

PARÁMETROS BIOLÓGICOS PREDICTIVOS DE LA INFECCIÓN ACTIVA PRECOZ POR CITOMEGALOVIRUS EN EL TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PRECURSORES HEMATOPOYÉTICOS

Tesis Doctoral

ALBERTO TALAYA PEÑALVER

Septiembre 2020

Director: David Navarro Ortega

DOCTORADO EN MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y ECOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y
ECOLOGÍA

DOCTORADO EN MEDICINA

**PARÁMETROS BIOLÓGICOS PREDICTIVOS
DE LA INFECCIÓN ACTIVA PRECOZ POR
CITOMEGALOVIRUS EN EL TRASPLANTE
ALOGÉNICO DE PRECURSORES
HEMATOPOYÉTICOS**

Alberto Talaya Peñalver

Director: David Navarro Ortega

Septiembre 2020



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE MIRCUBIOLOGÍA Y ECOLOGÍA

David Navarro Ortega, jefe del Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia y Catedrático de Microbiología de la Universidad de Valencia,

CERTIFICA:

Que el trabajo presentado por el Licenciado Alberto Talaya Peñalver, titulado *“Parámetros biológicos predictivos de la infección activa precoz por Citomegalovirus en el trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos”* ha sido realizado bajo mi dirección, habiendo sido revisado y estando conforme con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere el tribunal designado por la Universidad de Valencia.





PRESENTACIÓN

Esta tesis doctoral se presenta como compendio de publicaciones, en virtud del nuevo Reglamento sobre depósito, evaluación y defensa de la tesis doctoral aprobado en cumplimiento de lo que dispone el Real Decreto 99/2011, del 28 de enero, por el que se regulan las enseñanzas oficiales de doctorado.

Los resultados de esta tesis doctoral se encuentran resumidos en los siguientes artículos científicos:

- I. Talaya, A., Solano, C., Giménez, E., García Giménez, JL., Vinuesa, V., Alberola, J., Pallardó, FV. & Navarro D. (2017). Assessing the risk of citomegalovirus DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients by monitoring oxidative-stress markers in plasma. *J Gen Virol*, 98(7): 1855-1863.
- II. Monleón, D., Talaya, A., Giménez, E., Vinuesa, V., Morales, JM., Hernández-Boluda, JC., Pérez, A., Piñana, JL., Solano, C. & Navarro D. (2018). Validation of a plasma metabolomics model that allows anticipation of the occurrence of citomegalovirus DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Med Microbiol*. 67(6): 814-819.
- III. Talaya, A., Giménez, E., Vinuesa, V., Pérez, A., Amat, P., Piñana, JL., Albert, E., Hernández-Boluda, JC., Solano, C. & Navarro, D. (2019). Kinetics of inflammatory biomarkers in plasma predict the occurrence and features of cytomegalovirus DNAemia episodes in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Med Microbiol Immunol*. 208(3-4): 405-414.
- IV. Talaya, A., Giménez, E., Pascual, MJ., Gago, B., Piñana, JL., Hernández-Boluda, JC., Vázquez, L., García, M., Serrano, D., Hernández, M., Albert, E., Solano, C. & Navarro, D. (2020).



An investigation of the utility of plasma Cytomegalovirus (CMV) microRNA detection to predict CMV DNAemia in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Med Microbiol Immunol.* 209(1): 15-21.

Los artículos que componen esta tesis doctoral forman parte del proyecto FIS financiado por el Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III de Madrid PS 12/01992, titulado “Marcadores inmunológicos y genotípicos de protección frente a la infección por citomegalovirus en el trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos.



A mi hermana y a mis padres.





AGRADECIMIENTOS

Me encuentro en un momento que nunca creía poder alcanzar. Llegar hasta aquí no ha sido fácil, aunque pueda parecerlo. Y, como muchas otras cosas, solo los realmente implicados conocen el precio del camino recorrido. Sé que mis palabras suenan a tópico literario, pero son una verdad absoluta. Al menos para mí en este contexto. De igual forma, también es un tópico añadir que son muchos los que tienen parte de culpa en todo esto. Llegados a este punto, resulta casi imposible nombrar a cada una de esas personas que han tenido parte activa en esta aventura. Pero se me hace obligado intentarlo al menos. Así que allá voy.

En primer lugar, es arduo imposible olvidarse de David, mi director de tesis y tormento personal de un tiempo a esta parte. Todavía no sé qué vio el Dr. Navarro en mí para darme esta oportunidad, en un momento en el que no había muchas. Algunos dicen que conseguí engañarlo con artes oscuras solo al alcance de unos pocos. Pero estoy completamente seguro que eso es imposible en su caso. Gracias, *Boss*.

En segundo lugar, y como no podía ser de otra forma, destacan dos personas en concreto sobre el resto y que se merecen mi más absoluto y sincero reconocimiento. La primera de ellas es Estela. Gracias por ser la antorcha en la noche más oscura. Por atender y solucionar todas mis dudas. Por guiarme y acompañarme en todo el camino. Y por creer, y hacerme creer, que sí era capaz de lograrlo. La segunda es Eliseo. Gracias por ser mi compañero de zulo y de carrera (la otra, aunque también esta). Y por aguantar cada una de mis disertaciones sin sentido. Los dos hemos divagado sobre los más absurdos temas, desde ciencia a deporte, pasando por teología, filosofía y psicología, familia y amigos, salud y enfermedad, mitos y leyendas, literatura, cine y música, política y moral, y cualquier otro descabellado tema que se os ocurra.

También quiero agradecer su paciencia y compañerismo a todos los miembros que forman parte del equipo humano del Servicio de



Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Ellos me han hecho sentir como uno más en esta pequeña familia, aunque no lo fuera propiamente dicho. Gracias a los técnicos, adjuntos y, en especial, al sin fin de residentes que han pasado por allí en todo este tiempo: RF, IT, TP, DH, FB, MM, AV, BO, CS, JF, y LF. Ellos han conseguido evitar que mi cabeza desvariase cuando parecía estar a punto de hacerlo.

Tras ellos, quiero dar las gracias a dos personitas que, en forma de amigos incansables, han estado pendientes de mí durante todo este tiempo, preguntándome, dándome ánimos y aguantando mis quejas y lloriqueos. En resumen, cuidando de mí. Gracias a EBC y HSL. Que sepáis que sois muy pesados. Pero un tipo de pesados que siempre necesitas a tu lado.

Pero, sobre todos ellos, hay tres personas que están por encima del resto y de los que no podría olvidarme en este momento. Mamá, papá, Esther. Lo logré. Lo logramos.

C₁₀H₁₆N₅O₁₃P₃



ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Å: ángstrom. Unidad de longitud empleada para expresar longitudes de onda, distancias moleculares y atómicas.

ACN: acetonitrilo.

Alo-TPH: trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

AM: amplitud modulada.

Arg: arginina.

Asp: ácido aspártico.

AUC: área bajo la curva (por sus siglas en inglés, *área under the curve*).

BSA: albúmina de suero bovino (por sus siglas en inglés, *bovine serum albumin*).

CD4+: linfocito T CD4+.

CD8+: linfocito T CD8+.

CID: enfermedad de inclusión citomegálica generalizada (por sus siglas en inglés, *generalized cytomegalic inclusión disease*).

CP: proteínas carboxiladas (por sus siglas en inglés, *carboxylated proteins*).

CK: citoquinas.

CMV: Citomegalovirus.

C_t: umbral de ciclo. Medición relativa de la concentración del objetivo en la reacción de PCR.



CyA: Ciclosporin A.

D: donante.

D+: serología para CMV positiva para el donante.

D-: serología para CMV negativa para el donante.

D/R: donante/receptor.

D₂O: óxido de deuterio, agua pesada.

DNA: ácido desoxirribonucleico (por sus siglas en inglés, *deoxyribonucleic acid*).

DNAemia: presencia de DNA en sangre.

DNP: dinitrofelin (por sus siglas en inglés, *dinitrophenyl*).

DNPH: 2,4-dinitrofelinhidracina (por sus siglas en inglés, *2,4-dinitrophenylhydrazine*).

DNP-hydrazone: 2,4-dinitrophenylhydrazone.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

EICH: enfermedad injerto contra huésped.

FIS: Fondo de Investigaciones Sanitarias del Ministerio de Sanidad y Consumo de España.

FM: frecuencia modulada.

Ghz: gigahertzios

Glu: glutamina.

GSH: glutatión reducido.



GSX: glutatión.

HCUV: Hospital Clínico Universitario de Valencia.

HHV-5: Herpesvirus humano tipo 5 (por sus siglas en inglés, *Human herpesvirus 5*).

