explicitly reported that no specific preventive intervention was applied. Other definitions used in the study (26,27) are detailed as Supporting Information.

Statistical analysis

Quantitative data were shown as the mean \pm standard deviation (SD) or the median with interquartile range (IQR). Qualitative variables were expressed as absolute and relative frequencies. Pairwise linkage disequilibrium was tested with the SNP Annotation and Proxy Search (SNAP) online tool (<http://www.broad.mit.edu/mpg/snap>) by using the genotype data from the European population panel (CEU) of the 1000 Genomes Pilot 1 Project. Deviation from the Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) for each SNP was evaluated by a χ^2 test with one degree of freedom. Comparisons of 12-month cumulative incidence of CMV infection in patients with different genotypes for SNPs included in our study were performed by χ^2 or Fisher’s exact tests, as appropriate. Further pairwise comparisons were conducted between different SNP genotype groups, either individually or in combination. Survival probabilities were estimated by the Kaplan–Meier method with CMV infection as event, and differences between groups were compared by the log-rank test. Multivariate Cox regression models (enter method) were used to evaluate the association between the selected SNPs and CMV infection, with results expressed as hazard ratios (HRs) with 95% confidence intervals (CIs). We performed a haplotype analysis by creating a score based on those SNPs found to exert an independent impact on the outcome (a point was added for each unfavorable genotype carried by the patient). All analyses were stratified according to whether antiviral prophylaxis was used as CMV prevention strategy. For this purpose, patients not receiving any specific intervention were jointly analyzed with those managed by preemptive therapy. In addition, we performed a number of sensitivity analyses restricted to those patients with an appropriate monitoring schedule for CMV infection (≥ 3 monitoring points throughout the first 6 months after transplantation). All the significance tests were two-tailed and considered as significant at a p -value < 0.05 . The Bonferroni correction method (the α value for each comparison equal to the fixed α value divided by the total number of comparisons) was applied to avoid the possible inflation of p -values owing to multiple comparisons. Statistical analysis was performed using SPSS version 15.0 (Statistical Package for Social Sciences, Chicago, IL).

Results

Study population and follow-up

Out of the 387 patients originally included in the OPERA Study, 315 (81.4%) had a whole blood sample available for genotyping. The demographics and clinical characteristics of this population are detailed in Table 2. There were no

Table 2: Demographics and clinical characteristics of the overall study cohort (n = 315)

Variable		
Recipient age, years (mean \pm SD)	53.7 \pm 11.8	
Recipient gender (male)	181	(57.5)
Ethnicity (n [%])		
Caucasian	293	(93.0)
African	19	(6.0)
Asian	3	(1.0)
Body mass index at transplantation, Kg/m ² (mean \pm SD)	26.1 \pm 4.6	
Etiology of underlying ESRD (n [%])		
Glomerulonephritis	88	(27.9)
Diabetic nephropathy	28	(8.9)
Nephroangiosclerosis	30	(9.5)
Polycystic renal disease	53	(16.8)
Chronic interstitial nephropathy	30	(9.5)
Congenital nephropathy	5	(1.6)
Systemic vasculitis	5	(1.6)
Unknown	59	(18.7)
Others	17	(5.4)
Pre-transplant renal replacement therapy (n [%])	278	(90.3)
Type of therapy (n [%]) ¹		
Hemodialysis	196	(80.3)
Continuous ambulatory peritoneal dialysis	48	(19.7)
Dialysis vintage, years (median [IQR])	2.4	(1.1–3.8)
Previous kidney transplantation (n [%])	24	(7.6)
Donor age, years (mean \pm SD)	55.4 \pm 14.2	
Type of donor (n [%])		
DBD donor	252	(80.0)
CDC donor	21	(6.7)
Living donor	42	(13.3)
Donor cause of death (n [%]) ²		
Cerebrovascular accident	170	(66.7)
Head trauma	38	(14.9)
Anoxia	23	(9.0)
Other	24	(9.4)
Baseline immunological risk (n [%]) ³		
Peak PRA $> 10\%$	29	(11.1)
HLA mismatches, number (median [IQR])	4	(3–5)
Donor and recipient CMV serostatus (n [%])		
D+/R+	258	(81.9)
D–/R+	46	(14.6)
R+ (donor serostatus unknown)	11	(3.5)
Recipient serostatus (other than CMV)		
Hepatitis C virus positive	12	(3.8)
Hepatitis B virus (HBsAg) positive	3	(1.0)
Human immunodeficiency virus positive	2	(0.6)
Cold ischemia time, hours (mean \pm SD) ⁴	13.3 \pm 7.3	

CMV, cytomegalovirus; D, donor; DBD, donation after brain death; DCD, donation after circulatory death; ESRD, end-stage renal disease; HLA, human leukocyte antigen; IQR, interquartile range; PRA, panel reactive antibody; R, recipient; SD, standard deviation.

¹Data available for 244 patients.

²Data available for 255 patients.

³Data available for 262 patients.

⁴Data available for 283 patients.

SNPs and CMV Infection in R+ KT Recipients

significant differences regarding baseline characteristics or immunosuppressive regimen between patients with SNPs analysis and those from whom no specimens could be obtained (data not shown).

Table 3 depicts data on immunosuppression, CMV prevention strategies and posttransplant outcomes. Overall, 313 patients (99.4%) has at least one monitoring point throughout the posttransplant period (median of 7 points per patient), and 276 (87.6%) had ≥ 3 points during the first 6 months. With regard to the CMV prevention strategy, 164 patients (52.1%) were managed by preemptive therapy, 146 (46.3%) were given antiviral prophylaxis and 5 (1.6%) did not receive any specific intervention. Out of 164 patients managed by the preemptive approach, 34 (20.7%) actually received antiviral therapy for asymptomatic CMV infection. The median follow-up period was 364.8 days

Table 3: Immunosuppressive regimens and posttransplant adverse events (12-month cumulative incidence)

Variable		
Induction therapy (n [%])		
Basiliximab	130	(41.3)
Antithymocyte globulin	76	(24.1)
Antilymphocyte globulin	2	(0.6)
None	107	(34.0)
Immunosuppressive regimen at day 14 (n [%])		
Steroids	302	(95.9)
Tacrolimus	287	(91.1)
Cyclosporine	7	(2.2)
Mycophenolate mofetil/mycophenolic acid	276	(87.6)
mTOR inhibitors	8	(2.5)
CMV prevention strategy (n [%])		
Preemptive therapy	164	(52.1)
Antiviral prophylaxis	146	(46.3)
Duration of prophylaxis, days (median [IQR])	91	(75.8–99)
None	5	(1.6)
CMV monitoring method (n [%])		
PCR-based assay alone	177	(56.2)
pp65 antigenemia alone	69	(21.9)
PCR and pp65 antigenemia	69	(21.9)
Delayed graft function (n [%]) ¹	65	(23.6)
CMV infection (n [%])	140	(44.4)
CMV asymptomatic infection ²	129	(40.9)
CMV disease ³	12	(3.8)
Viral syndrome	5	
End-organ invasive disease	7	
Colitis	6	
Retinitis	1	
Infection other than CMV (n [%])	82	(26.0)
BPAR (n [%])	40	(12.7)
Graft loss (n [%])	3	(1.0)
All-cause mortality (n [%])	0	(0.0)

BPAR, biopsy-proven acute rejection; CMV, cytomegalovirus; IQR, interquartile range; mTOR, mammalian target of rapamycin; PCR, polymerase chain reaction; SD, standard deviation.

¹Data available in 276 patients.

²One patient had both CMV asymptomatic infection and CMV disease at different time points.

(IQR: 357–375). Three patients (1.0%) suffered from graft loss after a median interval from transplantation of 275 days.

Incidence of CMV infection and disease

One hundred and forty patients had a total of 174 distinct episodes of CMV infection (cumulative incidence of 44.4%). Overall, CMV infection occurred more frequently among patients not given prophylaxis (51.5% [87/169] versus 36.3% [53/146]; p-value=0.007). Seven out of 68 episodes (10.3%) of CMV infection occurring within the prophylaxis group were diagnosed while the patient was still on antiviral prophylaxis (breakthrough infection). Thirteen episodes of CMV disease were diagnosed in 12 patients (cumulative incidence of 3.8%), with a median interval between transplantation and the first episode of 84.7 days (IQR: 29.2–116.7). None of these episodes were associated to directly attributable graft loss or patient death.

Effect of SNPs on the incidence of CMV infection

All samples were successfully genotyped. The genotypic frequencies of SNPs for the overall cohort are shown in Table 4. The observed genotype frequency distribution did not significantly deviate from the expected counts according to the HWE for all SNPs except for those located in *IL10*, *CCR5* and *TLR2* genes (Table S1). No linkage disequilibrium was found for any pair of SNPs. There were no significant

Table 4: Frequencies of genotypes of candidate SNPs in the overall study cohort

Gene (SNP database ID number)	Genotype	N	(%)
<i>IL10</i> (rs1878672)	CC	69	(21.9)
	CG	133	(42.2)
	GG	113	(35.9)
<i>CCR5</i> (rs1800023)	AA	134	(42.5)
	AG	130	(41.3)
<i>TLR2</i> (rs5743708)	GG	51	(16.2)
	AA	11	(3.5)
<i>TLR9</i> (rs5743836)	AG	2	(0.6)
	GG	302	(95.9)
	CC	8	(2.5)
<i>DC-SIGN</i> (rs735240)	CT	81	(25.7)
	TT	226	(71.7)
	AA	61	(19.4)
<i>MCP1</i> (rs13900)	AG	137	(43.5)
	GG	117	(37.1)
	CC	180	(57.1)
<i>IL28B</i> (rs12979860)	CT	118	(37.5)
	TT	17	(5.4)
	CC	152	(48.3)
	CT	143	(45.4)
	TT	20	(6.3)

CCR5, chemokine (C-C motif) receptor 5; DC-SIGN, dendritic cell-specific ICAM 3-grabbing nonintegrin; ID, identification; IL, interleukin; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; SNP, single-nucleotide polymorphism; TLR, toll-like receptor.

Fernández-Ruiz et al

differences in use of T cell depleting polyclonal antibodies as induction therapy across the different genotype groups, or in the method used for monitoring of CMV replication (PCR-based assay or pp65 antigenemia) (all p-values >0.05 [remaining data not shown]).

First, an exploratory analysis was performed by comparing the 12-month cumulative incidence of CMV infection among the different genotypic combinations for each SNP in the overall cohort. As antiviral prophylaxis blunts CMV replication at tissues and mucosal sites and thus decreases the risk of systemic CMV infection, a separated analysis was conducted exclusively considering those patients who did not receive antiviral prophylaxis. There were no significant differences in any of the SNPs subjected to analysis (after Bonferroni correction the p-value deemed to be significant had to be <0.003) (Table 5). Nevertheless, pairwise comparative analyses between the different genotype groups for each SNP allowed us to identify a clear trend towards a lower incidence of CMV infection in patients with A-allele genotypes of *TLR2* (rs5743708) (AA or AG) (p-value = 0.031) and T-allele genotypes of *IL28B* (rs12979860) (CT or TT) (p-value = 0.091) as compared to those carrying the homozygous major allele genotypes (GG and CC, respectively) when the overall cohort was considered for analysis. In the analysis restricted to the group of patients that did not receive antiviral prophylaxis, we also found a

trend towards a lower incidence of infection among those carrying the T allele of *TLR9* (rs5743836) SNP in homozygosis (TT) (p-value = 0.038), as well as among those harboring the A allele of *DC-SIGN* (rs735240) SNP in homozygosis or heterozygosis (AA or AG) (p-value = 0.076), as detailed in Table 6.

Impact of selected SNPs on CMV infection-free survival

The CMV infection-free survival curves for the different SNP genotype groups are depicted in Figure 1. Patients harboring the A allele (AA or AG) of *TLR2* (rs5743708) SNP appeared to be less susceptible to CMV infection than their GG counterparts (12-month CMV-infection free survival rates: 85% versus 53%; log-rank test p-value = 0.048), whereas a near significant trend was observed for those with a minor-allele genotype (CT/TT) of *IL28B* (rs12979860) SNP (12-month CMV-infection free survival rates: 60% versus 49%; log-rank test p-value = 0.072). Subgroup analyses restricted to patients who did not receive antiviral prophylaxis are showed in Figure 2. CMV infection-free survival rates at 12 months were higher among patients harboring the TT genotype of *TLR9* (rs5743836) SNP (54% vs. 37%; log-rank test p-value = 0.033) and among those harboring the AA/AG genotypes of *DC-SIGN* (rs735240) SNP (54% vs. 40%; log-rank test p-value = 0.037).

Table 5: Cumulative incidence of CMV infection according to candidate SNPs

Gene (SNP database ID number)	Genotype	12-month cumulative incidence of CMV infection					
		Overall cohort			No antiviral prophylaxis		
		Yes (n = 140)	No (n = 175)	p-Value	Yes (n = 87)	No (n = 82)	p-Value
<i>IL10</i> (rs1878672)	CC	30 (21.4)	39 (22.3)	0.910	14 (16.1)	20 (24.4)	0.281
	CG	61 (43.6)	72 (41.1)		37 (42.5)	36 (43.9)	
	GG	49 (35.0)	64 (36.6)		36 (41.4)	26 (31.7)	
<i>CCR5</i> (rs1800023)	AA	58 (41.4)	76 (43.4)	0.250	37 (42.5)	39 (47.6)	0.251
	AG	54 (38.6)	76 (43.4)		31 (35.6)	33 (40.2)	
	GG	28 (20.0)	23 (13.1)		19 (21.8)	10 (12.2)	
<i>TLR2</i> (rs5743708)	AA	1 (0.7)	10 (5.7)	0.055	0 (0.0)	1 (1.2)	0.342
	AG	1 (0.7)	1 (0.6)		0 (0.0)	1 (1.2)	
	GG	138 (98.6)	164 (93.7)		87 (100.0)	80 (97.6)	
<i>TLR9</i> (rs5743836)	CC	3 (2.1)	5 (2.9)	0.288	3 (3.4)	2 (2.4)	0.114
	CT	42 (30.0)	39 (22.3)		30 (34.5)	17 (20.7)	
	TT	95 (67.9)	131 (74.9)		54 (62.1)	63 (76.8)	
<i>DC-SIGN</i> (rs735240)	AA	24 (17.1)	37 (21.1)	0.543	13 (14.9)	18 (22.0)	0.177
	AG	60 (42.9)	77 (44.0)		36 (41.4)	39 (47.6)	
	GG	56 (40.0)	61 (34.9)		38 (43.7)	25 (30.5)	
<i>MCP1</i> (rs13900)	CC	83 (59.3)	97 (55.4)	0.250	52 (59.8)	48 (58.5)	0.663
	CT	53 (37.9)	65 (37.1)		33 (37.9)	30 (36.6)	
	TT	4 (2.9)	13 (7.4)		2 (2.3)	4 (4.9)	
<i>IL28B</i> (rs12979860)	CC	75 (53.6)	77 (44.0)	0.153	48 (55.2)	39 (47.6)	0.347
	CT	59 (42.1)	84 (48.0)		35 (40.2)	35 (42.7)	
	TT	6 (4.3)	14 (8.0)		4 (4.6)	8 (9.8)	

CCR5, chemokine (C-C motif) receptor 5; CMV, cytomegalovirus; DC-SIGN, dendritic cell-specific ICAM 3-grabbing nonintegrin; ID, identification; IL, interleukin; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; SNP, single-nucleotide polymorphism; TLR, toll-like receptor.

SNPs and CMV Infection in R+ KT Recipients

Table 6: Analyses of different combinations of genotype groups for SNPs in selected candidate genes

Gene (SNP database ID number)	Genotype	12-month cumulative incidence of CMV infection									
		Overall cohort			No antiviral prophylaxis						
		Yes (n = 140)	No (n = 175)	p-Value	Yes (n = 87)	No (n = 82)	p-Value				
<i>TLR2</i> (rs5743708)	AA	1 (50.0)	10 (90.9)	0.295	0 (0.0)	1 (50.0)	-				
	AG	1 (50.0)	1 (9.1)		0 (0.0)	1 (50.0)					
	AA	1 (0.7)	10 (5.7)	0.014	0 (0.0)	1 (1.2)		0.482			
	GG	138 (99.3)	164 (94.3)		87 (100.0)	80 (98.8)					
	AG	1 (0.7)	1 (0.6)	0.706	0 (0.0)	1 (1.2)			0.482		
	GG	138 (99.3)	164 (99.4)		87 (100.0)	80 (98.8)					
	AA/AG	2 (1.4)	11 (6.3)	0.031	0 (0.0)	2 (2.4)				0.234	
	GG	138 (98.6)	164 (93.7)		87 (100.0)	80 (97.6)					
	AG/GG	139 (99.3)	165 (94.3)	0.014	87 (100.0)	81 (98.8)					0.485
	AA	1 (0.7)	10 (5.7)		0 (0.0)	1 (1.2)					
<i>TLR9</i> (rs5743836)	CC	3 (6.7)	5 (11.4)	0.344	3 (9.1)	2 (10.5)	0.610				
	CT	42 (93.3)	39 (88.6)		30 (90.9)	17 (89.5)					
	CC	3 (3.1)	5 (3.7)	0.551	3 (5.3)	2 (3.1)		0.543			
	TT	95 (96.9)	131 (96.3)		54 (94.7)	63 (96.9)					
	CT	42 (30.7)	39 (22.9)	0.127	30 (35.7)	17 (21.2)			0.041		
	TT	95 (69.3)	131 (77.1)		54 (64.3)	63 (78.8)					
	CC/CT	45 (32.1)	44 (25.1)	0.170	33 (37.9)	19 (23.2)				0.038	
	TT	95 (67.9)	131 (74.9)		54 (62.1)	63 (76.8)					
	CT/TT	137 (97.9)	170 (97.1)	0.689	84 (96.6)	80 (97.6)					0.528
	CC	3 (2.1)	5 (2.9)		3 (3.4)	2 (2.4)					
<i>DC-SIGN</i> (rs735240)	AA	24 (28.6)	37 (32.5)	0.558	13 (26.5)	18 (31.6)	0.569				
	AG	60 (71.4)	77 (67.5)		36 (73.5)	39 (68.4)					
	AA	24 (30.0)	37 (37.8)	0.278	13 (25.5)	18 (41.9)		0.093			
	GG	56 (70.0)	61 (62.2)		38 (74.5)	25 (58.1)					
	AG	60 (51.7)	77 (55.8)	0.517	36 (48.6)	39 (60.9)			0.148		
	GG	56 (48.3)	61 (44.2)		38 (51.4)	25 (39.1)					
	AA/AG	84 (60.0)	114 (65.1)	0.348	49 (56.3)	57 (69.5)				0.076	
	GG	56 (40.0)	61 (34.9)		38 (43.7)	25 (30.5)					
	AG/GG	116 (82.9)	138 (78.9)	0.372	74 (85.1)	64 (78.0)					0.239
	AA	24 (17.1)	37 (21.1)		13 (14.9)	18 (22.0)					
<i>IL28B</i> (rs12979860)	CC	75 (56.0)	77 (47.8)	0.163	48 (57.8)	39 (52.7)	0.519				
	CT	59 (44.0)	84 (52.2)		35 (42.2)	35 (47.3)					
	CC	75 (92.6)	77 (84.6)	0.103	48 (92.3)	39 (83.0)		0.156			
	TT	6 (7.4)	14 (15.4)		4 (7.7)	8 (17.0)					
	CT	59 (90.8)	84 (85.7)	0.355	35 (89.7)	35 (81.4)			0.285		
	TT	6 (9.2)	14 (14.3)		4 (10.3)	8 (18.6)					
	CC/CT	134 (95.7)	161 (92.0)	0.179	83 (95.4)	74 (90.2)				0.192	
	TT	6 (4.3)	14 (8.0)		4 (4.6)	8 (9.8)					
	CT/TT	65 (46.4)	98 (56.0)	0.091	39 (44.8)	43 (52.4)					0.322
	CC	75 (53.6)	77 (44.0)		48 (55.2)	39 (47.6)					

CMV, cytomegalovirus; DC-SIGN, dendritic cell-specific ICAM 3-grabbing nonintegrin; ID, identification; IL, interleukin; SNP, single-nucleotide polymorphism; TLR, toll-like receptor.

Multivariate analysis of risk factors for CMV infection

We tested the impact of SNPs in each of the selected genes by means of different multivariate Cox regression models adjusted for those covariates found to be relevant in the univariate analysis (Table 7). After controlling for recipient and donor age, donor CMV serostatus, receipt of antiviral prophylaxis and estimated glomerular filtration rate (eGFR) at month 1, we found a near significant impact of the TT genotype of *TLR9*(rs5743836) SNP (HR: 0.70; 95% CI: 0.49–1.02; p-value=0.061) and of the minor-allele genotypes

(CT/TT) of *IL28B* (rs12979860) SNP (HR: 0.73; 95% CI: 0.51–1.04; p-value = 0.080). Of note, the protective effect of the minor-allele genotypes of *IL28B* achieved statistical significance when the analysis was restricted to those patients with ≥ 3 monitoring points for CMV infection during the first 6 months (HR: 0.66; 95% CI: 0.46–0.96; p-value = 0.029) (Table S2). All these associations remained in a sensitivity analysis restricted to patients of Caucasian ethnicity (Table S3). The low number of participants from other ethnic backgrounds prevented further population stratification.

Fernández-Ruiz et al

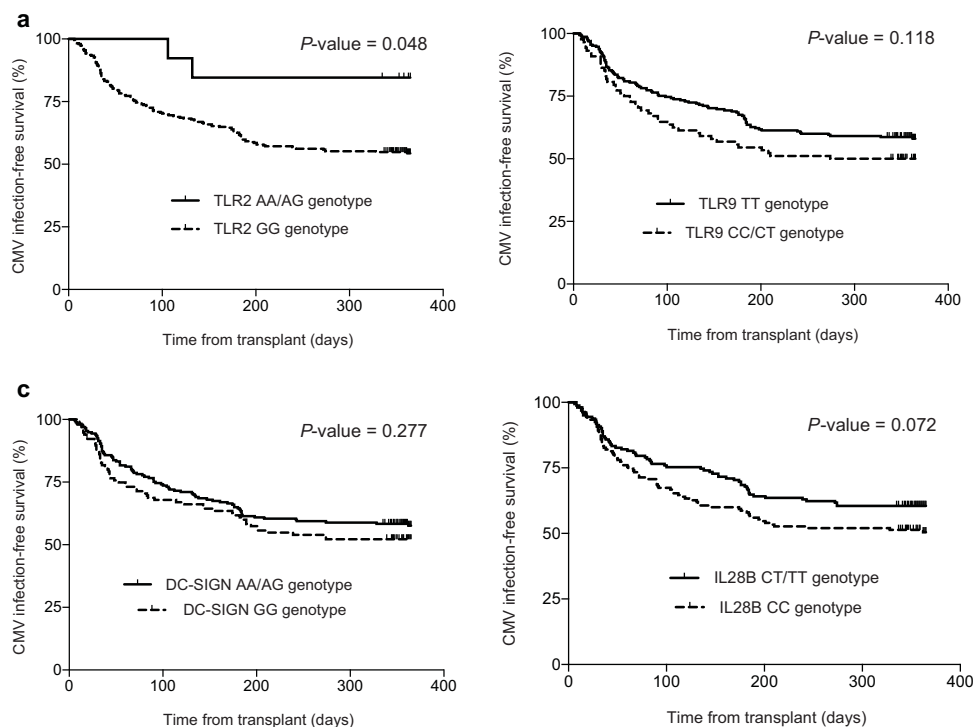


Figure 1: Kaplan–Meier CMV infection-free survival curves (with follow-up truncated at 12 months) according to the genotype of selected SNPs in the overall cohort: (a) *TLR2* (rs5743708); (b) *TLR9* (rs5743836); (c) *DC-SIGN* (rs735240); and (d) *IL28B* (rs12979860).

In a second set of Cox models limited to patients not receiving antiviral prophylaxis, both the TT genotype of *TLR9* (rs5743836) SNP (HR: 0.61; 95% CI: 0.38–0.96; p-value = 0.035) and the GG genotype of *DC-SIGN* (rs735240) SNP (HR: 1.86; 95% CI: 1.18–2.94; p-value = 0.008) maintained their independent effect on the outcome (Table 7). These results were essentially unchanged in a sensitivity analysis restricted to patients with ≥ 3 monitoring points for CMV infection throughout the first 6 months after transplantation (Table S2).

Next, we evaluated the potentially combined effect of the unfavorable genotypes of these SNPs on the risk of CMV infection. Patients were classified into five distinct haplotypes on the basis of the number of unfavorable SNP genotypes present (no unfavorable genotypes [3 patients, 1.0%], one [74, 23.5%], two [142, 45.1%], three [82, 26.0%] and four [14, 4.4%]). Because of the low number of patients

in the extreme groups, the scale was collapsed into three categories (patients with 0–1, 2 or 3–4 unfavorable genotypes). We observed a direct relationship between the number of unfavorable genotypes and the risk of CMV infection (i.e. the more unfavorable genotypes carried by the patient, the lower CMV-infection free survival), which remained significant after adjusting for other clinical variables (HRs in the overall cohort: 2.29 [95% CI: 1.37–3.82; p-value = 0.002] and 2.36 [95% CI: 1.38–4.03; p-value = 0.002] for the presence of 2 and 3–4 unfavorable genotypes, respectively) (Table 8). Finally, we further analyzed the impact of specific genotype combinations of selected SNPs. Patients harboring a combination of favorable genotypes in *IL28B* and *TLR9* genes had a lower incidence of CMV infection, both in the overall cohort (HR: 0.65; 95% CI: 0.45–0.95; p-value = 0.027) and in the group not receiving antiviral prophylaxis (HR: 0.60; 95% CI: 0.36–0.99; p-value = 0.046) (Table S4).

SNPs and CMV Infection in R+ KT Recipients

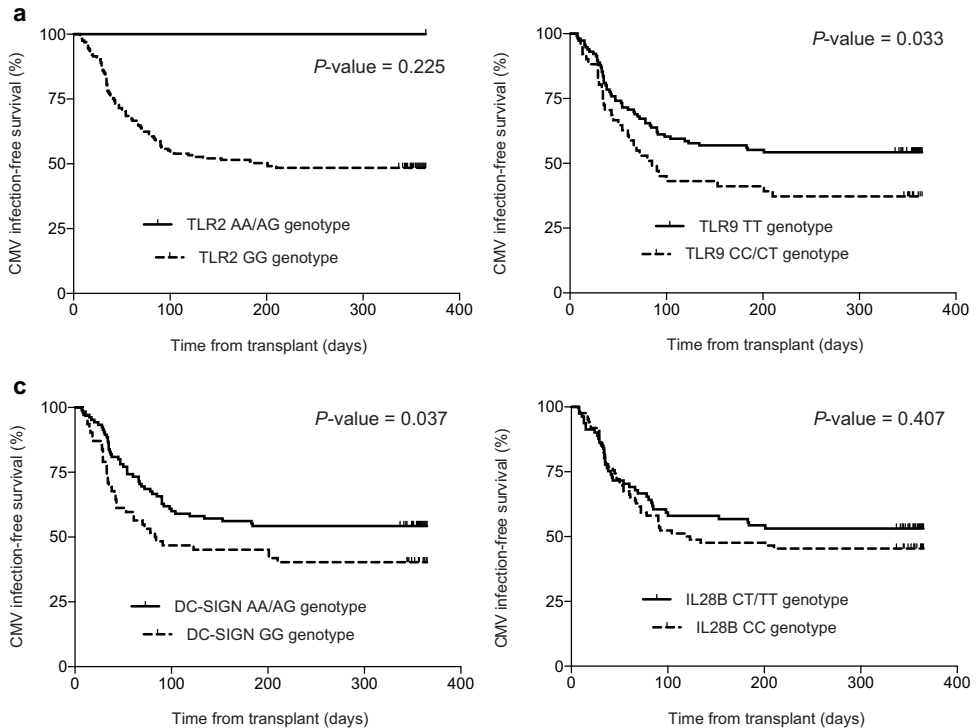


Figure 2: Kaplan–Meier CMV infection-free survival curves (with follow-up truncated at 12 months) according to the genotype of selected SNPs in patients not receiving antiviral prophylaxis: (a) *TLR2* (rs5743708); (b) *TLR9* (rs5743836); (c) *DC-SIGN* (rs735240); and (d) *IL28B* (rs12979860).

Discussion

The current study was aimed at investigating the potential association between several SNPs mapping within a number of genes involved in different activating and regulatory immunological pathways and the 12-month cumulative incidence of laboratory-confirmed CMV infection in a cohort of CMV-seropositive KT recipients. Three novel observations arose from our analyses. Firstly, we described for the first time an association between the SNP (rs5743836) located within the promoter region of the *TLR9* gene (28) and the incidence of CMV infection in seropositive KT recipients. In line with our finding, several SNPs in the coding region of the *TLR9* gene have been recently showed to modulate the risk of CMV infection in the allo-SCT setting (29). In our cohort, patients harboring the T allele in homozygosis displayed substantially higher CMV infection-free survival rates than their CT/CC counterparts, with this effect reaching statistical significance in those not

receiving antiviral prophylaxis. The blunting effect of prophylaxis on CMV replication, that dramatically restricts the possibility of detection of CMV DNA in blood, might account for this latter observation. Furthermore, the *TLR9* TT genotype was independently associated with a lower risk of CMV infection in multivariable Cox models. The mechanistic explanation for this biological effect is not straightforward. *TLR9* activates the innate immune system upon recognition of unmethylated CpG DNA motifs, which are relatively common within viral DNAs (30). *TLR9* is expressed mostly in cells of the immune system such as dendritic cells (DCs), B cells, monocytes, neutrophils and natural killer (NK) cells. *TLR9*-driven signals have a critical role in initiating pro-inflammatory responses and promoting the development of functional CD4⁺ Th1 immune responses (28,31). The C allele of rs5743836 introduces a new IL6-dependent transcription factor binding site in the *TLR9* promoter, thus *TLR9* signaling is amplified by a positive feedback loop through IL6 in carriers of the TC

Fernández-Ruiz et al

Table 7: Different multivariate Cox regression models assessing the impact of selected SNPs on CMV infection-free survival

	Overall cohort (n = 315)			No antiviral prophylaxis (n = 169)		
	aHR ¹	95% CI	p-Value	aHR ²	95% CI	p-Value
GG genotype of <i>TLR2</i> (rs5743708) SNP (vs. AA/AG)	2.78	0.68–11.39	0.154	— ³	—	—
TT genotype of <i>TLR9</i> (rs5743836) SNP (vs. CC/CT)	0.70	0.49–1.02	0.061	0.61	0.38–0.96	0.035
GG genotype of <i>DC-SIGN</i> (rs735240) SNP (vs. AA/AG)	1.29	0.90–1.86	0.158	1.86	1.18–2.94	0.008
CT/TT genotype of <i>IL28B</i> (rs12979860) SNP (vs. CC)	0.73	0.51–1.04	0.080	0.77	0.49–1.22	0.263

aHR, adjusted hazard ratio; CI, confidence interval; CMV, cytomegalovirus; DC-SIGN, dendritic cell-specific ICAM 3-grabbing nonintegrin; ID, identification; IL, interleukin; SNP, single-nucleotide polymorphism; TLR, toll-like receptor.