HLA: Antígeno leucocitario humano (por sus siglas en inglés, *Human Leukocyte Antigen*).

HPLC-UV: cromatografía líquida de alta eficacia-luz ultravioleta (por sus siglas en inglés, *high performance liquid chromatography-ultraviolet light*).

HSPG: proteoglicano de heparán sulfato (por sus siglas en inglés, *heparan sulfate proteoglycan*).

HSV-1: Herpesvirus simplex tipo 1 (por sus siglas en inglés, *Herpes simplex virus 1*).

IC95%: intervalo de confianza al 95%.

IFN- γ : interferón gamma.

IgG: inmunoglobulina G.

IgM: inmunoglobulina M.

IP10: proteína 10 inducible por interferón gamma (por sus siglas en inglés, *interferon-gamma inducible protein 10*).

IRF-1: factor 1 de respuesta al interferón (por sus siglas en inglés, *interferon response factor-1*).

IRL: interna repetitiva larga (para secuencias genómicas) (por sus siglas en inglés, *internal repeat long*).



IRS: interna repetitiva corta (para secuencias genómicas) (por sus siglas en inglés, *internal repeat short*).

IV: intravenoso.

kDa: kiloDaltons, unidad de masa atómica. Un dalton (Da) es una unidad estándar de masa definida como la doceava parte de la masa de un átomo, neutro y no enlazado de un carbono-12, en su estado fundamental eléctrico y nuclear.

kpb: kilopares de bases.

L: litros.

\log_{10} : logaritmo en base 10.

Lys: lisina.

mCMV: Citomegalovirus de murinos.

MDA: malondialdehído.

mg: miligramos.

mg/L: miligramos por litro.

mg×días/L: miligramos días por litro.

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad (por sus siglas en inglés, *major histocompatibility complex*).

Mhz: megaherzios

miRBase: base de datos biológica que contiene secuencias de nucleótidos de miRNAs de los diferentes organismos y microorganismos.

miRNA: micro-ácido ribonucleico (por sus siglas en inglés, *micro-*



ribonucleic acid).

miRNAoma: todos los segmentos de miRNA codificados por un genoma.

mL: mililitro.

MMF: micofenolato de mofetilo.

NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (por sus siglas en inglés, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells).

NK: linfocito NK (por sus siglas en inglés, *Natural Killer*).

nm: nanometros.

NMR: resonancia magnética nuclear (por sus siglas en inglés, *nuclear magnetic resonance*).

OR: razón de probabilidades (por sus siglas en inglés, *odds ratio*).

ORF: marco de lectura abierta (por sus siglas en inglés, *open reading frame*).

ORFs: marcos de lectura abierta (por sus siglas en inglés, *open reading frames*).

oriLyt: origen lítico de replicación

P: valor estadístico, entre 0 y 1, que se utiliza para el contraste de hipótesis.

PBST: solución salina tamponada con fosfato que contiene un 0,2% de Tween 20 (por sus siglas en inglés, *phosphate buffered saline containing 0,2% Tween 20*).

pg: picogramos.



pg/mL: picogramos por mililitro.

pg×días/mL: picogramos días por mililitro.

PCR: proteína C reactiva.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés, *polimerase chain reaction*).

PET: terapia preventiva (por sus siglas en inglés, *preemptive therapy*).

PLS-DA: análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (por sus siglas en inglés, *Partial Least Square-Discriminant Analysis*).

Pro: prolina.

ppm: partes por millón.

p53: proteína supresora de tumores.

R: receptor

R+: serología para CMV positiva para el receptor.

R- : serología para CMV negativa para el receptor.

RMN: resonancia magnética nuclear.

RMN-H¹: resonancia magnética de protón.

RNA: ácido ribonucleico (por sus siglas en inglés, *ribonucleic acid*).

RNasa: ribonucleasa, enzima que cataliza la hidrólisis de RNA en componentes más pequeños.

ROC: Característica Operativa del Receptor (por sus siglas en inglés, *Receiver Operating Characteristic*).



ROS: especies reactivas de oxígeno (por sus siglas en inglés, *Reactive Oxygen Species*).

rpm: revoluciones por minuto.

SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

SNC: Sistema Nervioso Central.

SDS: sulfato dodecil de sodio (por sus siglas en inglés, *sodium dodecyl sulfate*).

sTNFR: receptor soluble para el factor de necrosis tumoral (por sus siglas en inglés, *tumor necrosis factor receptor*).

sTNFRs: receptores solubles para el factor de necrosis tumoral (por sus siglas en inglés, *tumor necrosis factor receptors*).

sTNF-R2: receptor soluble de tipo 2 para el factor de necrosis tumoral (por sus siglas en inglés, *tumor necrosis factor receptor type 2*).

Tacro: tracrolimus.

TBA: ácido tiobarbitúrico (por sus siglas en inglés, *thiobarbituric acid*).

td: tiempo de duplicación.

TGF- β 1: factor de crecimiento transformante beta 1 (por sus siglas en inglés, *transforming growth factor β -1*).

Thr: Threonina.

TLR: receptor de tipo Toll (por sus siglas en inglés, *Toll-like receptor*).

TMAO: N-óxido de trimetilamina (por sus siglas en inglés, *trimethylamine N-oxide*).



TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa (por sus siglas en inglés, tumor necrosis factor α).

TRL: terminal repetitiva larga (para secuencias genómicas) (por sus siglas en inglés, terminal repeat long).

TRS: terminal repetitiva corta (para secuencias genómicas) (por sus siglas en inglés, terminal repeat short).

UI/mL: Unidades Internacionales por mililitro (unidad de medida).

UFA: ácidos grasos insaturados (por sus siglas en inglés, *unsaturated fatty acids*).

UL: única larga (para secuencias genómicas) (por sus siglas en inglés, *unique long*).

US: única corta (para secuencias genómicas) (por sus siglas en inglés, *unique short*).

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

VIP: importancia de la variable para la proyección (por sus siglas en inglés, *Variable Importance in Projection*).



ÍNDICE

Presentación.....	V
Agradecimientos.....	IX
Abreviaturas y acrónimos.....	XI
Índice.....	XIX
Introducción.....	1
1. Citomegalovirus.....	3
1.1. Aspectos históricos.....	3
1.2. Estructura.....	4
1.3. Genoma.....	6
1.4. Proteínas víricas.....	8
1.5. Infección.....	10
1.6. Respuesta inmune frente a CMV.....	15
1.6.1. Inmunidad innata.....	15
1.6.2. Inmunidad adaptativa.....	16
1.7. Patogénesis.....	19
1.7.1. Paciente inmunocompetente.....	19
1.7.2. Paciente cardiovascular.....	20
1.7.3. Paciente con cáncer.....	21
1.7.4. CMV durante el embarazo.....	22
1.7.5. CMV en el recién nacido.....	24
1.7.6. Paciente inmunocomprometido.....	25
1.8. CMV en el trasplante de precursores hematopoyéticos.....	26
1.9. Factores de riesgo frente a CMV en el alo-TPH.....	29
2. Estrés oxidativo.....	31
3. Metabolómica.....	33
4. Citoquinas.....	37
5. miRNAs de CMV.....	40
Hipótesis.....	43



Objetivos.....	47
1. Investigación de marcadores de estrés oxidativo como mecanismo predictivo de la infección por Citomegalovirus.....	49
2. Validación del modelo metabólico en plasma que permite la anticipación de la infección por CMV en el Alo-TPH.....	49
3. Investigación de marcadores de inflamación como predictores de la infección activa por CMV.....	50
4. Utilización de los miRNA de CMV presentes en plasma para la predicción de la infección activa por CMV.....	50
Metodología.....	51
1. Manejo terapéutico de la infección sistémica por CMV.....	53
2. Monitorización virológica mediante PCR en tiempo real.....	54
3. Medición de marcadores de estrés oxidativo en plasma.....	56
4. Análisis metabólico en plasma.....	57
5. Medición de marcadores citoquímicos en plasma.....	58
6. Medición de miRNAs de CMV en plasma.....	59
7. Pacientes.....	60
7.1. Investigación de marcadores de estrés oxidativo como mecanismo predictivo de la infección por Citomegalovirus.....	60
7.2. Validación del modelo metabólico en plasma que permite la anticipación de la infección por CMV en el Alo-TPH.....	61
7.3. Investigación de marcadores de inflamación como predictores de la infección activa por	



CMV.....	61
7.4. Utilización de los miRNA de CMV presentes en plasma para la predicción de la infección activa por CMV.....	62
8. Análisis estadístico.....	62
9. Comité ético.....	63
Resultados.....	65
1. Investigación de marcadores de estrés oxidativo como mecanismo predictivo de la infección por Citomegalovirus.....	68
1.1. Incidencia y características de los episodios de DNAemia por CMV.....	68
1.2. Niveles plasmáticos de marcadores de estrés oxidativo como predictores de DNAemia por CMV.....	71
1.3. Parámetros de trasplante basales y marcadores de estrés oxidativo presentes en plasma.....	74
2. Validación del modelo metabólico en plasma que permite la anticipación de la infección por CMV en el Alo-TPH.....	75
2.1. Éxito de la predicción.....	76
2.2. Éxito de la predicción para grupos de alto y bajo riesgo.....	81
2.3. Éxito de la predicción en un solo punto temporal.....	83
3. Investigación de marcadores de inflamación como predictores de la infección activa por CMV.....	84
3.1. Episodios de DNAemia por CMV en la población de estudio.....	84
3.2. Cinética de los biomarcadores inflamatorios plasmáticos en relación a la ocurrencia de DNAemia por CMV.....	86



4. Utilización de los miRNA de CMV presentes en plasma para la predicción de la infección activa por CMV.....	92
4.1. DNAemia por CMV en la población de estudio.....	92
4.2. miRNA de CMV en plasma en pacientes con o sin DNAemia posterior por CMV.....	94
Discusión.....	97
1. Investigación de marcadores de estrés oxidativo como mecanismo predictivo de la infección por Citomegalovirus.....	99
2. Validación del modelo metabólico en plasma que permite la anticipación de la infección por CMV en el Alo-TPH.....	104
3. Investigación de marcadores de inflamación como predictores de la infección activa por CMV.....	107
4. Utilización de los miRNA de CMV presentes en plasma para la predicción de la infección activa por CMV.....	112
Conclusiones.....	117
Bibliografía.....	121
Anexos.....	167
Artículos.....	173

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1. Citomegalovirus

1.1. Aspectos históricos

La primera vez que se tiene constancia de la acción de Citomegalovirus es en el año 1881, aunque por entonces no se sabía de qué se trataba. Ribbert y Jesionek y Kiolemenoglou describen la presencia de unas células “similares a protozoos” en varios órganos de diversos niños y fetos. Pero dichos hallazgos no fueron publicados hasta 1904 (Jesionek & Kiolemenoglou, 1904; Ribbert, 1904). En realidad, lo que vieron eran células citomegalíticas típicas con inclusiones intracelulares (Ho, 2008).

Tiempo después, y tras encontrar lesiones similares (células con inclusiones intracelulares) producidas por otros virus de la familia *Herpesviridae*, se descartó la idea de que estuvieran relacionadas con protozoos (Lipschütz, 1921; VonGlahn & Pappenheimer, 1925). Sin embargo, en 1932 todavía no se conocía la etiología de esta nueva enfermedad, aunque se sugirió el nombre de “enfermedad de inclusión citomegálica generalizada (CID)” para ella.

Fue Minder (Minder, 1953) el primero que vio, mediante microscopía electrónica, partículas de 199 nm que eran sugestivas de ser un virus. No obstante, CMV no pudo cultivarse hasta que no se desarrolló la técnica de cultivo de células humanas. Y no fue hasta 1957 cuando se consiguió dicho logro (Weller, Macauley, Craig, & Wirth, 1957). Gracias a



dos aislados más (Wallace, Janet, Samuel, Horace, & Robert, 1956; Weller et al., 1957), Weller estableció el nombre de “citomegalovirus” para los aislados encontrados.

1.2. Estructura

El Citomegalovirus humano también es conocido como Herpesvirus humano tipo 5 (HHV-5). Es un β -Herpesvirus de la familia *Herpesviridae* y de la subfamilia *Betaherpesvirinae* (tabla 1).

Tabla 1. Herpesvirus humanos.

Subfamilia	Género	Nombre	Designación alternativa
<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Simplexvirus</i>	Herpesvirus humano 1	Herpes simple 1
		Herpesvirus humano 2	Herpes simple 2
<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Varicellovirus</i>	Herpesvirus humano 3	Varicela-Zóster
	<i>Citomegalovirus</i>	Herpesvirus humano 5	Citomegalovirus
	<i>Roseolovirus</i>	Herpesvirus humano 6	HHV-6
		Herpesvirus humano 7	HHV-7
<i>Gammaherpesvirinae</i>	<i>Linfocriptovirus</i>	Herpesvirus humano 4	Virus de Epstein-Barr
	<i>Rhadinovirus</i>	Herpesvirus humano 8	HHV-8

Todos los *Herpesviridae* poseen un genoma empaquetado dentro de una cápside icosaédrica (figura 1). Dicha cápside está embebida en el interior de una matriz proteica densa, conocida como tegumento. Este, a su vez, está rodeado por una envoltura lipídica en la que aparece gran cantidad de glucoproteínas virales. La formación del virión comienza en el núcleo de la célula infectada, mediante el ensamblaje de una procápside esférica. Una vez se forma la cápside madura, esta brota del núcleo y se somete a un proceso de envoltura y desenvoltura conforme atraviesa la membrana nuclear. El virión, que todavía se encuentra en proceso de

maduración, adquiere el tegumento en unos compartimentos perinucleares denominados tegusomas. Para finalizar, la cápside brota de un compartimento derivado del Complejo de Golgi, adquiriendo la membrana lipídica y las glucoproteínas asociadas a ella. Tras esto, la partícula vírica sale de la célula por vía exocitótica (Davison & Bhella, 2007).

La arquitectura de la cápside de CMV (figura 1) es muy similar a la de HSV-1. Esta consiste en una capa icosaédrica hexámero-pentámero

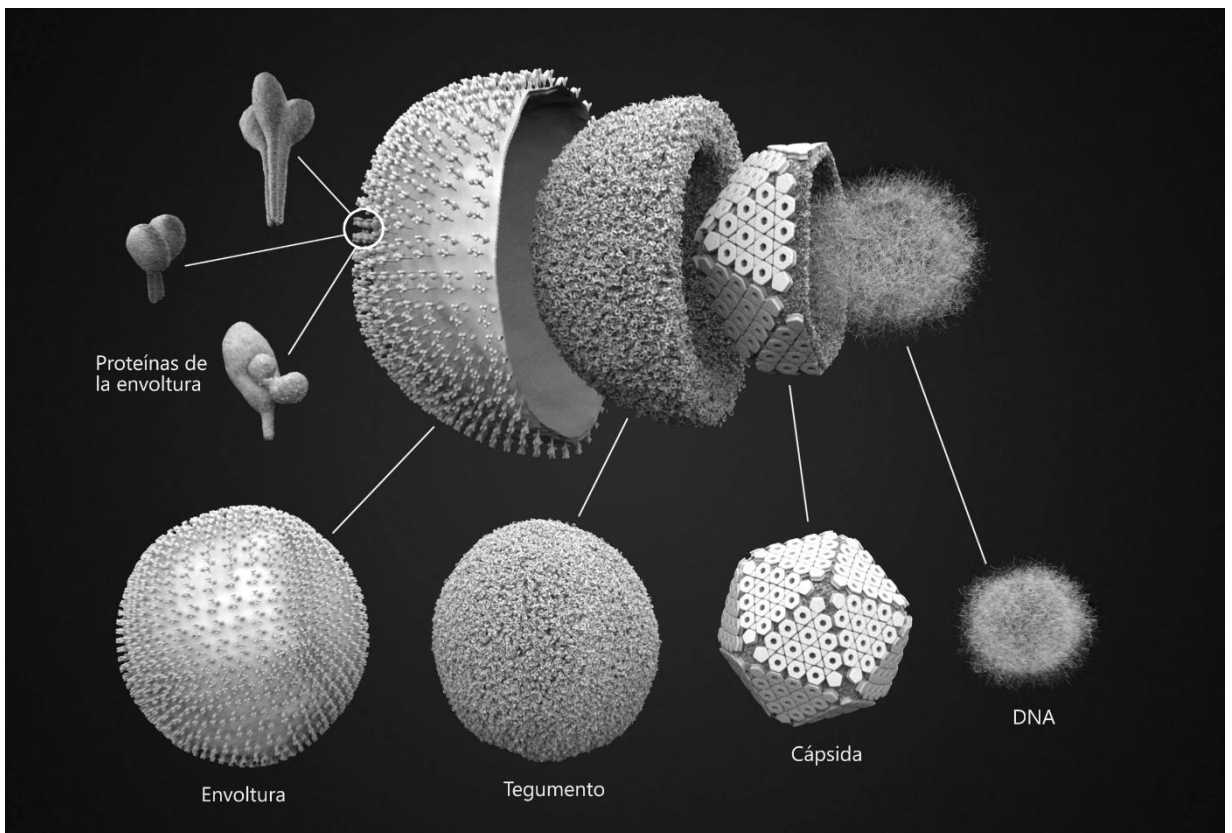


Figura 1. Estructura de una partícula vírica de CMV. Puede apreciarse la diversidad morfológica de las proteínas que conforman tanto la envoltura lipídica como la cápside. Diseño libre de Metazoa Studio.