¹Model adjusted for recipient and donor age, donor CMV serostatus, receipt of antiviral prophylaxis and graft function (eGFR) at month 1.

²Model adjusted for recipient age, donor CMV serostatus and graft function (eGFR) at month 1.

³The HR was not estimable since all cases of CMV infection occurred in patients with the wild-type GG genotype.

genotype (versus TT), resulting in an increased production of pro-inflammatory cytokines (28). Therefore, although speculative, the possibility that patients carrying the TT genotype generate weaker inflammatory responses through TLR9 signaling—and are in turn less prone to reactivate latent CMV infection—seems to be reasonable, particularly in light of the well known effect of pro-inflammatory environments in promoting CMV reactivation and in perpetuating replication at tissue and mucosal sites (32,33).

Secondly, the A allele in the *DC-SIGN* SNP appeared to provide protection against CMV infection. This effect was more pronounced in patients not receiving prophylaxis—even after adjusting for other clinical variables into the multivariate model—although the same trend was also noted in the overall cohort. A similar effect has been observed in the allo-SCT setting (18). *DC-SIGN* displays a critical role in the docking of CMV on monocyte-derived DCs (MDDCs) (34). The *DC-SIGN*/CMV interaction renders DC fully permissive for CMV replication (35). Healthy individuals who are AA for rs735240 (and are simultaneously CC for the rs2287886 SNP) showed significantly higher *DC-SIGN* expression levels than individuals with TT/GG SNP genotypes (18), and the efficiency of infection of DC appears to correlate with the level of *DC-SIGN* expres-

sion (36). Thus, the potential protective effect associated with the A allele in our cohort would not be explained by this apparently increased efficiency of viral infection of DCs. Our data, nevertheless, could be better understood in view of a recent observation indicating that pathogens triggering *DC-SIGN* on human DCs activate the serine and threonine kinase Raf-1, eventually leading to both prolonged and increased IL10 transcription to enhance anti-inflammatory cytokine responses (35). It follows that individuals carrying the A allele in homozygosis are more prone to generate anti-inflammatory responses upon interaction of microbial ligands with *DC-SIGN*.

Thirdly, patients carrying the T allele of the rs12979860 SNP, mapping 3 kb upstream of the *IL28B* gene, were found to be less susceptible to CMV infection than their CC counterparts. This effect, however, only reached statistical significance when the analysis was focused on those recipients with an appropriate monitoring for CMV infection (*a priori* set at a minimum of 3 monitoring points during the first 6 posttransplant months). The lack of significant impact of this SNP on patients not receiving antiviral prophylaxis may have been due to the scarce number of TT individuals included in this subgroup. In a previous study conducted in allo-SCT recipients a trend towards a lower incidence of active CMV infection—and a shorter duration

Table 8: Combined effects of unfavorable genotypes of selected SNPs on CMV-infection free survival

Number of unfavorable genotypes ¹	Overall cohort (n = 315)				No antiviral prophylaxis (n = 169)			
	n	aHR ²	95% CI	p-Value	n	aHR ³	95% CI	p-Value
0–1	77	1	—	—	39	1	—	—
2	142	2.29	1.37–3.82	0.002	69	2.37	1.17–4.77	0.016
3–4	96	2.36	1.38–4.03	0.002	61	2.87	1.42–5.79	0.003

aHR, adjusted hazard ratio; CI, confidence interval; CMV, cytomegalovirus; *DC-SIGN*, dendritic cell-specific ICAM 3-grabbing nonintegrin; IL, interleukin; SNP, single-nucleotide polymorphism; TLR, toll-like receptor.

¹Unfavorable genotypes included: GG genotype of *TLR2* (rs5743708), CC/CT genotype of *TLR9* (rs5743836), GG genotype of *DC-SIGN* (rs735240), and CC genotype of *IL28B* (rs12979860).

²Model adjusted for recipient and donor age, donor CMV serostatus, receipt of antiviral prophylaxis and graft function (eGFR) at month 1.

³Model adjusted for recipient age, donor CMV serostatus and graft function (eGFR) at month 1.

SNPs and CMV Infection in R+ KT Recipients

of first replication episodes—was noted in the donor TT population with respect to the donor CC/CT population (23). The apparent protective effect of the TT genotype of *IL28B* (rs12979860) SNP in the transplantation setting is in contrast to that observed in patients chronically infected with genotype 1 of the hepatitis C virus and undergoing conventional pegylated IFN- α plus ribavirin therapy (37,38). In this clinical setting, patients carrying the CC genotype have been consistently found to display a greater response to therapy (37) or higher odds for natural clearance (38). The reason for this apparent discrepancy is currently unknown. Nevertheless, both clinical and biological data supporting in part our observation have been recently published. Egli et al found that D+/R- SOT recipients carrying the major-allele genotypes of *IL28B* (rs8099917 or rs12979860) SNPs had higher risk of CMV replication after cessation of antiviral prophylaxis (16). In a set of *in vitro* studies, these authors subsequently observed that human fibroblasts displaying the minor-allele T in homozygous state (TT) of *IL28B* (rs12979860) SNP were less permissive to CMV replication and showed higher expression of IFN- α and antiviral IFN-stimulated genes during infection (16). Manuel et al have reported that a functional TT/G polymorphism (rs368234815) in the CpG region upstream of *IL28B* influences susceptibility to CMV replication in SOT recipients not receiving antiviral prophylaxis (39). All combined, these pieces of evidence point to a protective effect of the minor-alleles genotypes of SNPs located in the *IL28B* promoter, an effect likely mediated by an increased expression of antiviral IFNs and/or by a stronger priming of CMV-specific T cells due to diminished expansion of regulatory T cells (16,23,40).

TLR2 has been shown to be involved in the activation of nuclear factor- κ B and antiviral cytokine response, which are triggered upon interaction with CMV glycoproteins gB and gH (41,42). Recent studies have shown that carrying the *TLR2* Arg753Gln SNP (rs5743708) in homozygosis (AA genotype) is a risk marker for CMV disease after liver transplantation (7,15). We observed the inverse effect: KT recipients with the wild-type genotype (GG) appeared to have a higher incidence of CMV infection than their AA and AG counterparts. This association, nevertheless, was not maintained in multivariable Cox models adjusted for other well-known risk factors for CMV infection. Therefore, our data on this specific SNP must be interpreted with caution, particularly in view of the low number of carriers of the A allele in homozygosis and the presence of a significant deviation from the HWE (43).

The list of SNPs in genes involved in the orchestration of CMV-elicited innate and adaptive immune responses has been growing steadily during the last few years (7–16). As it is highly unlikely that a single SNP may be sufficient to determine such an effect, recognition of immune-related gene haplotypes, defined as a set of genetic variants that are inherited together in linkage disequilibrium, seems to be of paramount relevance to precisely gauge the risk on an

individual basis. In this sense, new techniques are being developed for that purpose. A modest approach to this concept was undertaken herein: we investigated the combined effect of the unfavorable genotypes of the selected SNPs on the risk of CMV infection. We found a statistically significant relationship between the number of unfavorable SNP genotypes carried by a given patient and the overall risk of CMV infection. This association remained significant after adjusting for clinical and demographic risk factors. In this context, our risk score may be useful to decide, in the CMV-seropositive population, whether antiviral prophylaxis or pre-emptive therapy should be implemented on a patient basis.

Our study has some noteworthy limitations. Firstly, sample size could not have been powered to detect significant associations with minor-allele genotypes in some genes analyzed (i.e. A-allele or TT genotypes of *TLR2* and *IL28B*, respectively) that were scarcely represented in our patient population, and therefore a type-2 error cannot be excluded. This potential drawback might have been more evident in the restriction analyses performed to account for the impact of antiviral prophylaxis. Secondly, the use of different methods for the detection of CMV infection (i.e. pp65 antigenemia and different real-time PCR assays), and rather distinct strategies of pre-emptive therapy, may also undermine the interpretation of the data. Thirdly, our genotyping analyses were only focused on a single SNP in each targeted gene. This precluded the performance of formal haplotype analyses, which have been shown to be capable of revealing hidden variant associated with a given clinical outcome, or find tandem mutations that might have been otherwise missed. In addition, it is possible that other variants within these gene regions may be actually driving the associations observed with CMV infection. Finally, the mechanistic explanations proposed for the associations observed should be considered to some extent as speculative, since we did not correlate specific genotypes with activation markers of circulating DCs or CMV-specific T cell responses.

In conclusion, and despite the need for further investigation and replication in independent cohorts, our findings contribute to advance the current understanding of the immune mechanisms that modulate the individual susceptibility to CMV infection in CMV-seropositive KT recipients and, eventually, the clinical implementation of prevention strategies in this population.

Acknowledgments

Funding sources: The present study was supported by an unrestricted research grant from Roche Farma.

Members of the OPERA Study Group:

Manuel Arias, Carlos Gómez Alamillo (Hospital Universitario "Marqués de Valdecilla", Santander); Josep Maria Campistol, Federico Cofán (Hospital Clinic, Barcelona); José María Aguado, Esther González, Mario Fernández

Fernández-Ruiz et al

Ruiz (Hospital Universitario "12 de Octubre", Madrid); David Navarro (Hospital Clínico Universitario, Valencia); Ernesto Gómez Huertas (Hospital Central de Asturias, Oviedo); Gonzalo Gómez Márquez (Hospital Universitario Son Espases, Palma de Mallorca); Juan Manuel Díaz (Fundació Puigvert, Barcelona); Domingo Hernández, Eugenia Sola (Hospital Universitario "Carlos Haya", Málaga); Gabriel Bernal Blanco (Hospital Universitario "Virgen del Rocío", Sevilla); Luisa Jimeno (Hospital Universitario "Virgen de la Arrixaca", El Palmar, Murcia); Antonio Franco Esteve (Hospital General de Alicante, Alicante); Francisco Moreso (Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona); Alicia Mendiluce (Hospital Clínico Universitario, Valladolid); Enrique Luna Huerta (Hospital Universitario "Infanta Cristina", Badajoz); María Ovidia López Oliva (Hospital Universitario "La Paz", Madrid); Isabel Beneyto (Hospital Universitario "La Fe", Valencia); Paloma L. Martín-Moreno (Clínica Universidad de Navarra, Pamplona); Francisco Llamas Fuente (Hospital General Universitario, Albacete); Alex Gutiérrez (Hospital Universitario "Miguel Servet", Zaragoza); Teresa García Álvarez (Hospital Universitario "Puerta del Mar", Cádiz); Rita Guerra Rodríguez (Hospital Universitario Insular de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria); Natividad Calvo (Hospital Clínico Universitario "San Carlos", Madrid); Ana Fernández Rodríguez (Hospital Universitario "Ramón y Cajal", Madrid); José Matías Tabernero Romo (Hospital Clínico Universitario, Salamanca); María Dolores Navarro (Hospital Universitario "Reina Sofía", Córdoba); Ana Ramos Verde (Fundación Jiménez Díaz, Madrid).

Disclosure

The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose as described by the *American Journal of Transplantation*.

References

- Razonable RR, Humar A. AST infectious diseases community of practice. Cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2013; 13: 93–106.
- Freeman RB Jr. The 'indirect' effects of cytomegalovirus infection. *Am J Transplant* 2009; 9: 2453–2458.
- Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, et al. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation* 2013; 96: 333–360.
- Le Page AK, Jager MM, Kotton CN, Simoons-Smit A, Rawlinson WD. International survey of cytomegalovirus management in solid organ transplantation after the publication of consensus guidelines. *Transplantation* 2013; 95: 1455–1460.
- de la Torre-Cisneros J, Farinas MC, Caston JJ, et al. GESITRA-SEIMC/REIPI recommendations for the management of cytomegalovirus infection in solid-organ transplant patients. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011; 29: 735–758.
- Netea MG, Wijmenga C, O'Neill LA. Genetic variation in Toll-like receptors and disease susceptibility. *Nat Immunol* 2012; 13: 535–542.
- Kijpittayarit S, Eid AJ, Brown RA, Paya CV, Razonable RR. Relationship between Toll-like receptor 2 polymorphism and cytomegalovirus disease after liver transplantation. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 1315–1320.
- Hoffmann TW, Halimi JM, Buchler M, et al. Association between a polymorphism in the IL-12p40 gene and cytomegalovirus reactivation after kidney transplantation. *Transplantation* 2008; 85: 1406–1411.
- Brown RA, Gralewski JH, Razonable RR. The R753Q polymorphism abrogates toll-like receptor 2 signaling in response to human cytomegalovirus. *Clin Infect Dis* 2009; 49: e96–99.
- Cervera C, Lozano F, Linares L, et al. Influence of mannose-binding lectin gene polymorphisms on the invasiveness of cytomegalovirus disease after solid organ transplantation. *Transplant Proc* 2009; 41: 2259–2261.
- Cervera C, Balderramo D, Suárez B, et al. Donor mannose-binding lectin gene polymorphisms influence the outcome of liver transplantation. *Liver Transpl* 2009; 15: 1217–1224.
- Hoffmann TW, Halimi JM, Buchler M, et al. Association between a polymorphism in the human programmed death-1 (PD-1) gene and cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *J Med Genet* 2010; 47: 54–58.
- de Rooij BJ, van der Beek MT, van Hoek B, et al. Mannose-binding lectin and ficolin-2 gene polymorphisms predispose to cytomegalovirus (re)infection after orthotopic liver transplantation. *J Hepatol* 2011; 55: 800–807.
- Mitsani D, Nguyen MH, Grinta DM, 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: 523–529.
- Kang SH, Abdel-Massih RC, Brown RA, Dierkhising RA, Kremers WK, Razonable RR. Homozygosity for the toll-like receptor 2 R753Q single-nucleotide polymorphism is a risk factor for cytomegalovirus disease after liver transplantation. *J Infect Dis* 2012; 205: 639–646.
- Egli A, Levin A, Santer DM, et al. Immunomodulatory function of interleukin 28B during primary infection with cytomegalovirus. *J Infect Dis* 2014; 210: 717–727.
- Loeffler J, Steffens M, Artl EM, 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: 1847–1850.
- Mezger M, Steffens M, Semmler C, et al. Investigation of promoter variations in dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) (CD209) and their relevance for human cytomegalovirus reactivation and disease after allogeneic stem-cell transplantation. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 228–234.
- Carvalho A, Cunha C, Carotti A, et al. Polymorphisms in Toll-like receptor genes and susceptibility to infections in allogeneic stem cell transplantation. *Exp Hematol* 2009; 37: 1022–1029.
- Bravo D, Clari MA, Aguilar G, et al. Looking for biological factors to predict the risk of active cytomegalovirus infection in non-immunosuppressed critically ill patients. *J Med Virol* 2014; 86: 827–833.
- Aguado JM, Fernández-Ruiz M, Arias M, Campistol JM. Impact of different prevention strategies on the risk of cytomegalovirus (CMV) infection and disease in seropositive kidney transplant (KT) recipients [abstract]. *Am J Transplant* 2014; 14: 765.
- Corrales I, Giménez E, Solano C, 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* 2014; Aug 17 [epub ahead of print].
- Bravo D, Solano C, Gimenez E, 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: 838–844.
- Little J, Higgins JP, Ioannidis JP, et al. Strengthening the REporting of Genetic Association studies (STREGA)—an extension of the STROBE statement. *Eur J Clin Invest* 2009; 39: 247–266.

SNPs and CMV Infection in R+ KT Recipients

25. Humar A, Michaels M. AST ID Working Group on Infectious Disease Monitoring. American Society of Transplantation recommendations for screening, monitoring and reporting of infectious complications in immunosuppression trials in recipients of organ transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6: 262–274.
26. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999; 130: 461–470.
27. European Expert Group on Renal Transplantation; European Renal Association; European Society for Organ Transplantation. European Best Practice Guidelines for Renal Transplantation (part 1). *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1–85.
28. Carvalho A, Osorio NS, Saraiva M, et al. The C allele of rs5743836 polymorphism in the human TLR9 promoter links IL-6 and TLR9 up-regulation and confers increased B-cell proliferation. *PLoS ONE* 2011; 6: e28256. doi: 10.1371/journal.pone.0028256
29. Xiao HW, Luo Y, Lai XY, et al. Donor TLR9 gene tagSNPs influence susceptibility to aGVHD and CMV reactivation in the allo-HSCT setting without polymorphisms in the TLR4 and NOD2 genes. *Bone Marrow Transplant* 2014; 49: 241–247.
30. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010; 11: 373–384.
31. Tabeta K, Georgel P, Janssen E, et al. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 3516–3521.
32. Cook CH, Trgovcich J, Zimmerman PD, Zhang Y, Sedmak DD. Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor alpha, or interleukin-1beta triggers reactivation of latent cytomegalovirus in immunocompetent mice. *J Virol* 2006; 80: 9151–9158.
33. Traub S, Demaria O, Chasson L, Serra F, Desnues B, Alexopoulou L. Sex bias in susceptibility to MCMV infection: Implication of TLR9. *PLoS ONE* 2012; 7: e45171. doi: 10.1371/journal.pone.0045171
34. Halary F, Amara A, Lortat-Jacob H, et al. Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity* 2002; 17: 653–664.
35. Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, van Het Hof B, van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB. *Immunity* 2007; 26: 605–616.
36. Haspot F, Lavault A, Sinzger C, et al. Human cytomegalovirus entry into dendritic cells occurs via a macropinocytosis-like pathway in a pH-independent and cholesterol-dependent manner. *PLoS ONE* 2012; 7: e34795.
37. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009; 461: 399–401.
38. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 2009; 461: 798–801.
39. Manuel O, Wójtowicz A, Bibert S, et al. Influence of IFNL3/4 polymorphisms on the incidence of cytomegalovirus infection after solid-organ transplantation. *J Infect Dis* 2014; Oct 9 [epub ahead of print].
40. Egli A, Silva M Jr, O’Shea D, et al. An analysis of regulatory T-cell and Th-17 cell dynamics during cytomegalovirus replication in solid organ transplant recipients. *PLoS ONE* 2012; 7: e43937. doi: 10.1371/journal.pone.0043937
41. Boehme KW, Guerrero M, Compton T. Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. *J Immunol* 2006; 177: 7094–7102.
42. Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW, et al. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J Virol* 2003; 77: 4588–4596.
43. Trikalinos TA, Salanti G, Khoury MJ, Ioannidis JP. Impact of violations and deviations in Hardy-Weinberg equilibrium on postulated gene-disease associations. *Am J Epidemiol* 2006; 163: 300–309.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Supplemental Methods

Table S1: Genotypic frequencies of the three SNPs deviating from the Hardy–Weinberg equilibrium.

Table S2: Multivariate Cox regression models assessing the impact of selected SNPs on CMV infection-free survival in a sensitivity analysis restricted to patients with ≥ 3 monitoring points for CMV infection during the first 6 months after transplantation.

Table S3: Multivariate Cox regression models assessing the impact of selected SNPs on CMV infection-free survival in a sensitivity analysis restricted to patients of Caucasian ethnicity.

Table S4: Combined effect of SNPs in *TLR9*, *DC-SIGN* and *IL28B* genes on CMV infection-free survival.

Fernández-Ruiz et al. Association between individual and combined SNPs in genes related to innate immunity and incidence of CMV infection in seropositive kidney transplant recipients.

Supplemental Methods

Study definitions

The *graft function* was assessed by estimated glomerular filtration rate (eGFR) using the abbreviated Modification of Diet in Renal Disease (MDRD-4) equation (ref. 25). *Delayed graft function* denoted the need for dialysis within the first week after transplantation. *Acute graft rejection* was suspected in case of an elevation of the serum creatinine and diagnosed by histological examination. Only histologically confirmed episodes were taken into account (ref. 26). *Graft loss* was defined as permanent return to dialysis, allograft nephrectomy or retransplantation.

Fernández-Ruiz et al. Association between individual and combined SNPs in genes related to innate immunity and incidence of CMV infection in seropositive kidney transplant recipients.

Supplemental Results

Table S1. Genotypic frequencies of the three SNPs deviating from the HWE (n = 315).

Gene (SNP database ID number)	Genotype	Genotypic frequencies (n [%])		χ^2
		Expected according to the HWE	Observed	
<i>IL10</i> (rs1878672)	CC	58.3 (18.5)	69 (21.9)	6.06
	CG	154.4 (49.0)	133 (42.2)	
	GG	102.2 (32.4)	113 (35.9)	
<i>CCR5</i> (rs1800023)	AA	125.7 (39.9)	134 (42.5)	4.02
	AG	146.6 (46.5)	130 (41.3)	
	GG	42.7 (13.6)	51 (16.2)	
<i>TLR2</i> (rs5743708)	AA	0.5 (0.2)	11 (3.5)	254.24
	AG	23.1 (7.3)	2 (0.6)	
	GG	291.5 (92.5)	302 (95.9)	

CCR5: chemokine (C-C motif) receptor 5; HWE: Hardy-Weinberg equilibrium; ID: identification; IL: interleukin; SNP: single-nucleotide polymorphism; TLR: toll-like receptor.

Artículos Originales

Fernández-Ruiz et al. Association between individual and combined SNPs in genes related to innate immunity and incidence of CMV infection in seropositive kidney transplant recipients.

Table S2. Sensitivity analysis: multivariate Cox regression models assessing the impact of selected SNPs on CMV infection-free survival restricted to patients with ≥ 3 monitoring points for CMV infection during the first 6 months after transplantation.

	Overall cohort (n = 276)			No antiviral prophylaxis (n = 150)		
	aHR ^a	95% CI	P-value	aHR ^b	95% CI	P-value
GG genotype of <i>TLR2</i> (rs5743708) SNP (vs. AA/AG)	3.02	0.74 - 12.36	0.125	- ^c	-	-
TT genotype of <i>TLR9</i> (rs5743836) SNP (vs. CC/CT)	0.71	0.48 - 1.04	0.079	0.65	0.40 - 1.04	0.072
GG genotype of <i>DC-SIGN</i> (rs735240) SNP (vs. AA/AG)	1.26	0.87 - 1.84	0.222	1.87	1.17 - 2.94	0.005
CT/TT genotype of <i>IL28B</i> (rs12979860) SNP (vs. CC)	0.66	0.46 - 0.96	0.029	0.70	0.44 - 1.13	0.142

aHR: adjusted hazard ratio; CI: confidence interval; CMV: cytomegalovirus; DC-SIGN: dendritic cell-specific ICAM 3-grabbing nonintegrin; ID: identification; IL: interleukin; SNP: single-nucleotide polymorphism; TLR: toll-like receptor.

^a Model adjusted for recipient and donor age, donor CMV serostatus, receipt of antiviral prophylaxis and graft function (eGFR) at month 1.

^b Model adjusted for recipient age, donor CMV serostatus and graft function (eGFR) at month 1.

^c The HR was not estimable since all cases of CMV infection occurred in patients with the wild-type GG genotype.

Fernández-Ruiz *et al.* Association between individual and combined SNPs in genes related to innate immunity and incidence of CMV infection in seropositive kidney transplant recipients.

Table S3. Sensitivity analysis: multivariate Cox regression models assessing the impact of selected SNPs on CMV infection-free survival restricted to patients of Caucasian ethnicity.

	Overall cohort (n = 293)			No antiviral prophylaxis (n = 155)		
	aHR ^a	95% CI	P-value	aHR ^b	95% CI	P-value
GG genotype of <i>TLR2</i> (rs5743708) SNP (vs. AA/AG)	3.42	0.84 - 13.84	0.085	- ^c	-	-
TT genotype of <i>TLR9</i> (rs5743836) SNP (vs. CC/CT)	0.69	0.47 - 1.03	0.067	0.58	0.36 - 0.93	0.024
GG genotype of <i>DC-SIGN</i> (rs735240) SNP (vs. AA/AG)	1.36	0.93 - 1.98	0.114	1.88	1.17 - 2.99	0.009
CT/TT genotype of <i>IL28B</i> (rs12979860) SNP (vs. CC)	0.73	0.50 - 1.06	0.098	0.72	0.45 - 1.15	0.172

aHR: adjusted hazard ratio; CI: confidence interval; CMV: cytomegalovirus; DC-SIGN: dendritic cell-specific ICAM 3-grabbing nonintegrin; ID: identification; IL: interleukin; SNP: single-nucleotide polymorphism; TLR: toll-like receptor.

^a Model adjusted for recipient and donor age, donor CMV serostatus, receipt of antiviral prophylaxis and graft function (eGFR) at month 1.

^b Model adjusted for recipient age, donor CMV serostatus and graft function (eGFR) at month 1.

^c The HR was not estimable since all cases of CMV infection occurred in patients with the wild-type GG genotype.

Fernández-Ruiz et al. Association between individual and combined SNPs in genes related to innate immunity and incidence of CMV infection in seropositive kidney transplant recipients.

Table S4. Combined effect of selected SNPs in *TLR9*, *DC-SIGN* and *IL28B* genes on CMV infection-free survival.

Genotype combination	Overall cohort				No antiviral prophylaxis			
	n	aHR ^a	95% CI	P-value	n	aHR ^b	95% CI	P-value
Unfavorable genotypes in SNPs of <i>TLR9</i> and <i>DC-SIGN</i> ^a	24	1.22	0.65 - 2.03	0.531	16	1.83	0.96 - 3.46	0.065
Unfavorable genotypes in SNPs of <i>IL28B</i> and <i>DC-SIGN</i> ^b	52	1.25	0.79 - 1.96	0.328	33	1.37	0.81 - 2.30	0.243
Favorable genotypes in SNPs of <i>IL28B</i> and <i>TLR9</i> ^c	109	0.65	0.45 - 0.95	0.027	56	0.60	0.36 - 0.99	0.046

aHR: adjusted hazard ratio; CMV: cytomegalovirus; DC-SIGN: dendritic cell-specific ICAM 3-grabbing nonintegrin; IL: interleukin; SNP: single-nucleotide polymorphism; TLR: toll-like receptor.

^a CC/CT genotype of *TLR9* (rs5743836) SNP and GG genotype of *DC-SIGN* (rs735240) SNP.

^b CC genotype of *IL28B* (rs12979860) SNP and GG genotype of *DC-SIGN* (rs735240) SNP.

^c CT/TT genotype of *IL28B* (rs12979860) SNP and TT genotype of *TLR9* (rs5743836) SNP.

Letter to the Editor

Influence of Age and HLA Alleles on the CMV-Specific Cell-Mediated Immunity Among CMV-Seropositive Kidney Transplant Candidates

To the Editor:

We have read with interest the article by Cantisán and co-workers (1) reporting an association between certain human leukocyte antigen class I (HLA-I) alleles (HLA-A1 and HLA-A2) and the presence of pretransplant reactivity in the QuantiFERON-CMV (QF-CMV) assay in cytomegalovirus (CMV)-seropositive solid organ transplant (SOT) candidates. As they acknowledged, this finding might be confounded by the fact that the QF-CMV assay measures CMV-specific interferon- γ (IFN- γ)-producing CD8⁺ T cells mainly targeting viral epitopes on pp65 and immediate-early 1 (IE-1) proteins, whose presentation is restricted through the above-referred alleles (1,2).

We sought to determine whether this association remains when CMV-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T cell response is assessed by flow cytometry for intracellular staining (ICS) using 15-mer overlapping peptide libraries spanning the entire sequence of pp65 and IE-1 viral proteins as the stimulating antigen. The ICS method is considered the reference procedure for measuring CMV-specific T cell responses, and 15-mer overlapping peptides are potentially presented in a broader HLA-I allele background (2,3).

CMV-specific IFN- γ -producing CD4⁺ and CD8⁺ T cells were enumerated by ICS in 43 CMV-seropositive patients listed for kidney transplantation (details available as Supporting Information). The HLA-A1 and HLA-A2 alleles were present in 10 (24.4%) and 17 (39.5%) patients. The magnitude of CMV-specific CD8⁺ T cell responses in patients harboring HLA-A1 and/or HLA-A2 alleles was comparable to that observed in patients with HLA-I alleles of other specificities (median 6.59 vs. 4.20 cells/ μ L; p -value = 0.309). Interestingly, harboring the HLA-B44 allele (present in 11 [25.6%] patients) was associated with robust CMV-specific CD8⁺ T cell responses (median 9.88 vs. 4.06 cells/ μ L; p -value = 0.016) (Figure 1A). In fact, it was the only factor found to be associated with the magnitude of such response in a linear regression model (β = 0.366; p -value = 0.020). In turn, older age was not correlated with CMV-specific CD8⁺ T cell counts (Spearman's ρ = -0.223; p -value = 0.155). As opposed to our study, the cohort analyzed by Cantisán and co-workers also included liver and lung transplant candidates,

although kidney candidates had a higher probability of being QF-CMV reactive than the remaining patients (1). The skewed association between CMV-specific response and HLA-A1 and A2 genotypes reported by these authors (1), which has not been confirmed in our study, might have been related to the fact that the QF-CMV assay primes the detection of CD8⁺ T cell responses against the epitopes NLVPMVATV on pp65 (HLA-A2) and VLEETSVMML on IE-1 (HLA-A2), which are considered immunodominant in Caucasians. Further studies assessing CMV-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T cell responses measured in parallel by means of QF-CMV and ICS in homogeneous SOT cohorts are needed to resolve this discrepancy.

Unexpectedly, CMV-specific IFN- γ -producing CD4⁺ T cell counts in HLA-A1 and/or HLA-A2 patients were significantly higher than that in patients displaying other HLA-class I allele specificities (median 5.35 vs. 1.59 cells/ μ L; p -value = 0.010) (Figure 1B), whereas age was inversely correlated with such a subset (Spearman's ρ = -0.517; p -value < 0.0001). Linear regression confirmed that age (β = -0.331; p -value = 0.034) and harboring HLA-A1 and/or HLA-A2 alleles (β = 0.275; p -value = 0.068) were independently associated with the CMV-specific CD4⁺ T cell count. The finding that increasing age is linked to a poorer CMV-specific CD4⁺ T cell response is congruent with experimental studies (4) and with the clinical experience showing that the CMV disease is more often diagnosed in older kidney transplant recipients (5), and further supports the instrumental role of CD4⁺ T cells in the long-term maintenance of protective T cell immunity (2). The interpretation of the association found between HLA-I alleles and the CMV-specific CD4⁺ T cell response is not straightforward. It could be hypothesized that HLA-A1 and A2 alleles might be in linkage disequilibrium with single nucleotide polymorphisms in HLA class II genes promoting a more efficient antigen processing and presentation.