T=16 (Butcher, Aitken, Mitchell, Gowen, & Dargan, 1998). La cápside es compleja y consta de diversas proteínas estructurales (Gibson, 1996; Irmiere & Gibson, 1985). Los principales componentes estructurales de la



cápside son los capsómeros (pentones y hexones). En total, hay 150 hexones y 12 pentones. Ambos, hexones y pentones, poseen asociadas diversas proteínas más (Trus et al., 2001).

CMV tiene una extensa red de tegumento icosaédrico (figura 1). Este está anclado a la punta de los hexones y pentones, también compuesto por varias proteínas (Chen, Jiang, Lee, Liu, & Zhou, 1999; Trus, Gibson, Cheng, & Steven, 1999; Zhou, Chen, Jakana, Rixon, & Chiu, 1999). Muchas proteínas del tegumento desempeñan un papel en las primeras etapas de la infección por el virus, por lo que se empaquetan dentro del virión para garantizar su presencia en el huésped tras la infección (Roby & Gibson, 1986). CMV incorpora proteínas específicas al tegumento, lo que sugiere interacciones específicas con la célula huésped (Gibson, 1983).

Las proteínas más abundantes en la envoltura viral (figura 1) tienen homólogos en todos los *Herpesviridae*. Estas se distribuyen en tres complejos: gCI, gCII y gCIII (Gretch, Kari, Rasmussen, Gehrz, & Stinski, 1988). gCI y gCII median la unión celular en un proceso de dos pasos (Boyle & Compton, 1998). gCIII está implicado en la mediación de la fusión de las membranas viral y la célula huésped, en concierto con gCI (Mori, Akkapaiboon, Yang, & Yamanishi, 2003). Además, CMV dispone de diversas glucoproteínas específicas de él y que son componentes del virión (Chang, Vesole, Nelson, Oldstone, & Stinski, 1989; Spaderna, Blessing, Bogner, Britt, & Mach, 2002).

1.3. Genoma

CMV tiene el genoma más grande entre los *Betaherpesvirinae*, por



lo tanto, se encuentra muy empaquetado dentro de la cápside (Booy et al., 1991; Zhou et al., 1999). El genoma de CMV está empaquetado en capas separadas a 23 Å, mientras que la cápside posee un diámetro de 130 nm (Butcher et al., 1998). Además del genoma, dentro del núcleo del virión también están presentes dos pequeñas moléculas de RNA (Prichard et al., 1998).

Varias secuencias completas del genoma de CMV han aparecido en la literatura desde su descubrimiento (Chee et al., 1990; Dolan et al., 2004; W. Dunn et al., 2003; Murphy et al., 2003). La cepa AD169 fue la primera en secuenciarse (Chee et al., 1990). Su secuencia es diferente en algunos aspectos en comparación con otras cepas de tipo salvaje (Cha et al., 1996), además de poseer diversas mutaciones adicionales con importantes consecuencias funcionales (Davison et al., 2003; Skaletskaya et al., 2001).

CMV posee 40 de los 43 genes centrales heredados del ancestro común de los α -, β - y γ -*herpesvirinae*. Sin embargo, carece de los genes que codifican la timidina quinasa, la subunidad pequeña de la ribonucleótido reductasa y una proteína que es el origen de la síntesis de DNA utilizada durante la replicación productiva. Además, CMV posee seis genes heredados de los β - y γ -*herpesvirinae*, y 27 genes específicos (Davison & Bhella, 2007).

El genoma de CMV tiene un tamaño de 230 kpb. En él se incluyen 225 marcos de lectura abierta (ORFs), lo que da lugar a 126 proteínas. Su presentación madura es la de un DNA lineal de doble cadena. El genoma del virus consiste en dos únicas secuencias, una larga (UL) y una corta (US). Estas dos secuencias están flanqueadas por otras que son repetitivas invertidas (TRL, IRL, TRS e IRS).



CMV posee un alto grado de variación en una amplia gama de genes (Dolan et al., 2004; Murphy et al., 2003; Pignatelli, Dal Monte, Rossini, & Landini, 2004). Los genes más variables codifican proteínas que son secretadas o asociadas con membranas y que están más expuestas a su selección por parte del sistema inmune del huésped.

1.4. Proteínas víricas

Las glucoproteínas de la envoltura juegan papeles críticos en el ciclo de vida del virus y permiten la unión y la entrada en varios tipos de células. De forma más específica, gB (gCI), gH (gCIII) y gL (gCIII) conforman la maquinaria de fusión central y son necesarias para los pasos de inserción y entrada (Gardner & Tortorella, 2016). La entrada del virus a los fibroblastos se produce mediante la fusión en la superficie celular a través de las tres proteínas. Este proceso es independiente de pH. CMV también precisa de las tres proteínas para entrar en células epiteliales, endoteliales dendríticas y monocíticas. Pero, en este caso, el proceso sí es dependiente de pH (Ryckman, Chase, & Johnson, 2008).

Como ya se ha dicho, la glicoproteína gB, con una naturaleza multifuncional, es necesaria para la entrada en las células y la posterior propagación de CMV de una célula a otra (Isaacson & Compton, 2009). gB interactúa con diversas proteínas de la superficie celular, como integrinas, el receptor del factor de crecimiento epitelial y el receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas, entre otras, así como con proteoglicanos de heparán sulfato para unirse a las células del huésped (Gardner & Tortorella, 2016).



La glicoproteína gH es un componente crítico de la maquinaria de unión y fusión viral. Existe en múltiples complejos de glucoproteínas en la superficie del virión, emparejada a través de un enlace disulfuro con la glicoproteína soluble gL (Ryckman, Rainish, et al., 2008). Los niveles de infección de CMV en las diferentes poblaciones celulares se correlacionan con la abundancia de los complejos formados por estas dos glucoproteínas (Zhou, Lanchy, & Ryckman, 2015).

Muchas proteínas de CMV son expertas en manipular la maquinaria celular que modula el metabolismo celular y la presentación de antígenos (Brune, 2011). La glucoproteínas del virión de CMV poseen características “innatas” que respaldan su capacidad para evadir el aclaramiento neutralizando anticuerpos a través de diversos mecanismos. Estas estrategias permiten que el virión de CMV se disemine libremente e infecte nuevas células, permitiendo la diseminación dentro del huésped y la transmisión a individuos adicionales (Gardner & Tortorella, 2016).

Debido a la gran variabilidad en el genoma de CMV dentro de un mismo huésped, se ha observado la existencia de polimorfismos entre las diferentes glucoproteínas del virus. Es probable que solo una fracción de los anticuerpos neutralizantes del hospedador se vea afectada por estos polimorfismos, limitándose de forma significativa la eficacia de la respuesta inmune humoral (Gardner & Tortorella, 2016). La variabilidad entre las cepas de CMV presentes en un huésped infectado puede proporcionar una estrategia poblacional de evasión inmunitaria. Tal mecanismo puede existir a través de la competencia de epítomos, algunos de los cuales pueden bloquear la unión del anticuerpo o su capacidad para bloquear la infección (Gardner & Tortorella, 2016).

La fosfoproteína pp65 es el componente principal del tegumento



de CMV (Gibson, 1983). Esta proteína tiene capacidad para modular múltiples niveles de vigilancia inmunológica (Mocarski Jr, 2007). pp150 es la segunda proteína más abundante del tegumento y actúa estabilizando la cápside (Baxter & Gibson, 2001).

La proteína pp65, con capacidad quinasa, es capaz de fosforilar la proteína IE-1, bloqueando, así, su procesamiento por las células del huésped y su posterior presentación a la vía de las MHC de clase I (Crough & Khanna, 2009). La presentación de antígenos a través de la vía de las MHC de clase II también se ve obstaculizada por la proteína US2, ya que provoca la degradación de estas proteínas del huésped a través del proteasoma (Tomazin et al., 1999).

En principio, las células infectadas por CMV y que hayan sido privadas de sus MHC, deberían ser vulnerables a la lisis mediada por NK. Sin embargo, CMV implementa varias tácticas para impedir el reconocimiento de las células NK, incluida la expresión de homólogos de clase I para que actúen como proteínas señuelo (Mocarski, 2002).