In view of the increasingly recognized role for assessing the pretransplant CMV-specific immunity among CMV-seropositive SOT candidates, further studies are warranted to precisely characterize the effect of HLA class I and II alleles on the magnitude of CMV-specific T cell responses.

Fernández-Ruiz et al

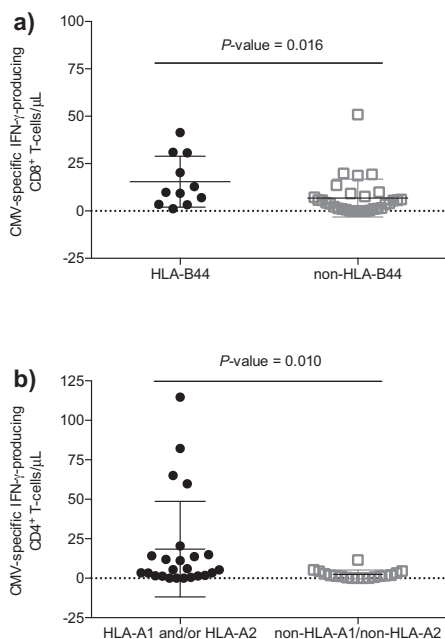


Figure 1: Absolute counts of CMV-specific IFN- γ -producing T cells according to selected HLA class I alleles in CMV-seropositive kidney transplant candidates. (A) CD8⁺ T cell count in patients with or without the HLA-B44 allele; (B) CD4⁺ T cell count in patients with or without HLA-A1 and/or HLA-A2 alleles (data are shown as individual points, the line represents the mean and the whiskers the standard deviation). CMV, cytomegalovirus; HLA, human leukocyte antigen; IFN- γ , interferon gamma.

Acknowledgments

This study was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigaciones Sanitarias [FIS] 12/02269 and Proyecto Integrado de Excelencia [PIE] 13/00045). M.F.R. holds a clinical research contract "Juan Rodés" (JR14/00036) from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, Instituto de Salud Carlos III.

M. Fernández-Ruiz^{1,*}, I. Corrales², P. Amat³, E. González⁴, A. Andrés⁴, D. Navarro² and J. M. Aguado¹

¹Unit of Infectious Diseases, Hospital Universitario "12 de Octubre", Instituto de Investigación Hospital "12 de Octubre" (i+12), School of Medicine, Universidad Complutense, Madrid, Spain

²Department of Microbiology, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, School of Medicine, Universidad de Valencia, Valencia, Spain

³Department of Hematology and Medical Oncology, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, School of Medicine, Universidad de Valencia, Valencia, Spain

⁴Department of Nephrology, Hospital Universitario "12 de Octubre", Instituto de Investigación Hospital "12 de Octubre" (i+12), School of Medicine, Universidad Complutense, Madrid, Spain

*Corresponding author: Mario Fernández-Ruiz, mario_fdezruiz@yahoo.es

Disclosure

The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose as described by the *American Journal of Transplantation*.

References

1. Cantisán S, Rodelo-Haad C, Páez-Vega A, et al. Factors related to the development of CMV-specific CD8⁺ T cell response in CMV-seropositive solid organ transplant candidates. *Am J Transplant* 2015; 15: 715–722.
2. Fernández-Ruiz M, Kumar D, Humar A. Clinical immune-monitoring strategies for predicting infection risk in solid organ transplantation. *Clin Trans Immunol* 2014; 3: e12. DOI: 10.1038/cti.2014.3
3. Clari MÁ, Muñoz-Cobo B, Solano C, et al. Performance of the QuantiFERON-cytomegalovirus (CMV) assay for detection and estimation of the magnitude and functionality of the CMV-specific gamma interferon-producing CD8(+) T-cell response in allogeneic stem cell transplant recipients. *Clin Vaccine Immunol* 2012; 19: 791–796.
4. Mattes FM, Vargas A, Kopycinski J, et al. Functional impairment of cytomegalovirus specific CD8 T cells predicts high-level replication after renal transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8: 990–999.
5. Fernández-Ruiz M, López-Medrano F, Allende LM, et al. Kinetics of peripheral blood lymphocyte subpopulations predicts the occurrence of opportunistic infection after kidney transplantation. *Transpl Int* 2014; 27: 674–685.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Supplementary Patients and Methods

Supplementary Patients and Methods

Study population and setting

Between March 2013 and October 2014 a total of 43 cytomegalovirus (CMV)-seropositive patients listed for kidney transplantation at the University Hospital "12 de Octubre" (Madrid, Spain) were recruited. Thirty patients (69.8%) were males and median age was 60.6 ± 14.2 years. Most of them (41 [95.3%]) were on dialysis (hemodialysis [34 patients] or continuous ambulatory peritoneal dialysis [7 patients]) at the time of inclusion. Whole blood specimens were collected in sodium heparin tubes and subsequently shipped at room temperature to the reference laboratory (Department of Microbiology, Hospital Clínico Universitario, Valencia), where they were processed within 24 hours after collection. The Clinical Research Ethics Committee approved the study protocol, and written informed consent was obtained from all participants.

Intracellular cytokine staining (ICS) procedure

Enumeration of CMV-specific interferon (IFN)- γ -producing CD8⁺ and CD4⁺ T-cells was carried out by flow cytometry for ICS (BD Fastimmune, BD-Beckton Dickinson and Company-Biosciences, San Jose, CA) following the manufacturer's instructions. A volume of 0.5 mL of heparinized whole blood was simultaneously stimulated with two sets of 15-mer overlapping peptides spanning the entire sequences of the CMV immunodominant pp65 (UL83) and immediate early (IE)-1 peptides (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ per peptide) obtained from JPT peptide Technologies GmbH (Berlin, Germany), in the presence of costimulatory monoclonal antibodies (mAbs) targeting CD28 and CD49d, brefeldin (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and monensin (1 μM) for 6 hours at 37°C. The cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS)-2% fetal calf serum (FCS), lysed in BD FACS lysis solution, stained with surface markers (anti-CD8-peridinin chlorophyll protein [PerCP]-Cy5-5 and anti-CD3-APC-Cy7), permeabilized (BD FACS permeabilizing solution 2), washed, and finally stained for intracellular cytokines (anti-IFN- γ -fluorescein isothiocyanate [FITC]). All antibodies and solutions were purchased from Becton Dickinson (San Jose, CA). The cells were stored at 4°C in PBS-1% formaldehyde, acquired within 4 hours with a BD FCSCantoll flow cytometer (BD Biosciences Immunocytometry Systems, San Jose, CA), and analyzed with the software program Infinicyt (Cytognos, Salamanca, Spain). The negative

controls (absence of peptide stimulation) were processed in parallel for all experiments. The total number of each CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subpopulation was calculated by multiplying the corresponding percentage of CMV-specific T-cells (after background subtraction) by the absolute number of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells.

Statistical analysis

Categorical variables were compared using the χ^2 test, whereas Mann-Whitney U test was applied for continuous variables. Spearman's rho was used to investigate the correlation between age and CMV-specific IFN- γ -producing CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subpopulations. Separate multiples linear regression models were generated to assess the demographic, clinical and immunological factors (i.e., HLA alleles) influencing the absolute CMV-specific T-cell counts. All the significance tests were two-tailed. Statistical analysis was performed using SPSS v. 15.0 (Statistical Package for Social Sciences, Inc., Chicago, IL) and graphics were generated with Prism v. 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

IL28B Genetic Variation and Cytomegalovirus-Specific T-Cell Immunity in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients

Isabel Corrales,¹ Carlos Solano,^{2,3} Paula Amat,² Estela Giménez,¹ Rafael de la Cámara,⁴ José Nieto,⁵ Javier López,⁶ Ana García-Noblejas,⁴ José Luis Piñana,² and David Navarro^{1,7*}

¹Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Fundación de Investigación INCLIVA, Valencia, Spain

²Hematology and Medical Oncology Service, Hospital Clínico Universitario, Fundación de Investigación INCLIVA, Valencia, Spain

³Department of Medicine, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

⁴Hematology Service, Hospital de la Princesa, Madrid, Spain

⁵Hematology Service, Hospital Morales Meseguer, Murcia, Spain

⁶Hematology Service, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain

⁷Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

A single nucleotide polymorphism (SNP), 3 kbp upstream of the IL28B gene (rs12979860; C/T), has been shown to influence the dynamics of cytomegalovirus (CMV) replication in allogeneic stem cell transplant recipients (Allo-SCT). We investigated whether this SNP had any effect on the dynamics of CMV-specific T-cell immunity in these patients. CMV pp65/IE-1 IFN- γ CD8⁺ and CD4⁺ T cells were enumerated by flow cytometry in 85 patients with no prior CMV DNAemia (group A) and in 57 after the onset of CMV DNAemia (group B). Donor IL28B genotype was determined by real-time PCR and plasma levels of IL-28B were quantitated by ELISA. CMV-specific T-cell counts and plasma IL-28B levels in patients in group A were not significantly different among the IL28B genotype groups. Patients harboring the donor IL28B T/T genotype appeared to expand CMV-specific IFN- γ CD8⁺ cells to a higher level in response to viral replication than their C/T and C/C counterparts. Fewer patients in the T/T group received pre-emptive antiviral therapy ($P=0.05$). Overall, a significant inverse correlation was observed between median IL-28B levels measured prior to the CMV DNAemia onset and the level of CMV-specific CD8⁺ T cells enumerated after detection of CMV DNAemia ($\sigma=-0.471$; $P=0.013$). In summary, the data suggested that the protective effect attributed to the rs12979860 SNP minor T allele could be mediated, at least in part, by eliciting robust CMV-specific T-cell responses. **J. Med. Virol.**

© 2016 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: cytomegalovirus; allogeneic stem cell transplantation
IFN- λ 3; IL28B gene polymorphisms; T-cell immunity; CMV DNAemia

INTRODUCTION

Cytomegalovirus (CMV) infection is a relevant cause of morbidity and mortality in allogeneic stem cell transplant recipients (Allo-SCT) [Boeckh and Ljungman, 2009; Pérez-Romero et al., 2015]. The impact of host and donor genetics on the risk of active CMV infection and end-organ disease in Allo-SCT patients is being increasingly recognized [Loeffler et al., 2006; Mezger et al., 2008; Bravo et al., 2014; Corrales et al., 2015]. Type III (λ) interferons (IFNs), including IFN- λ 1 (IL-29), IFN- λ 2 (IL-28A), and IFN- λ 3 (IL-28B) and IFN- λ 4, are triggered by viral infections and may induce antiviral activity, which may partially overlap with that mediated by type I IFNs, as well as immunomodulatory effects [Kotenko et al., 2003; Sheppard et al., 2003], as they signal through a

Grant sponsor: Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain; Grant number: FIS 12/01992

Conflicts of interest: none.

*Correspondence to: David Navarro, Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario and Department of Microbiology, School of Medicine, Av. Blasco Ibáñez 17, Valencia 46010, Spain. E-mail: david.navarro@uv.es

Accepted 31 August 2016

DOI 10.1002/jmv.24676

Published online in Wiley Online Library
(wileyonlinelibrary.com).

heterodimeric receptor consisting of IL-10R β and IL-28R1 chains. The antiviral effect against a wide variety of viruses, including influenza virus, human metapneumovirus, herpes simplex virus type 2, respiratory syncytial virus and rotavirus has been demonstrated in experimental models [Hermant and Michiels, 2014]. Virtually any cell type is capable of expressing IL28B mRNA; Nevertheless, IL-28B is mainly produced by myeloid and plasmacytoid dendritic cells [Yoshio et al., 2013; Zhang et al., 2013]. IL-28B binds a specific cell surface receptor complex which is abundantly expressed in epithelial cells, melanocytes, and hepatocytes [Sommerreyns et al, 2008], leading to JAK-STAT signal transduction and expression of interferon-stimulated genes [Liu et al., 2012]. A single nucleotide polymorphism (SNP; rs12979860), 3 kbp upstream of the IL28B gene, has been shown to be associated with spontaneous resolution of hepatitis C virus (HCV) infection and with a greater response of patients infected chronically with HCV genotype 1 to PEG-IFN α /Ribavirin therapy [Ge et al., 2009; Thomas et al., 2009]. This if one of a series of SNPs located relatively distant from the IL28B and IFNL4 coding sequences genes that have been shown to be in high linkage disequilibrium [Duggal et al., 2013]. Despite its location they are thought to potentially impact the binding of transcription factors and methylation sites, thereby influencing the promoter activity [Chinnaswamy et al., 2013; McFarland et al., 2014; Lu et al., 2015]. Nevertheless, the exact mechanism by which these SNP affect regulation or expression of the IL28B gene remains to be elucidated.

We previously investigated the effect of the IL28B SNP rs12979860 on the incidence of active CMV infection and the dynamics of CMV DNAemia within episodes of CMV replication in Allo-SCT recipients. Our data pointed to a protective effect of the donor T allele (just the opposite to that seen in HCV-infected patients). In particular, patients receiving an allograft from a donor harboring the minor allele expressed in homozygous (T/T) form had shorter episodes of CMV DNAemia than those carrying the donor C/T and C/C genotypes. In contrast, the recipient IL28B genotype had no influence on the variables subject to analysis. A relevant impact of the above-mentioned SNP on the incidence of active CMV infection in solid organ transplant recipients has also been reported [Egli et al., 2014; Fernández-Ruiz et al., 2015]. A plausible mechanistic explanation for these clinical observations was proposed by Egli et al. [2014], whereby lower CMV-induced interferon-stimulated genes (ISG) and an impairment of T-cell priming during CMV replication would be the hallmarks of the risk genotypes (C/C and C/T), this leading to a suboptimal antiviral response. In this context, we investigated whether the IL28B rs12979860 SNP had any effect on the recovery of CMV-specific T-cell immunity following transplantation and on the magnitude of CMV-specific T-cell expansion triggered by CMV replication in Allo-SCT recipients.

J. Med. Virol. DOI 10.1002/jmv

MATERIALS AND METHODS

Patients

The current study was a retrospective, observational one that included two independent cohorts: Cohort (A) consisted of 85 non-consecutive, Caucasian patients who underwent Allo-SCT at the respective Haematology Unit of the Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain (HCU) (n=48), Hospital La Princesa, Madrid, Spain (n=18), Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain (n=11), and Hospital Morales Meseguer, Murcia, Spain (n=8) between 2008 and 2014. The inclusion criteria were the following: (i) absence of documented CMV DNAemia prior to the time of immunological analysis; (ii) availability of CMV-specific CD8⁺ T-cell immunity data; (iii) availability of at least three plasma specimens for IL-28B quantitation obtained after Allo-SCT and prior to the time of immunological analyses; and (iv) availability of data on the donor IL28B genotype. Cohort (B) consisted of 57 non-consecutive patients who underwent Allo-SCT at HCU between 2007 and 2014. The inclusion criteria were the following: (i) availability of data on CMV-specific CD8⁺ T-cell immunity obtained within the episode of active CMV infection; (ii) availability of plasma specimens for IL-28B quantitation obtained prior to the time of immunological analyses; and (iii) availability of data on the donor IL28B genotype. The patients in cohorts A and B had been included in different studies previously published by our group [Solano et al., 2008; Tormo et al., 2010a,b, 2011; Giménez et al., 2015a,b]. In all these studies, CMV-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T cells, but not CD4⁺ T cells, were planned to be enumerated. As a result, the number of available measurements for CMV-specific CD4⁺ T cells was lower than that for CMV-specific CD8⁺ T cells. The donor IL28B genotype of 100 out of the 142 patients included in the current study was previously reported [Bravo et al., 2014]. The median age of patients included in the current study was 48.6 years (range 18–70 years). The study period comprised the first 100 days following transplantation. Only initial (first) episodes of CMV DNAemia were considered for the analyses described herein. The study was approved by the Ethics Committees of the participating hospitals. All patients gave their informed consent to participate in the study.