Además, CMV también codifica una amplia variedad de otros homólogos con funciones subversivas distintas y que imitan el comportamiento de las proteínas del huésped para desviar la respuesta del sistema inmune (Crough & Khanna, 2009).

1.5. Infección

CMV es un virus ubicuo que se encuentra en las poblaciones humanas de todo el mundo y que se adquiere de forma temprana en la vida de los individuos (Santos, 2016). El virus se adquiere, sobre todo,

desde la infancia hasta la edad adulta temprana, a través de la exposición a saliva, lágrimas, orina, heces, leche materna, semen y otras secreciones corporales de individuos infectados. También se puede transmitir a través de trasplantes de órganos y tejidos y transfusiones de sangre (Dioverti & Razonable, 2016).

En el huésped sano inmunocompetente, la infección primaria (figura 2) por CMV suele ser asintomática, aunque también puede presentarse como una enfermedad febril inespecífica o un síndrome infeccioso similar a una mononucleosis (Escobar, Allison, & Dalton, 1970). Tras esto, CMV

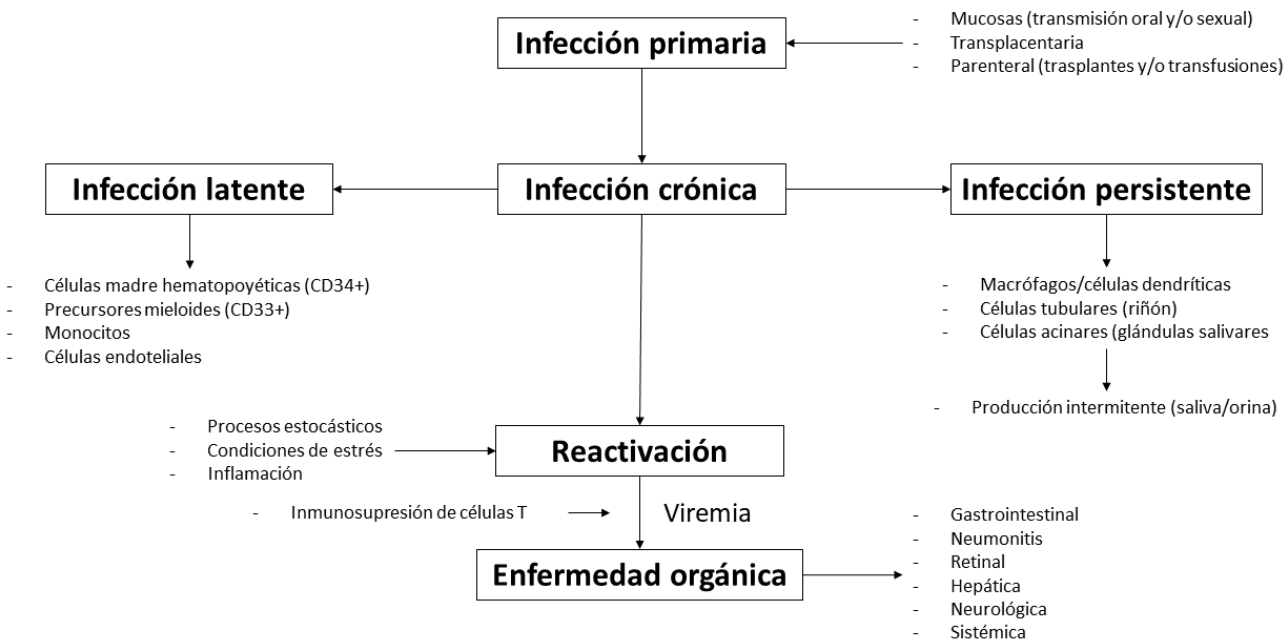


Figura 2. Representación esquemática de la infección por CMV. Tomado de Navarro, 2016.

establece latencia en fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales, monocitos/macrófagos, células del músculo liso, células del estroma, células neuronales, neutrófilos y hepatocitos (Myerson, Hackman, Nelson, Ward, & McDougall, 1984; Sinzger et al., 2000). La infección inicial



conduce a la producción de IgM específica para CMV y, más tarde, anticuerpo IgG (Vauloup-Fellous, Berth, Heskia, Dugua, & Grangeot-Keros, 2013). Su reactivación en huéspedes inmunocompetentes sanos, que ocurre de manera intermitente a lo largo de la vida, desencadena la memoria inmunológica que conduce a un control efectivo de la replicación viral (H. S. Dunn et al., 2002). Por otro lado, la pérdida de células T CD4+ y CD8+ específicas de CMV en el huésped inmunocomprometido (pacientes con VIH y receptores de trasplante de órgano sólido o de células madre hematopoyéticas) puede producir la replicación incontrolada del virus, lo que causaría enfermedad clínica (Eid et al., 2010; Watkins, Lemonovich, & Razonable, 2012).

En 1990 se identificó el origen del ciclo lítico de CMV (Hamzeh, Lietman, Gibson, & Hayward, 1990). Esto provocó la realización de diversos trabajos que llevaron al descubrimiento de los factores necesarios para la replicación del DNA viral. El primero de ellos fue descubrir que la replicación es dependiente oriLyt. Además, la proteína viral IE2 está contenida en un complejo con la proteína viral UL84, que es necesaria para iniciar la síntesis del DNA del virus. El complejo que forma ambas proteínas interactúa tanto con otras procedentes del virus como de la célula huésped. Por último, se encontró una estructura híbrida de RNA-DNA en el origen de replicación (Stinski, 2014)

Dado que el genoma de CMV debe entrar en la célula huésped para iniciar la infección, la membrana plasmática, junto con los constituyentes de la superficie celular sirven, a la vez, como barreras iniciales y como mediadores que facilitan el proceso. En un contexto simple, y dado que CMV es un virus envuelto, la entrada requiere la utilización de proteínas de la envoltura del virión para facilitar la adherencia a la superficie celular



y la posterior fusión de membranas. Esto da como resultado la introducción de componentes del virión en el citoplasma. Posteriormente, las proteínas de la cápside y el tegumento facilitan el transporte a través del citoplasma y la entrada del genoma viral en el núcleo (Teresa Compton & Feire, 2007).

CMV inicia la infección al unirse a los proteoglicanos de heparán sulfato de la superficie celular (HSPG) (T. Compton, Nowlin, & Cooper, 1993). Dado que el virus tiene una gran capacidad para unirse a una amplia variedad de tipos celulares, los esfuerzos para identificar receptores celulares se han visto obstaculizados. En las últimas décadas se han propuesto numerosos receptores, pero ninguno ha resultado ser absolutamente necesario en todos los tipos celulares (Teresa Compton & Feire, 2007).

El mecanismo exacto de fusión todavía no está claro, pero requiere de varios pasos de anclaje y estabilización en el que intervienen diversas proteínas, entre las que se encuentran varias integrinas (Shenk & Stinski, 2008).

Los primeros eventos en la infección por CMV causan una reprogramación global de la transcripción celular (Browne, Wing, Coleman, & Shenk, 2001; Simmen et al., 2001; H. Zhu, Cong, Mamtora, Gingeras, & Shenk, 1998; H. Zhu, Cong, & Shenk, 1997). La misma interacción de unión al receptor durante el proceso de entrada ya desencadena la activación de la respuesta inmune innata y el reclutamiento de células inmunes en el sitio de infección.

Las proteínas del tegumento también actúan al comienzo de la infección por el virus (Shenk & Stinski, 2008). Una vez en el citoplasma, la cápside y algunas de las proteínas del tegumento deben llegar al núcleo.



Para ello, CMV secuestra maquinaria de transporte intracelular de la propia célula huésped (Dohner, Nagel, & Sodeik, 2005; Greber & Way, 2006). Sin embargo, todavía no está claro cómo el genoma viral ingresa en el núcleo.

Una vez que el genoma viral penetra en el núcleo, un subconjunto de él se asocia con estructuras del propio núcleo. Estas asociaciones subnucleares parecen tener un papel en la replicación del genoma, pues solo el DNA que se encuentra cerca de ellas se transcribe (Ishov, Stenberg, & Maul, 1997). Algunas de las proteínas provenientes del tegumento son necesarias para la expresión génica temprana inmediata y la replicación viral posterior (Bresnahan & Shenk, 2000). El DNA viral se une rápidamente a las histonas después de ingresar en el núcleo (Woodhall, Groves, Reeves, Wilkinson, & Sinclair, 2006).