Virological Monitoring and Management of Active CMV Infection

Virological monitoring was conducted at least once a week, and was performed with a pp65 antigenaemia assay (AG) (Diagnostics CMV pp65 Antigenemia Immunofluorescence assay, Chemicon International, Temecula, CA) and/or by a plasma real-time PCR assay, as previously reported [Tormo et al., 2011]. For the AG assay, blood samples were obtained in EDTA-treated tubes and were processed within 2 hr.

IL28B and Cytomegalovirus Infection

Polymorphonuclear leukocytes (PMNLs) and plasma were separated by the standard dextran sedimentation method. The pp65 antigenemia assay was carried out by a standard immunofluorescence procedure as previously described [Solano et al., 2001]. Results were reported as the number of pp65-positive cells/200,000 PMNL. Pre-emptive therapy with oral valganciclovir (900 mg/12 hr), i.v. ganciclovir (5 mg/kg/12 hr), or i.v. foscarnet (60 mg/kg/12 hr) was initiated either upon a positive pp65 AG result or upon a CMV DNAemia threshold level, which was established at each center (between 500 and 1000 copies/ml). All patients in cohort B underwent Allo-SCT at the Hospital Clínico Universitario of Valencia. At this center, until April 2010, virological monitoring was performed in parallel with the AG assay and a real-time PCR (PCR Kit, Abbott Molecular, Des Plaines, IL), although the initiation and cessation of pre-emptive antiviral therapy was based exclusively upon AG assay results. After May 2010, virological monitoring was performed exclusively by real-time PCR (the new Abbott Real Time CMV assay replaced the old CMV PCR kit by May 2012). Plasma CMV DNAemia values were normalized to the 1st WHO International Standard for CMV for Nucleic Acid Amplification (NAT)-Based Assays (National Institute for Biological Standards and Control, Hertfordshire, UK), and reported in International Units (IU)/ml throughout the text. The conversion factor (copies/ml to IU/ml) for these real-time PCR assays was previously defined [Clari et al., 2013]. Real-time PCR assays were performed following the instructions of the manufacturer.

IL28B Polymorphism Analysis

IL28B (rs12979860) genotyping was performed by PCR (LightMix Kit IL28B; TIB MOLBIOL, Berlin, Germany) using the Roche Diagnostics LightCycler 2.0 following the recommendations of the manufacturer (Insert LightMix[®] Kit IL28B rs12979860; Cat.-No. 40-0588-32). Briefly, a 139 bp long fragment is amplified with specific primers and analyzed in a subsequent melting curve analysis, using a SimpleProbe oligomer, which is specific for the -3176C allele. The resulting PCR fragments are detected by the SimpleProbe[®] in channel 530. The genotypes are identified by running a melting curve with specific melting points (T_m). The allele T exhibits a T_m of about 51–53°C. Plasma samples were obtained from patients following engraftment (collected around 30 days after Allo-SCT) to determine the donor genotype. It has been shown that cell-free DNA in plasma in Allo-SCT is predominantly of hematopoietic origin [Lui et al., 2002]. All patients had converted into full donor chimera at that time. DNA was extracted with the EZ1 Virus 2.0 Kit (Qiagen, Valencia, CA) on the BioRobot EZ1 extraction platform (Qiagen), following the instructions of the manufacturer. Plasma specimens had been cryopreserved at -70°C, and were retrieved for analysis.

Immunological Monitoring

Enumeration of CMV-specific interferon-gamma (IFN- γ)-producing CD8⁺ and CD4⁺ T cells was carried out by flow cytometry for intracellular cytokine staining-ICS- (BD Fastimmune, BD [Becton Dickinson and Company] Biosciences, San Jose, CA). Whole blood samples were processed within 24–30 hr after collection (in our experience, such a delay in specimen processing has no significant effect on the responsiveness of T cells to CMV). Heparinized whole blood specimens (0.5 ml) were simultaneously stimulated for 6 hr with two sets of 15-mer overlapping peptides encompassing the entire sequence of pp65 and IE-1 CMV proteins (1 μ g/ml per peptide) in phosphate-buffered saline/dimethyl sulfoxide [PBS/DMSO], obtained from JPT Peptide Technologies GmbH (Berlin, Germany), in the presence of 1 μ g/ml of costimulatory mAbs to CD28 and CD49d. Samples mock stimulated with PBS/DMSO (without peptides) and costimulatory antibodies or stimulated with 1 mg/ml of phytohemagglutinin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) were run in parallel. Brefeldin A (10 μ g/ml) was added for the last 4 hr of incubation. Blood was then lysed and frozen at 80°C until tested. On the day of testing, stimulated blood was thawed at 37°C, washed, permeabilized, and stained with a combination of labeled monoclonal antibodies (anti-IFN- γ -FITC, anti-CD69-PE, anti-CD4, or CD8-PerCP-Cy5.5, and anti-CD3-APC, when the IFN- γ CD8⁺ kit was used) for 30 min at room temperature. In some experiments, anti-CD3-APC-Cy7 (BD, Biosciences) was used instead of anti-CD3-APC [Giménez et al., 2015a,b]. Appropriate isotype controls were used (BD FastImmune Tmc2a/c1/CD8/CD3 reacting with keyhole limpet hemocyanin; BD Biosciences). Cells were then washed, resuspended in 200 μ l of 1% paraformaldehyde in PBS, and analyzed within 2 hr on a FACSCalibur flow cytometer using CellQuest software (BD Biosciences Immunocytometry Systems, San Jose, CA). Cells were first gated for lymphocytes (SSC-A vs. FSC-A). The lymphocyte population was analyzed for their surface expression of CD3 and CD8 (or CD4). CD3/CD8- (or CD4-) expressing cells were further gated for their expression of the activation marker CD69 and the intracellular cytokine IFN- γ (see Fig. S1, supplementary material). Cells were analyzed within 2–4 hr of staining on a FACSCalibur flow cytometer using CellQuest software (BD Biosciences Immunocytometry Systems) or on a BD FACScantoII flow cytometer (BD) and analyzed using the programs BD FACS Diva Software (BD Biosciences) and Infinicyt 1.4/1.7 (Cytognos). Data files usually contained at least 1,000 positive events for CD4⁺ or CD8⁺ within the lymphocyte gate. The total number of CMV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells was calculated by multiplying the percentages of CMV-specific T cells producing IFN- γ on stimulation (after background subtraction) by the absolute CD4⁺ and CD8⁺ T-cell counts. A detectable response of >0.1%

(two standard deviations higher than the median of CMV-seronegative individuals) was counted as positive.

IL-28B Measurements

Plasma specimens for IL-28B measurements had been obtained within 2 hr upon reception of blood (samples were centrifuged at 2,000 rpm for 10 min). The plasma fraction was transferred to a new tube and was aliquoted in small, single-use volumes to avoid multiple freeze-thaw cycles. These samples were stored at -80°C until use. Plasma IL-28B levels were determined with an ELISA kit specific for IL-28B (Human IL-28B, Shangai SunRed Biological Technology, Shanghai, China). The ELISA was carried out strictly following the manufacturer's instructions. The sensitivity of the assay is 0.68 pg/ml and the linear range of quantitation is between 0.8 and 2000 pg/ml. According to the manufacturer and to our own observations (data not shown), the intra- and interassay coefficients of variation are <10%. Optical density was determined using a microtiter plate reader at 450 nm. All analyses and calibrations were performed in duplicate (mean values were considered for analyses). Long-term storage (up to 2 years) had no effect on IL-28B measurable levels (data not shown).

Statistical Analyses

Frequency comparisons were carried out using the χ^2 test (Fisher's exact test) for categorical variables. Differences between medians were compared using the Mann-Whitney U-test (two independent variables). The correlation between continuous variables was established by the Spearman Rank test. Two-sided exact *P* values are reported. A *P*-value <0.05 was considered to indicate statistical significance. The IL28B SNP was in Hardy-Weinberg equilibrium in the study groups, as determined by a χ^2 test using 1° of freedom [Bravo et al., 2014]. Pairwise comparisons among the different IL28B genotype groups for each parameter were performed. Data were analyzed with the aid of the statistical package SPSS version 20.0 (SPSS).

RESULTS

Donor IL28B Genotypes and CMV-Specific T-Cell Levels in Allogeneic Stem Transplant Recipients

We first investigated whether the level of CMV-specific T cells measured early after transplant differed among the donor IL28B rs12979860 SNP genotype groups. We selected a total of 85 patients who had not documented CMV DNAemia prior to the time of the first immunological analysis (performed around day +30) (cohort A). Patients with a preceding episode of CMV DNAemia were excluded deliberately, as CMV replication triggers CMV-specific T-cell

expansion, whose magnitude may differ substantially between Allo-SCT recipients. Thirty-six of these patients harbored the donor IL28B/C genotype, 39 the C/T genotype and 10 were homozygous for the minor T allele. There were no significant differences in the clinical and demographic characteristics of patients between the different donor IL28B genotype groups (Table I). The age of patients was also comparable between groups (C/C, median, 51.1 years, C/T, median 51.0 years, and T/T, median 47.5 years; *P*=0.473). In this group, a trend towards a lower incidence of CMV DNAemia was observed for patients carrying the T/T genotype (10% vs. 26% for C/T and C/C patients; *P*=0.262). It must be stressed that the incidence of CMV DNAemia in this study group did not reflect the actual incidence of active CMV infection in Allo-SCT patients (much higher), as patients with CMV DNAemia occurring earlier than the time of immunological monitoring (day +30 in most patients) were not taken into account for this analysis. Peripheral CMV-specific IFN- γ CD8⁺ T-cell counts (total number) were available for all 85 patients. Only 42 patients (donor genotypes: 15C/C, 23C/T, and 4T/T) had CMV-specific IFN- γ CD4⁺ T-cell counts available for analysis. Detectable CMV-specific IFN- γ CD8⁺ T-cell responses were observed

TABLE I. Demographic and Clinical Characteristics of Patients Included in Cohort A According to the Donor IL28B Genotype

Parameter	IL28B genotype (no. of patients)			<i>P</i> -value*
	C/C	C/T	T/T	
Sex				0.095
Female	17	11	6	
Male	19	28	4	
Type of transplant				0.845
Peripheral blood	32	36	10	
Umbilical cord blood	2	1	0	
Bone marrow	2	2	0	
Type of donor				0.131
Related	26	17	7	
Unrelated	10	22	3	
HLA matching				0.568
HLA-matched	33	31	9	
HLA-mismatched	3	7	1	
Unknown	0	1	0	
CMV serology				0.885
D+/R+	22	24	6	
D-/R+	8	12	3	
D-/R-	1	1	0	
D+/R-	5	2	1	
Conditioning regimen				0.481
Myeloablative	22	20	8	
No myeloablative	14	19	2	
Acute graft versus host disease				0.143
Grades 0-I	28	29	5	
Grades II-IV	8	10	5	

D, donor; R, recipient.
* χ^2 test.

more frequently in T/T patients (90%) than in their C/T and C/C counterparts (77%), although the difference did not reach statistical significance ($P = 0.525$). In turn, detectable CMV-specific IFN- γ CD4⁺ T-cell responses were observed at a rather similar frequency for all IL28B genotype groups (75% for TT patients and 78% for C/T plus C/C patients; $P = 0.634$). As shown in Figure 1, median peripheral levels of CMV-specific IFN- γ CD8⁺ and CD4⁺ T cells were not significantly different between the comparative groups.

Plasma Levels of IL-28B According to the Donor IL28B Genotype

A total of 50 out of the 85 patients in cohort A had at least three plasma specimens (median 4; range 3–6) obtained prior to the time of immunological monitoring available for IL-28B quantitation (C/C, $n = 19$; C/T, $n = 26$ and T/T, $n = 5$). Overall, plasma IL-28B levels fluctuated over this period of time, although no specific trend was associated with any particular IL28B genotype (not shown). Both the median IL28B level of all measurements per patient (Fig. 2A) and the peak IL-28B level in these specimens (Fig. 2B) were comparable between the IL28B genotype groups. Likewise, no correlation was found between the peak IL-28B levels and the magnitude of CMV-specific CD8⁺ (Fig. 3A) or CD4⁺ T-cell (3B) responses.

CMV-Specific IFN- γ T Cells After the Onset of CMV DNAemia According to the IL28B Genotype

We next investigated whether the IL28B rs12979860 SNP had any effect on the magnitude of the CMV-specific IFN- γ CD8⁺ and CD4⁺ (when available) T-cell responses triggered by CMV replication. Out of the 57 patients included in this cohort (B), 25 harbored the donor C/C genotype, 23 the C/T genotype, and 9 the T/T genotype. The three groups

did not differ significantly in terms of (i) age (C/C, median, 52 years; C/T, median 55 years; T/T, median 48 years; $P = 0.631$); (ii) demographic and clinical pre- and post-transplant factors known to modulate the susceptibility to active CMV infection and end-organ disease (Table II); (iii) The magnitude of the CMV DNA load at the onset of CMV DNAemia ($P = 0.560$) (Fig. 4A). This is of relevance, as the level of CMV replication has been shown to influence the extent to which CMV-specific IFN- γ CD8⁺ T cells expand [Hakki et al., 2003; Tormo et al., 2010a; 2011; Guerrero et al., 2012]; or (iv) the time elapsed between the onset of CMV DNAemia and the moment at which immunological monitoring was performed (median of around 20 days in all groups; $P = 0.472$). The data indicated that the patients harboring the donor IL28B T/T genotype displayed CMV-specific IFN- γ CD8⁺ T-cell responses of higher magnitude (median, 1.79 cells/ μ l) than their C/T and C/C counterparts (median, 0.45 and 0.19 cells/ μ l, respectively) (Fig. 5A). The difference, however, did not reach statistical significance. This trend, however, was not observed for CMV-specific CD4⁺ T cells (Fig. 5B). In relation to this observation, we found that the plasma CMV DNA peak level during episodes of active CMV infection was substantially lower in patients harboring the IL28B T/T genotype than in the latter group, although statistical significance was not reached ($P = 0.118$) (Fig. 4B). As a result, fewer patients in the T/T group received pre-emptive antiviral therapy (33% in the T/T group, 65.2% in the C/T group, and 80% in the C/C group; $P = 0.05$).