El ciclo lítico de CMV es complejo y se encuentra muy regulado. El origen de replicación contiene múltiples motivos de repetición que comprende dos dominios funcionales principales (UL84 e IE2). UL84 es una proteína temprana que se desplaza desde el núcleo al citoplasma, se une al RNA y suprime la función de activación transcripcional de IE2. Es un factor clave que puede actuar junto a otras proteínas del núcleo para iniciar la replicación lítica, alterando la conformación de una estructura del RNA dentro del origen de replicación (Shenk & Stinski, 2008).

La infección latente ocurre tras la primera infección con el virus. Esta dura de por vida en el huésped y, *a priori*, no se observa una enfermedad manifiesta por el virus en pacientes portadores sanos, debido al control inmunitario efectivo. Sin embargo, sí se observan síntomas clínicos graves asociados con la reactivación de CMV en pacientes inmunocomprometidos (pacientes con trasplante



inmunológico, enfermos de VIH...). Se ha identificado el linaje mieloide como un sitio importante para la latencia y reactivación del virus. Los factores de transcripción celular y las proteínas histonas influyen de forma profunda en la expresión del genoma de CMV. Además, el entorno celular juega, también, un papel crítico en la determinación de una infección lítica o latente y su posterior reactivación. Asimismo, se ha demostrado que ciertos productos de genes virales expresados durante la infección latente juegan un papel activo durante la latencia del virus (Shenk & Stinski, 2008).

1.6. Respuesta inmune frente a CMV

1.6.1. *Inmunidad innata*

El sistema inmune innato juega un papel importante en la defensa frente a CMV y en la preparación de la respuesta inmune adaptativa. Este virus está sujeto a la detección innata de los TLR. La estimulación de estos receptores por patógenos como CMV activa vías de transducción de señales que inducen a la secreción de citoquinas inflamatorias que reclutan células del sistema inmune innato (Crough & Khanna, 2009), y la regulación positiva de moléculas coestimuladoras que son importantes para la activación de procesos inmunitarios adaptativos (Boehme & Compton, 2004).

Las células NK son una parte integral de la inmunidad innata frente a CMV. Se ha demostrado que participan en la eliminación de la infección por mCMV (Bukowski, Warner, Dennert, & Welsh, 1985). Se ha observado



que, en los pacientes con trasplante renal, la actividad de las células NK aumenta durante la infección por CMV (Venema et al., 1994).

1.6.2. Inmunidad adaptativa

El establecimiento de una inmunidad duradera en respuesta a una infección primaria por CMV, que sirve para controlar la posterior reactivación en el huésped, es de vital importancia para prevenir la replicación incontrolada y la enfermedad grave causada por el virus (Crough & Khanna, 2009). CMV es un potente inmunógeno que desencadena una fuerte respuesta inmunitaria. La inmunidad humoral es efectiva contra el virus mediante la restricción de la diseminación viral y la limitación de la gravedad de la enfermedad (Boppana & Britt, 1995). Algunos de los objetivos de los anticuerpos neutralizantes son las proteínas gB y gH (Britt, Vugler, Butfiloski, & Stephens, 1990; Rasmussen, Matkin, Spaete, Pachi, & Merigan, 1991). Se sabe que la transferencia de anticuerpos de una madre seropositiva a un recién nacido protege contra la infección por CMV (Crough & Khanna, 2009).

La respuesta inmune celular es el mecanismo predominante por el que se controla la replicación de CMV, ya que, con la excepción de la infección congénita, la enfermedad grave por CMV ocurre casi exclusivamente en pacientes con inmunodeficiencia celular (Crough & Khanna, 2009).

El papel de las células T se reconoció tras varios estudios en los que la eliminación de estos linfocitos coincidió con un aumento de los niveles de reactivación y diseminación de la infección viral. La posterior



transferencia de linfocitos CD8+ específicos contra el virus confería protección frente a una exposición viral que resultaba letal (Mutter, Reddehase, Busch, Buhring, & Koszinowski, 1988). Se ha demostrado que los linfocitos T CD8+ fetales que son maduros y funcionales se expanden en el útero en respuesta a una infección primaria por CMV (Marchant et al., 2003). En cuanto a otras patologías (SIDA, trasplante de médula ósea...), las células T CD8+ son cruciales para el control de CMV (Crough & Khanna, 2009). La proporción de células T CD8+ frente a CMV es grande. El 10% de los linfocitos T CD8+ que se encuentra en la sangre periférica de portadores del virus sanos está activo frente a CMV, siendo hasta el 40% en personas de edad avanzada (Crough et al., 2005). La respuesta de las células T CD8+ específicas contra CMV es muy diversa, con reconocimiento de una variedad de antígenos estructurales, tempranos y tardíos, además de inmunomoduladores codificados por el virus. Estas respuestas están dirigidas hacia proteínas codificadas por CMV y expresadas en diferentes etapas de la replicación viral, y también contra proteínas asociadas a diversas funciones (Crough & Khanna, 2009). La mayoría de estudios de células T se ha centrado en IE-1 y pp65. Durante la infección aguda por CMV, la población de linfocitos T CD8+ muestra un fenotipo diferente al presente en la infección crónica, en la que pueden coexistir dos tipos de células T específicas (Appay et al., 2002). Otra característica de interés de la respuesta de las células T CD8+ a CMV es la acumulación de un repertorio de células T oligoclonales y una reducción en el conjunto de células T vírgenes (Day et al., 2007). La alta avidéz y eficiencia de la presentación del epítipo viral endógeno, en combinación con las características biofísicas del complejo HLA-péptido, son los principales determinantes que ofrecen una ventaja competitiva para la se-



lección de las células T CD8+ específicas de antígeno en el repertorio de memoria y para la posición en la jerarquía de respuesta (Crough & Khanna, 2009). Con la edad, se produce una acumulación de células T CD8+ (Khan et al., 2004).

Las células T CD4+ también son parte integral del control de la infección por CMV (Crough & Khanna, 2009). En niños que han adquirido CMV, la eliminación prolongada del virus por la saliva y la orina está relacionada con una deficiencia de la inmunidad de células T CD4+ específicas para CMV (Tu et al., 2004). La importancia de las células T CD4+ también se extiende al ámbito del trasplante. Los niveles bajos de estas células se correlacionan con complicaciones infecciosas en receptores de trasplante de pulmón (Sester et al., 2005), y lo mismo ocurre en pacientes con trasplante renal (M. Sester et al., 2001). En pacientes con trasplante de médula ósea, la transferencia de células T CD4+ frente a CMV resulta en una reducción de la carga viral y en la resolución de la viremia (Einsele et al., 2002). Todo esto indica que las células T CD4+ son necesarias para controlar la replicación viral y para la recuperación de la infección (Crough & Khanna, 2009). Igual que ocurre con las células T CD8+, las CD4+ también se encuentran en un alto porcentaje en individuos seropositivos (Crough & Khanna, 2009).

El subconjunto de células T $\gamma\delta$ comprende el 6% de las células T en la sangre de los seres humanos sanos. Este tipo de células parecen desempeñar un papel importante en la inmunidad del huésped a las infecciones virales (Crough & Khanna, 2009). Los pacientes con infección por CMV muestran una mayor acumulación de este subtipo celular en las glándulas salivares (Cavanaugh, Deng, Birkenbach, Slater, & Campbell, 2003). De igual forma, los pacientes sometidos a trasplante ven aumen-

tados los niveles celulares de estos linfocitos cuando tienen una infección activa por CMV (Ninomiya et al., 2000). Todo esto sugiere su clara participación en la respuesta inmune frente al virus (Crough & Khanna, 2009).

1.7. Patogénesis

1.7.1. *Paciente inmunocompetente*

La manifestación clínica más común de infección (figura 2) por CMV en el huésped inmunocompetente es una enfermedad febril autolimitada que se asemeja a la mononucleosis producida por EBV. El cuadro clínico de la mononucleosis es indistinguible de la ocasionada por EBV, con la excepción de que la faringitis, la adenopatía y la esplenomegalia ocurren con menos frecuencia con CMV. Además, la mononucleosis por CMV es heterofilonegativa y representa, aproximadamente, el 10% de los diagnósticos de mononucleosis. La fiebre, el malestar, la mialgia, el dolor de cabeza y la fatiga son los signos y síntomas más comunes. Un número menor de pacientes puede presentar esplenomegalia, hepatomegalia, adenopatía y erupción cutánea. Las pruebas de laboratorio comúnmente revelan linfocitosis, linfocitos activados o atípicos y función hepática anormal (Bravender, 2010; Klemola, von Essen, Henle, & Henle, 1970; Mocarski, Shenk, & Pass, 2007).