Plasma Levels of IL-28B and CMV-Specific T-Cell Responses in Patients With CMV DNAemia

Plasma specimens obtained prior (one specimen per patient) and during (two specimens per patient) the episode of active CMV infection were available for 27 patients (12C/C, 13C/T, and 2T/T) in group B. All of

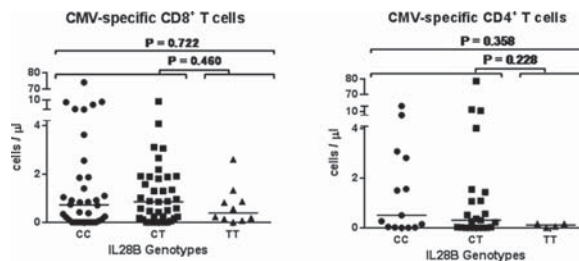


Fig. 1. CMV-specific T-cell responses measured in Allogeneic stem cell transplant recipients with no prior CMV DNAemia according to the donor IL28B (rs12979860) genotype. Peripheral CMV pp65/IE-1-specific IFN- γ -producing CD8⁺ and CD4⁺ T cells total counts (one determination/patient) were available from 85 patients (group A). In these patients, immunological data were obtained on day +30 ($n = 67$), between days +30 and +50 ($n = 13$,

or on day +60 ($n = 5$). Only 42 patients had CMV-specific IFN- γ CD4⁺ T-cell counts available for analysis (data obtained on day +30, $n = 37$ patients, and between days +30 and +50, $n = 5$ patients). Bars indicate median values. Differences between medians were compared using the Mann-Whitney U-test. P values for statistical comparisons between groups are shown (TT vs. CT vs. CC, upper bracket; TT vs. C/T plus C/C, lower bracket).

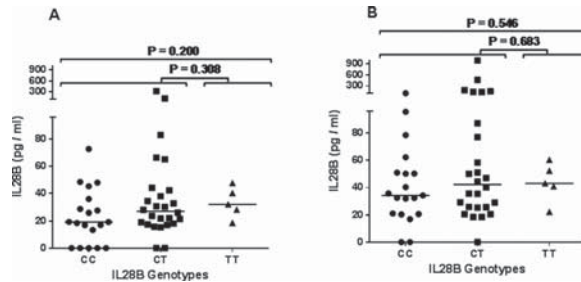


Fig. 2. Plasma IL-28B levels in Allogeneic stem cell transplant recipients with no prior CMV DNAemia according to the donor IL28B (rs12979860) genotype. Plasma IL-28B levels (mean of duplicates) were measured in 50 Allo-SCT patients (cohort A) who had no CMV DNAemia prior to the time of the first immunological analysis (performed around day +30 after transplant). Median values of at least three plasma specimens

per patient, obtained between days 7 and 42 after transplant, are shown in panel A. Median values of IL-28B peak concentrations found in these plasma specimens are shown in panel B. Bars indicate median values. Differences between medians were compared using the Mann-Whitney U-test. *P* values for statistical comparisons between groups are shown (TT vs. CT vs. CC, upper bracket; TT vs. C/T plus C/C, lower bracket).

these samples were drawn prior to the time of immunological monitoring. CMV-specific IFN- γ -CD8⁺ and CD4⁺ T-cell counts were available from 27 and 23 of these patients, respectively, and were enumerated a median of 21 days after detection of CMV DNAemia. The low number of patients in the IL28B T/T group precluded any meaningful analysis via direct comparisons of plasma levels of IL-28B between the three groups. Nevertheless, we investigated whether there was an overall correlation, irrespective of IL28B genotype, between plasma levels of IL-28B and CMV-specific T-cell numbers. A significant inverse correlation was found between IL-28B plasma levels measured prior to the occurrence of CMV DNAemia and CMV-specific CD8⁺, but not CD4⁺, T-cell levels enumerated after CMV DNAemia onset (Fig. 6). Likewise, a trend towards an inverse correlation between plasma IL-28 levels measured after detection of CMV DNAemia and CMV-specific

CD8⁺ and CD4⁺ T cells was observed, although statistical significance was not reached (Fig. 7).

DISCUSSION

An increasing body of clinical and experimental evidence indicates that certain polymorphisms located near or within the IL28B gene may modulate the risk of active CMV infection and the dynamics of CMV replication in the transplantation setting [Bravo et al., 2014; Egli et al., 2014; Fernández-Ruiz et al., 2015; Manuel et al., 2015]. In a prior study, we showed a trend towards a lower incidence of episodes of active CMV infection developing within 100 days after Allo-SCT in patients carrying the homozygous TT genotype of the IL28B (rs12979860) SNP in comparison with their C/C and C/T counterparts [Bravo et al., 2014]. Likewise, we reported that patients homozygous for the T allele had episodes of

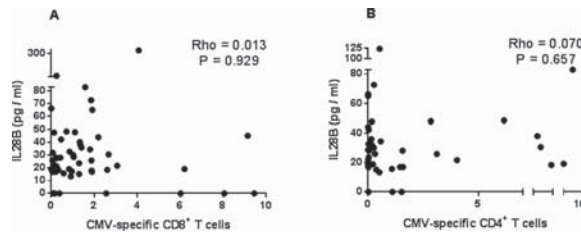


Fig. 3. Correlation between plasma IL-28B levels and CMV-specific T-cell levels in patients with no prior CMV DNAemia irrespective to the donor IL28B genotype. Plasma IL-28B levels (mean of duplicates) were measured in 50 Allo-SCT patients (cohort A) who had no CMV DNAemia prior to the time of the first immunological analysis. Median values of at least three plasma specimens per patient are shown. Correlations of plasma IL-28B

levels with CMV pp65/IE-1 CD8⁺ (panel A) and CD4⁺ (panel B) T-cell levels are shown. Immunological data (a single blood sample per patient) were obtained on day +30 (n=67), between days +30 and +50 (n=13), or on day +60 (n=5). Only 42 patients had CMV-specific IFN- γ CD4⁺ T-cell counts available for analysis. The correlation between these parameters was measured by the Spearman Rank test. Two-sided exact *P* values are shown.

TABLE II. Demographic and Clinical Characteristics of Patients Included in Cohort B According to the Donor IL28B Genotype

Parameter	IL28B genotype (no. of patients)			P-value*
	C/C	C/T	T/T	
Sex				0.701
Female	11	9	5	
Male	14	14	4	
Type of transplant				0.420
Peripheral blood	18	19	6	
Umbilical cord blood	6	2	3	
Bone marrow	1	2	0	
Donor				0.825
Related	12	13	5	
Unrelated	13	10	4	
HLA-matching				0.651
HLA-matched	16	17	7	
HLA-mismatched	9	6	2	
CMV serology				0.613
D+/R+	16	15	8	
D-/R+	8	7	1	
D+/R-	1	1	0	
Conditioning				0.056
Myeloablative	9	5	6	
No myeloablative	16	18	3	
Acute graft versus host disease				0.499
Grades 0-I	17	12	6	
Grades II-IV	8	11	3	

D, donor; R, recipient.
* χ^2 test.

active CMV infection significantly shorter in duration than those displaying the C allele in homozygous or heterozygous form. Thus the data pointed to a protective effect of the T allele against CMV infection.

A decreased incidence of active CMV infection has also been reported to occur in high-risk SOT patients after suspension of antiviral prophylaxis and in CMV-seropositive kidney recipients managed by pre-emptive antiviral therapy strategies and carrying the

IL28B T/T genotype [Egli et al., 2014; Fernández-Ruiz et al., 2015]. Likewise, Manuel et al. [2015] reported that a functional TT/-G polymorphism (rs368234815) in the CpG region upstream of IL28B influences susceptibility to CMV replication in SOT recipients not receiving antiviral prophylaxis.

Egli et al. [2014] reported that IL-28B impairs priming of the adaptive immune response to CMV. In line with this, recombinant IFN- λ was shown to promote the expansion of Foxp3⁺ regulatory T cells [Dolganiuc et al., 2012] in vitro, which may be detrimental to the control of CMV replication [Egli et al., 2012].

In this context, the current work was aimed at determining whether the donor IL28B (rs12979860) SNP had any impact on the magnitude of CMV-specific T-cell response in Allo-SCT recipients. We were first interested in investigating whether this SNP had any influence on the level of CMV-specific T cells measured early after transplant (around day +30). To this end, we selected a cohort of 85 patients who displayed no evidence of CMV DNAemia prior to immunological monitoring and enumerated pp65/IE-1-specific IFN- γ -producing CD8⁺ and CD4⁺ T cells, as the peripheral blood levels of these functional T-cell populations have been shown to correlate closely with protection from CMV viremia [Solano et al., 2008; Tormo et al., 2011].

In this cohort, a trend toward a lower incidence of CMV DNAemia was observed in patients with the IL28B T/T genotype. Interestingly, detectable CMV-specific IFN- γ CD8⁺ but not CD4⁺ T-cell responses were observed more frequently in T/T patients than in their C/T and C/C counterparts, although median levels of peripheral CMV-specific IFN- γ CD8⁺ T-cell precursors were not significantly different between the comparative groups. Also of interest was the fact that both the median and peak plasma IL-28B levels measured prior to the first immunological analysis did not differ significantly between the different IL28B genotype groups.

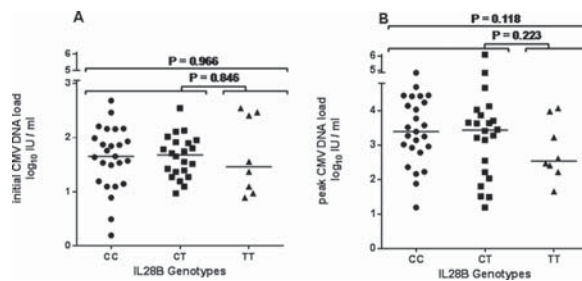


Fig. 4. Virological features CMV DNAemia episodes. Initial CMV DNA load (panel A) and CMV DNA peak load (panel B) of CMV DNAemia episodes developing in patients in cohort B are shown. Bars indicate median values. Differences between medians were compared using the Mann-Whitney U-test. P values for statistical comparisons between groups are shown (TT vs. CT vs. CC, upper bracket; TT vs. C/T plus C/C, lower bracket).

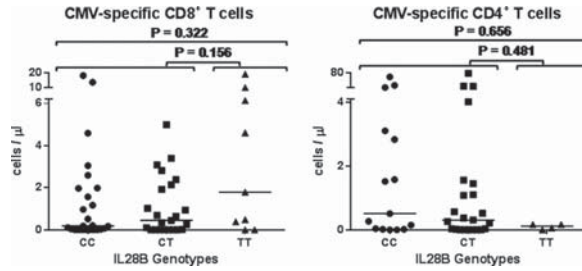


Fig. 5. CMV-specific IFN- γ T cells after the onset of CMV DNAemia according to the IL28B genotype. CMV pp65/IE-1 CD8⁺ and CD4⁺ T cells were enumerated in 57 patients—cohort B—a single determination/patient) a median of around 20 days after CMV DNAemia onset in all groups. CMV-specific CD8⁺ T-cell counts were available for all patients, whereas

CMV-specific CD4⁺ T-cell counts were available only for 27 patients. Bars indicate median values. Differences between medians were compared using the Mann-Whitney U-test. *P* values for statistical comparisons between groups are shown (TT vs. CT vs. CC, upper bracket; TT vs. C/T plus C/C, lower bracket).

We were next interested in determining whether the magnitude of expansion of CMV-specific T cells triggered by CMV replication varied according to the IL28B rs12979860 SNP genotype. To address this issue, we selected a cohort of 57 patients who had an episode of active CMV infection prior to immunological monitoring (group B). In these patients, enumeration of CMV-specific T cells was performed around 20 days after the onset of CMV DNAemia. Our data indicated that patients harboring the IL28B T/T genotype appeared to expand CMV-specific IFN- γ CD8⁺ T cells to a higher level than their C/T and C/C counterparts. This despite the fact that the magnitude of the CMV DNA load at the onset of CMV DNAemia was comparable between groups. In keeping with these observations, we found that plasma CMV DNA peak levels during episodes of active CMV infection were markedly lower in patients harboring the IL28B T/T genotype than in the latter groups, and that pre-emptive antiviral therapy was less likely to be prescribed to IL28B T/T patients.

In patients in group B, a significant inverse correlation between plasma IL-28B levels measured prior to the time of detection of CMV DNAemia (and the time of immunological monitoring) and CMV-specific CD8⁺ T-cell levels was observed. Likewise, a trend towards an inverse correlation between plasma IL-28 levels measured after detection of CMV DNAemia and CMV-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cells was noted. In contrast, no correlation was found between IL-28B levels and CMV-specific T-cell responses in patients with no documented viremia. Although speculative, these data suggested that the detrimental effect of IL-28B on the activation and expansion of CMV-specific CD8⁺ T cells may only be evident in the context of high-level CMV replication episodes in which the virus enters the blood compartment.

There is currently not a conclusive mechanistic explanation accounting for the apparent protective effect of the SNP (rs12979860) T allele against CMV infection in transplant patients. In our hypothesis, patients harboring the T allele in homozygous would be capable of generating stronger functional

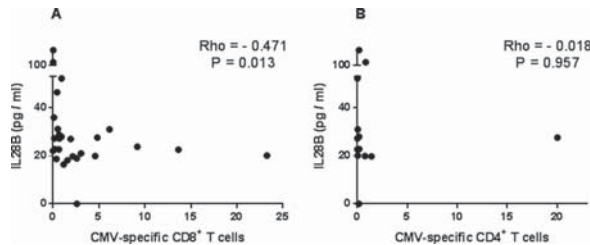


Fig. 6. Correlation between pre-CMV DNAemia plasma IL-28B levels and CMV-specific T-cell responses measured after CMV DNAemia onset. (A) CMV-specific CD8⁺ T cells and (B) CMV-specific CD4⁺ T cells. Plasma specimens obtained prior the episode of CMV DNAemia (one specimen per patient) were available for 27 patients in group B. All of these samples were

drawn prior to the time of immunological monitoring. CMV-specific IFN- γ -CD8⁺ and CD4⁺ T-cell counts were available from 27 and 23 of these patients, respectively, and were obtained a median of 21 days after detection of CMV DNAemia. The correlation between these parameters was measured by the Spearman Rank test. Two-sided exact *P* values are shown.

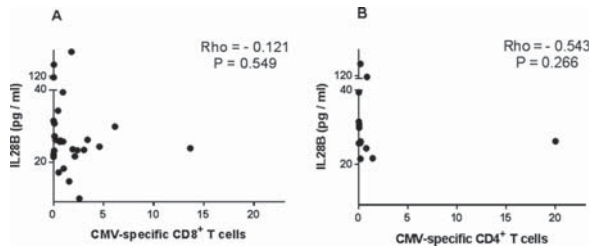


Fig. 7. Correlation between plasma IL-28B levels and CMV-specific T-cell responses measured after CMV DNAemia onset. (A) CMV-specific CD8⁺ T cells and (B) CMV-specific CD4⁺ T cells. Plasma specimens obtained after CMV DNAemia detection were available for 27 patients in group B. All of these samples were drawn prior to the time of immunological monitoring.

Median levels of two determinations/patients are shown. CMV-specific IFN- γ -CD8⁺ and CD4⁺ T-cell counts were available from 27 and 23 of these patients, respectively, and were obtained a median of 21 days after detection of CMV DNAemia. The correlation between these parameters was measured by the Spearman Rank test. Two-sided exact *P* values are shown.

CMV-specific T-cell responses upon virus replication challenge than their C/T and C/C counterparts, perhaps either through a more efficient activation of antigen-presenting cells and T-cell priming, a limited expansion of Treg cells or both.

IL-28B signals signal through an heterodimeric receptor consisting of IL-28R1 chains and IL-10R β , thus inducing an antiviral state, which may partially overlap with that mediated by type I IFNs, as well as immunomodulatory effects [Kotenko et al., 2003; Sheppard et al., 2003]. In support of our hypothesis, pre-treatment of C/T fibroblasts with IL-28B led to a dose-dependent inhibitory effect on CMV-induced IFN- α 2 mRNA expression and notably a marked suppressive effect on antiviral ISG expression. In contrast, anti-inflammatory ISGs (USP18 and SOCS1), remained upregulated during CMV infection [Egli et al., 2014]. Likewise, pre-treatment of fibroblasts with recombinant IL-28B blocked IFN- α 2 induced STAT-2 phosphorylation [Egli et al., 2014]. In this sense, it is well known that the JAK-STAT signaling pathway regulates the expression of a wide array of genes involved in the activation of immune responses upon interaction with interferons and cytokines. We are currently planning to perform several “in vitro” experiments which may lend further support to our hypothesis. First, it seems crucial to demonstrate that the above observations, made in fibroblasts, can be reproduced in antigen-presenting cells. Second, activation and expansion of CMV-specific T cells and generation of Treg cells upon infection of peripheral blood mononuclear cells with CMV should be investigated in individuals harboring the T/T, C/T, or C/C IL28B SNP (rs12979860) genotypes.

The present study has several limitations that deserve comment. First, the relatively low number of patients carrying the donor IL28B (rs12979860) T/T genotype included in the study undermined the robustness of our statistical analyses. In fact, trends, rather than statistically significant associations,

were found throughout these analyses. Although speculative, it is likely that more consistent data could have been obtained had we included more IL28B T/T patients. Unfortunately, given the scarce representation of the T/T genotype among Caucasians, recruiting a sufficient number of T/T patients was out of our reach. In this sense, a multicenter and adequately powered study is warranted to test our hypothesis. Second, the use of non-uniform strategies of pre-emptive antiviral therapy at the participating centers as well as the use of methods for virological monitoring displaying different sensitivities (pp65 antigenaemia and commercially available real-time PCR methods with different limits of detection and quantitation) could have influenced our observations. Third, due to the retrospective nature of our study, a number specimens were not available for immunological measurements. Fourth, the lack of follow-up specimens for determining precisely the kinetics of CMV-specific T-cell expansion after CMV DNAemia detection. Fifth, it is uncertain whether plasma levels of IL-28B correlate with those in organs and tissues. Likewise, the immunomodulatory effect of IL-28B may depend on the extent of expression and distribution of IFN- λ receptors in tissues rather than on IL-28B levels [Dolganuic et al., 2012].

In summary, the data reported herein suggested that Allo-SCT recipients harboring the donor IL28B (rs12979860) T/T genotype may expand CMV-specific functional T cells to a higher extent than C/T and C/C patients, which may result in better control of CMV replication early after transplant. Nevertheless, due to the limitations acknowledged above, further studies including larger cohorts are needed to validate our observations.

ACKNOWLEDGMENT

Paula Amat is a research fellow of the Asociación Española Contra el Cáncer (AECC).

REFERENCES

Boeckh M, Ljungman P. 2009. How we treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood* 113:5711–5719.

Bravo D, Solano C, Giménez E, Remigia MJ, Corrales I, Amat P, Navarro D. 2014. Effect of the IL28B Rs 12979860C/T polymorphism on the incidence and features of active cytomegalovirus infection in allogeneic stem cell transplant patients. *J Med Virol* 86:838–844.

Chinnaswamy S, Chatterjee S, Boopathi R, Mukherjee S, Bhattacharjee S, Kundu TK. 2013. A single nucleotide polymorphism associated with hepatitis C virus infections located in the distal region of the IL28B promoter influences NF-kappaB-mediated gene transcription. *PLoS ONE* 8:e75495.

Clari MA, Bravo D, Costa E, Muñoz-Cobo B, Solano C, Remigia MJ, Giménez E, Benmarzouk-Hidalgo OJ, Pérez-Romero P, Navarro D. 2013. Comparison of the new Abbott Real Time CMV assay and the Abbott CMV PCR Kit for the quantitation of plasma cytomegalovirus DNAemia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 75:207–209.

Corrales I, Giménez E, Solano C, Amat P, de la Cámara R, Nieto J, García-Noblejas A, Navarro D. 2015. 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* 87:248–255.

Dolganic A, Kodys K, Marshall C, Saha B, Zhang S, Bala S, Szabo G. 2012. Type III Interferons, IL-28 and IL-29, are increased in chronic HCV infection and induce myeloid dendritic cell-mediated FoxP3+ regulatory T cells. *PLoS ONE* 7:e44915.

Duggal P, Thio CL, Wojcik GL, Goedert JJ, Mangia A, Latanich R, Kim AY, Lauer GM, Chung RT, Peters MG, Kirk GD, Mehta SH, Cox AL, Khakoo SI, Alric L, Cramp ME, Donfield SM, Edlin BR, Tobler LH, Busch MP, Alexander G, Rosen HR, Gao X, Abdel-Hamid M, Apps R, Carrington M, Thomas DL. 2013. Genome-wide association study of spontaneous resolution of hepatitis C virus infection: Data from multiple cohorts. *Ann Intern Med* 158:235–245.

Egli A, Silva M, Jr., O'Shea D, Wilson LE, Baluch A, Lisboa LF, Hidalgo LG, Kumar D, Humar A. 2012. An analysis of regulatory T-cell and Th-17 cell dynamics during cytomegalovirus replication in solid organ transplant recipients. *PLoS ONE* 7:e43937.

Egli A, Levin A, Santer DM, Joyce M, O'Shea D, Thomas BS, Lisboa LF, Barakat K, Bhat R, Fischer KP, Houghton M, Tyrrell DL, Kumar D, Humar A. 2014. Immunomodulatory function of interleukin 28B during primary infection with cytomegalovirus. *J Infect Dis* 210:717–727.

Fernández-Ruiz M, Corrales I, Arias M, Campistol JM, Giménez E, Crespo J, López-Oliva MO, Beneyto I, Martín-Moreno PL, Llamas-Fuente F, Gutiérrez A, García-Álvarez T, Guerra-Rodríguez R, Calvo N, Fernández-Rodríguez A, Taberneroromero JM, Navarro MD, Ramos-Verde A, Aguado JM, Navarro D. 2015. Association between individual and combined SNPs in genes related to innate immunity and incidence of CMV infection in seropositive kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 15:1323–1335.

Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen EL, Qiu P, Bertelsen AH, Muir AJ, Sulkowski M, McHutchison JG, Goldstein DB. 2009. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 461:399–401.

Giménez E, Blanco-Lobo P, Muñoz-Cobo B, Solano C, Amat P, Pérez-Romero P, Navarro D. 2015a. Role of cytomegalovirus (CMV)-specific polyfunctional CD8+ T-cells and antibodies neutralizing virus epithelial infection in the control of CMV infection in an allogeneic stem-cell transplantation setting. *J Gen Virol* 96:2822–2831.

Giménez E, Muñoz-Cobo B, Solano C, Amat P, de la Cámara R, Nieto J, López J, Remigia MJ, García-Noblejas A, Navarro D. 2015b. 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* 17:361–367.

Guerrero A, Riddell SR, Storek J, Stevens-Ayers T, Storer B, Zaia JA, Forman S, Negrin RS, Chauncey T, Bensinger W, Boeckh M. 2012. Cytomegalovirus viral load and virus-specific immune reconstitution after peripheral blood stem cell versus bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 18:66–75.

Hakki M, Riddell SR, Storek J, Carter RA, Stevens-Ayers T, Sudour P, White K, Corey L, Boeckh M. 2003. Immune reconstitution to cytomegalovirus after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Impact of host factors, drug therapy, and subclinical reactivation. *Blood* 102:3060–3067.

Hermant P, Michiels T. 2014. Interferon-λ in the context of viral infections: Production, response and therapeutic implications. *J Innate Immun* 6:563–574.

Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, Langer JA, Sheikh F, Dickensheets H, Donnelly RP. 2003. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* 4:69–77.

Liu MQ, Zhou DJ, Wang X, Zhou W, Ye L, Li JL, Wang YZ, Ho WZ. 2012. IFN-λ3 inhibits HIV infection of macrophages through the JAK-STAT pathway. *PLoS ONE* 7:e35902.

Loeffler J, Steffens M, Arit EM, Toliat MR, Mezger M, Suk A, Wienker TF, Hebart H, Nürnberg P, Boeckh M, Ljungman P, Tremschel R, Einsele H. 2006. 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* 44:1847–1850.

Lu YF, Mauger DM, Goldstein DB, Urban TJ, Weeks KM, Bradrick SS. 2015. IFNL3 mRNA structure is remodeled by a functional non-coding polymorphism associated with hepatitis C virus clearance. *Sci Rep* 4:16037.

Lui YY, Chik KW, Chiu RW, Ho CY, Lam CW, Lo YM. 2002. Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clin Chem* 48:421–427.

Manuel O, Wójciszewicz A, Bibert S, Mueller NJ, van Delden C, Hirsch HH, Steiger J, Stern M, Egli A, Garzoni C, Binet I, Weisser M, Berger C, Cusini A, Meylan P, Pascual M, Bochud PY. 2015. Influence of IFNL3/4 polymorphisms on the incidence of cytomegalovirus infection after solid-organ transplantation. *J Infect Dis* 211:906–914.

McFarland AP, Horner SM, Jarret A, Joslyn RC, Bindewald E, Shapiro BA, Delker DA, Hagedorn CH, Carrington M, Gale M Jr., Savan R. 2014. The favorable IFNL3 genotype escapes mRNA decay mediated by AU-rich elements and hepatitis C virus-induced microRNAs. *Nat Immunol* 15:72–79.

Mezger M, Steffens M, Semmler C, Arit EM, Zimmer K, Kristjansson GI, Wienker TF, Toliat MR, Kessler T, Einsele H, Loeffler J. 2008. Investigation of promoter variations in dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) (CD209) and their relevance for human cytomegalovirus reactivation and disease after allogeneic stem-cell transplantation. *Clin Microbiol Infect* 14:228–234.

Pérez-Romero P, Blanco-Lobo P, Giménez E, Solano C, Navarro D. 2015. An update on the management and prevention of cytomegalovirus infection following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Future Virol* 10:113–134.

Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, Kuestner R, Garrigues U, Birks C, Roraback J, Ostrand C, Dong D, Shin J, Pressnell S, Fox B, Haldeman B, Cooper E, Taft E, Gilbert T, Grant FJ, Tackett M, Krivan W, McKnight G, Clegg C, Foster D, Klucher KM. 2003. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol* 4:63–68.

Solano C, Muñoz I, Gutiérrez A, Farga A, Prósper F, García-Conde J, Navarro D, Gimeno C. 2001. Qualitative plasma PCR assay (AMPLICOR CMV test) versus pp65 antigenemia assay for monitoring cytomegalovirus viremia and guiding preemptive ganciclovir therapy in allogeneic stem cell transplantation. *J Clin Microbiol* 39:3938–3941.

Solano C, Benet I, Clari MA, Nieto J, de la Cámara R, López J, Hernández-Boluda JC, Remigia MJ, Jarque I, Calabuig ML, García-Noblejas A, Alberola J, Tamarit A, Gimeno C, Navarro D. 2008. Enumeration of cytomegalovirus-specific interferon-λ CD8+ and CD4+ T cells early after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk of active cytomegalovirus infection. *Haematologica* 93:1434–1436.

Sommereyans C, Paul S, Staeheli P, Michiels T. 2008. IFN-lambda (IFN-lambda) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo. *PLoS Pathog* 4:e1000107.

Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C, Kidd J, Kidd J, Kidd K, Khakoo SI, Alexander G, Goedert JJ, Kirk GD, Donfield SM, Rosen HR, Tobler LH, Busch MP, McHutchison JG,

IL28B and Cytomegalovirus Infection

11

- Goldstein DB, Carrington M. 2009. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 461:798–801.
- Tormo N, Solano C, Benet I, Clari MA, Nieto J, de la Cámara R, López J, López-Aldeguer N, Hernández-Boluda JC, Remigia MJ, García-Noblejas A, Gimeno C, Navarro D. 2010a. Lack of prompt expansion of cytomegalovirus pp65 and IE-1-specific IFN γ CD8+ and CD4+ T cells is associated with rising levels of pp65 antigenemia and DNAemia during pre-emptive therapy in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 45:543–549.
- Tormo N, Solano C, Benet I, Nieto J, de la Cámara R, García-Noblejas A, Clari MA, Chilet M, López J, Hernández-Boluda JC, Remigia MJ, Navarro D. 2010b. 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* 82:1208–1215.
- Tormo N, Solano C, Benet I, Nieto J, de la Cámara R, López J, García-Noblejas A, Muñoz-Cobo B, Costa E, Clari MA, Hernández-Boluda JC, Remigia MJ, Navarro D. 2011. Reconstitution of CMV pp65 and IE-1-specific IFN- γ CD8(+) and CD4(+) T-cell responses affording protection from CMV DNAemia following allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 46:1437–1443.
- Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Ishida H, Hiramatsu N, Nagano H, Sugiyama M, Murata K, Fukuhara T, Matsuura Y, Hayashi N, Mizokami M, Takehara T. 2013. Human blood dendritic cell antigen 3 (BDCA3)(+) dendritic cells are a potent producer of interferon- λ in response to hepatitis C virus. *Hepatology* 57:1705–1715.
- Zhang S, Kodys K, Li K, Szabo G. 2013. Human type 2 myeloid dendritic cells produce interferon-lambda and amplify interferon-alpha in response to hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 144:414–425.e7.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

X.1. ANEXO I.

ESCRITO DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL SOBRE EL FACTOR DE IMPACTO DE LAS PUBLICACIONES QUE SE RECOGEN EN LA TESIS DOCTORAL.

A continuación, se expone por orden cronológico el factor de impacto de las revistas en las que se han publicado los artículos compendiados en esta tesis doctoral.

Artículo	Revista	Año de Publicación	Factor de impacto
1	<i>Journal of Medical Virology</i>	2015	2.35
2	<i>American Journal of Transplantation</i>	2015	5.67
3	<i>American Journal of Transplantation</i>	2015	5.67
4	<i>Journal of Medical Virology</i>	2016	2.35

D. David Navarro Ortega,

Catedrático, Facultad de Medicina

Departamento de Microbiología y Ecología

Universidad de Valencia

Valencia, a 19 de enero de 2017

X.2. ANEXO II.

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL SOBRE LA COAUTORÍA DE LAS PUBLICACIONES COMPENDIADAS EN LA TESIS DOCTORAL.

En virtud del cumplimiento del artículo 8.2b del Reglamento sobre Depósito, Evaluación y Defensa de la Tesis Doctoral de la Universidad de Valencia, vigente desde el 28 de junio de 2016, realizo el presente escrito con el fin de justificar la situación de la doctoranda Isabel Corrales Vázquez como segunda firmante en el tercer artículo de la presente tesis doctoral.

La doctoranda, ha realizado la mayor parte de los aspectos microbiológicos contenidos en la tesis doctoral y que incluyen la obtención de los datos, el análisis de resultados y la interpretación de los mismos. Sin embargo, los resultados del tercer artículo nacen de la colaboración con el Hospital 12 de octubre (Madrid), por lo que se le ha otorgado el lugar de primer firmante al Dr. Mario Fernández-Ruiz por ser el director de grupo en trasplante en dicho hospital y los pacientes proceder del mismo.

Por otro lado, el Dr. Mario Fernández-Ruiz ha presentado la renuncia expresa a utilizar la misma aportación para avalar otra tesis doctoral, sea en la modalidad ordinaria o en la de compendio de publicaciones.

Fdo. D. David Navarro Ortega

Valencia, a 19 de enero de 2017