1.7.2. Paciente cardiovascular

Existen evidencias que sugieren que la infección por CMV es un agente etiológico en el desarrollo y/o gravedad de las enfermedades cardiovasculares inflamatorias. A partir de la década de 1980, varios estudios establecieron un posible vínculo entre la infección por CMV y el desarrollo de la aterosclerosis. Los investigadores observaron títulos más altos de anticuerpos anti-CMV en estos pacientes que en el grupo de control, lo que concuerda con que la infección por CMV sea un posible factor/cofactor en el desarrollo de la enfermedad (Nieto et al., 1996). Estudios serológicos identificaron una correlación entre la seropositividad para CMV y la gravedad de diversas enfermedades cardiovasculares (Melnick et al., 1983). También se ha informado que los pacientes con enfermedad en la arteria coronaria tienen niveles más altos de proteína C reactiva en el suero sanguíneo, un marcador de la respuesta inflamatoria, que se correlaciona con la seropositividad para CMV, lo que sugiere que la inflamación resultante de la infección por CMV puede servir como factor de riesgo para la enfermedad vascular (J. Zhu, Quyyumi, Norman, Csako, & Epstein, 1999). CMV infecta monocitos, por lo que, cuando se activan, pueden contribuir al desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Los monocitos pueden migrar al tejido arterial, diferenciarse en macrófagos y engullir lipoproteínas de baja densidad oxidadas, convirtiéndose en macrófagos espumosos que se acumulan en las arterias y las lesiones ateroscleróticas. Debido a esto, es posible hipotetizar que la infección viral de monocitos y los cambios biológicos resultantes en estas células contribuyen a la enfermedad aterosclerótica. La misma idea es válida para la infección por CMV de las células endoteliales vasculares y

las células del músculo liso. La infección por CMV está relacionada con daño endotelial, infiltración de monocitos, acumulación de células espumosas y enfermedad vascular (Orloff et al., 2011; Streblow, Orloff, & Nelson, 2001). Por lo tanto, los estudios clínicos y experimentales han proporcionado pruebas sólidas de que la infección por CMV promueve la enfermedad vascular en casi todas las etapas del proceso de la enfermedad (mejora de la respuesta proinflamatoria, lesión vascular, aumento de la migración y proliferación de células del músculo liso, migración de monocitos a lesiones, formación de macrófagos espumosos, desarrollo de placas y otros cambios biológicos consistentes con un papel en la enfermedad vascular) (Nogalski, Collins-McMillen, & Yurochko, 2014).

1.7.3. Paciente con cáncer

La posible relación entre la infección por CMV y el cáncer se ha debatido durante décadas y se ha argumentado que este virus está asociado con una variedad de tumores malignos. Los estudios seroepidemiológicos, así como la detección de ácidos nucleicos virales y/o antígenos en tejidos malignos, sugieren un papel etiológico para el CMV en el desarrollo de varios tipos de cáncer. Sin embargo, no está claro si el virus es el agente causal de alguno de ellos, ya que no se ha demostrado que pueda transformar las células (Michaelis, Doerr, & Cinatl, 2009). Por otro lado, CMV posee muchas de las características moleculares de los pequeños virus tumorales de DNA (alterando la función p53, induciendo la proliferación celular, mejorando la supervivencia celular, etc.), lo que



sugiere, al menos desde un punto de vista molecular, que podría ser un agente etiológico en el desarrollo y/o progresión tumoral (E et al., 2011; Shen, Zhu, & Shen, 1997). También se ha sugerido que CMV podría infectar las células tumorales y mejorar su malignidad, promoviendo así la progresión del tumor sin ser un virus oncogénico *per se* (Soderberg-Naucler & Johnsen, 2012). Existen múltiples mecanismos moleculares que pueden contribuir a la oncomodulación inducida por CMV. La evidencia experimental sugiere que CMV altera el ciclo celular e inhibe la apoptosis en las células cancerosas infectadas, promoviendo así la proliferación y supervivencia de las células. La infección por CMV también parece influir en la invasión, la migración y la adhesión endotelial de células malignas, lo que puede contribuir a complicaciones metastásicas en pacientes infectados por el virus. Además, se ha demostrado que la infección por CMV promueve la angiogénesis, un proceso que es fundamental para el inicio y la progresión de tumores malignos. También disminuye la inmunogenicidad de las células cancerosas y causa anormalidades cromosómicas en las células infectadas. Sin embargo, la relación entre la infección por CMV y el cáncer no está clara, ni mucho menos resuelta, y sigue siendo una cuestión importante en el área de la patogénesis del virus (Michaelis et al., 2009).

1.7.4. CMV durante el embarazo

La infección congénita por CMV ocurre cuando el virus cruza la barrera placentaria, permitiendo la transmisión del virus de la madre al feto. Pero solo alrededor del 10% de los recién nacidos con infección



congénita muestran síntomas de la enfermedad (Manicklal, Emery, Lazzarotto, Boppana, & Gupta, 2013). Si la mujer era seropositiva antes de la concepción, el riesgo de que un recién nacido se infecte congénitamente es bajo y oscila alrededor del 1% en los países desarrollados, con un pequeño número de niños gravemente afectados por la enfermedad (Fowler et al., 1992). Los bebés con infección congénita pueden tener una enfermedad multisintomática que afecta a muchos órganos y que va desde la neumonía, pasando por enfermedades gastrointestinales y retinianas, hasta enfermedades del sistema nervioso central (Mussi-Pinhata et al., 2009). La enfermedad congénita por CMV también puede manifestarse como una enfermedad hematológica con, por ejemplo, trombocitopenia y anemia hemolítica en la que se observan anormalidades. Además, puede provocar ictericia, hepatitis, hepatoesplenomegalia, petequias y trombocitopenia en el recién nacido infectado (Mocarski et al., 2007). Aunque los síntomas generalmente desaparecen unas pocas semanas después del nacimiento, la enfermedad puede ser grave para algunos recién nacidos, e incluso puede provocar la muerte neonatal en un pequeño porcentaje de casos (Vancikova & Dvorak, 2001). Más del 50% de los casos de infección congénita por CMV se presentan con anomalías en el SNC. Estas anormalidades a menudo causan una variedad de síntomas neurológicos, como retraso mental, disminución de las habilidades motoras y pérdida de audición y/o visión (Mocarski et al., 2007). Según la prevalencia y la gravedad de la enfermedad, la infección congénita por CMV se considera una de las principales causas de daño del SNC en niños. (Manicklal et al., 2013; Mocarski et al., 2007).



1.7.5. CMV en el recién nacido

El sistema inmunitario de un recién nacido generalmente no se desarrolla completamente hasta aproximadamente 6 meses después del nacimiento. Por lo tanto, tienen una menor capacidad para generar respuestas inmunes efectivas a los patógenos. Sin embargo, los anticuerpos maternos transferidos a través de la placenta y los anticuerpos transferidos a través de la leche materna suelen servir para proteger a los recién nacidos de las infecciones durante sus primeros años de vida (Nogalski et al., 2014). Con respecto a la infección por CMV, los recién nacidos pueden infectarse en el útero, por transmisión intraparto o por consumo de leche materna que contenga el virus (Nassetta, Kimberlin, & Whitley, 2009). Aunque los recién nacidos no suelen presentar una enfermedad significativa si se infectan temprano en la vida, se han informado casos de hepatomegalia, enzimas hepáticas elevadas e inflamación del tejido pulmonar (Kumar, Nankervis, Cooper, & Gold, 1984). Sin embargo, el riesgo de complicaciones aumenta en los bebés prematuros. En estos casos informados, los síntomas sugirieron disfunción multiorgánica. En los recién nacidos prematuros, los riesgos de complicaciones asociadas con la infección incluyen trombocitopenia, neutropenia, apnea, disfunción hepática, síndrome de sepsis y un trastorno similar a la mononucleosis (Hamprecht et al., 2001).

1.7.6. Paciente inmunocomprometido

CMV está considerado como uno de los patógenos oportunistas más comunes observados en pacientes inmunocomprometidos. Estos pacientes corren el riesgo de contraer una enfermedad mediada por el virus como resultado de una infección primaria, una reinfección (de un huésped ya seropositivo) y una reactivación del virus latente. Se ha documentado que cuanto más fuerte es la supresión del sistema inmune, mayor es el riesgo de enfermedad mediada por el virus. Los pacientes con trasplante alogénico de células madre y pacientes con SIDA se caracterizan por tener las manifestaciones más graves de la enfermedad. La infección por CMV y la enfermedad también se observan en trasplantes de órganos sólidos y pacientes con cáncer sometidos a terapia inmunosupresora. Las manifestaciones clínicas en estos pacientes pueden variar desde una enfermedad febril corta hasta la afectación de múltiples órganos (Mocarski et al., 2007). Los síntomas más comunes de la enfermedad por CMV en pacientes con trasplante de órganos sólidos son fiebre, leucopenia, malestar general, dolor en las articulaciones y erupción macular. Sin embargo, también se han informado complicaciones más graves, como neumonitis, ulceración gastrointestinal, función hepática anormal, enfermedad coronaria acelerada, infección fúngica y bacteriana, y deterioro y/o rechazo del injerto (Eid & Razonable, 2010). Las manifestaciones más comunes de la enfermedad por CMV en pacientes con SIDA son retinitis, esofagitis y colitis. Los informes de casos también han documentado encefalitis, neuropatía, polirradiculoneuritis, neumonitis, gastritis y disfunción hepática (Cheung & Teich, 1999).



1.8. CMV en el trasplante de precursores hematopoyéticos

CMV es un virus que causa gran morbilidad y mortalidad en receptores de trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos. La reactivación (figura 2) del virus es muy común en receptores seropositivos para CMV. Entre el 45 y el 85% de los receptores de este tipo de trasplante experimenta uno o más episodios de infección activa por CMV dentro de los primeros 100 días tras el trasplante. En ausencia de un tratamiento adecuado, entre el 25 y el 30% de estos pacientes desarrollarán enfermedad de órgano terminal por CMV (Carlos Solano & Navarro, 2010). La recepción de un injerto con baja cantidad de células T, un injerto de un donante no relacionado y/o no compatible con las proteínas HLA, el tratamiento con globulina antitimocítica o alemtuzumab como parte del régimen de acondicionamiento, la inclusión de micofenolato mofetilo en la profilaxis para la enfermedad de injerto contra huésped y el uso de una dosis alta de corticoides aumenta el riesgo de la infección por el virus (Carlos Solano & Navarro, 2010). La recepción de un injerto de donante seronegativo para CMV se asocia con la reconstitución tardía de respuestas de células T específicas de CMV funcionales, lo que lleva a una duración más prolongada de los tratamientos preventivos y aumenta la tasa de infecciones recurrentes (Carlos Solano & Navarro, 2010).

Existe la posibilidad de que un paciente seropositivo para CMV sea re infectado por una cepa viral distinta procedente del donante. Pero en la actualidad se desconoce la importancia clínica de este evento. La infección primaria se desarrolla en alrededor el 30% de los pacientes seronegativos para el virus que reciben un injerto de un donante seropositivo para CMV, y puede progresar a enfermedad por CMV si el



tratamiento antiviral no se administra con rapidez. Los pacientes seronegativos que reciben un injerto de donantes seronegativos tienen un riesgo bajo de desarrollar la infección, siempre que los productos sanguíneos de donantes seropositivos para el virus se filtren según las prácticas estándar antes de ser infundidos (Ljungman et al., 2008).

CMV puede causar enfermedad orgánica (figura 2) (neumonía intersticial, enfermedad gastrointestinal, hepatitis, retinitis y encefalitis) después del trasplante como resultado de la citopatogenia del virus, y tiene mal pronóstico a pesar del inicio oportuno de la terapia antiviral. La enfermedad gastrointestinal y la neumonía intersticial son los síndromes clínicos más comunes asociados a la infección activa por el virus, siempre dentro del entorno del alo-TPH (Michael Boeckh et al., 2003).

Se han desarrollado dos estrategias diferentes para prevenir la enfermedad por CMV: la profilaxis universal, en la que se administra terapia antiviral a todos los pacientes, y la terapia preventiva, que consiste en administrar antivirales al detectar CMV en sangre. Ambas estrategias son efectivas para prevenir el desarrollo de la enfermedad temprana por CMV. Sin embargo, la profilaxis antiviral conduce a una mayor toxicidad, una mayor incidencia de infecciones bacterianas o fúngicas debido al desarrollo de neutropenia severa, una mayor probabilidad de desarrollo de resistencia a los medicamentos y una inmunidad de células T específica de CMV de reconstitución tardía, lo que puede conducir a una mayor incidencia de enfermedad tardía por CMV (M. Boeckh et al., 2003; Zaia, 2002). La terapia preventiva requiere un monitoreo virológico frecuente mediante PCR en tiempo real para detectar la presencia de CMV en sangre, antes de que se desarrolle la enfermedad por CMV. La terapia antiviral se suele interrumpir después de



dos resultados negativos. Hasta la fecha, no existen criterios de consenso para el inicio de la terapia preventiva en relación al número de copias de DNA por mililitro detectadas en sangre a partir de la PCR (Carlos Solano & Navarro, 2010).

La presencia de signos y síntomas clínicos compatibles con la enfermedad por CMV, los signos compatibles en pruebas complementarias y la detección de CMV en muestras clínicas, además de pruebas histopatológicas, inmunohistoquímicas o hibridación *in situ* permiten el diagnóstico de la enfermedad por el virus (Carlos Solano & Navarro, 2010).

Algunas drogas han sido autorizadas para el tratamiento de la infección por CMV. El ganciclovir y el profármaco valganciclovir son los medicamentos de primera línea para la profilaxis, la terapia preventiva de la infección activa por CMV y el tratamiento de la enfermedad por CMV. La neutropenia, la anemia y la trombocitopenia son los efectos secundarios más frecuentes asociados con la terapia con ganciclovir. Foscarnet, otro fármaco, se utiliza de forma general en pacientes con graves neutropenias o cuando se demuestra resistencia al (van)ganciclovir (Ljungman et al., 2008). La insuficiencia renal es el efecto secundario más relevante asociado con su uso, lo que impide utilizarlo en receptores de alo-TPH. Otras drogas muestran actividad *in vitro* frente a CMV, pero existe una experiencia limitada en su uso clínico y ninguno está exento de efectos secundarios tóxicos (Baldanti, Lurain, & Gerna, 2004; Gilbert & Boivin, 2005).

La transferencia de células T específicas contra CMV de donantes seropositivos para el virus se ha convertido en una alternativa, dado que es una técnica segura desde un punto de vista clínico, así como efectiva



para prevenir el desarrollo de la infección activa y para resolver la infección que no responde a la quimioterapia antiviral (Tuthill et al., 2009).

1.9. Factores de riesgo frente a CMV en el alo-TPH

La incidencia de pacientes con reactivación de la infección por CMV tras el trasplante es de un 30% (Schmidt-Hieber et al., 2013). El tiempo medio en el que suele aparecer la reactivación oscila entre los 27 días y los 46, siendo independiente el estado serológico del donante y del receptor (Teira et al., 2016), mientras que el tiempo medio hasta el desarrollo de la enfermedad se alarga hasta el día 104 (Ljungman et al., 2006). La profilaxis antiviral puede retrasar la reconstitución de los linfocitos T específicos contra CMV, lo que aumenta el riesgo de que se desarrolle una reactivación de la infección a partir del día 100 tras el trasplante (Nichols, Corey, Gooley, Davis, & Boeckh, 2002).

La reactivación de la infección por CMV en pacientes, después de un trasplante, está influenciada por una serie de factores de riesgo relacionados tanto con el receptor como con el donante, así como con las características propias del trasplante, el tratamiento inmunosupresor y la recuperación inmunitaria tras el alo-TPH (Ljungman et al., 2006). La reactivación precoz tiene lugar en pacientes sin profilaxis contra CMV, mientras que la reactivación tardía ocurre en aquellos pacientes que ya habían completado un profilaxis previa o estaban con una estrategia anti-CMV basada en un tratamiento preventivo (Ljungman et al., 2006).

En los receptores de este tipo de trasplante, el factor de riesgo más



importante para la enfermedad por CMV parece ser el estado serológico del donante y del receptor. Los pacientes seronegativos que reciben células madre de donantes seronegativos tienen un riesgo muy bajo de infección primaria (Ljungman, Hakki, & Boeckh, 2010). Las tasas de reactivación varían dependiendo del resto de combinaciones donante/receptor (D-/R+, 32-33%; D+/R+, 28/32%; D+/R-, 9-11%; D-/R-, 2-4%) (Schmidt-Hieber et al., 2013). Además, los trasplantes D+/R+ generan niveles más altos de células T multifuncionales específicas contra CMV en comparación con los trasplantes D-/R+ (W. Zhou et al., 2009).

El riesgo de reactivación de CMV también es mayor en pacientes con acondicionamiento mieloablativo (de intensidad estándar) en comparación con los de acondicionamiento no mieloablativo (de intensidad reducida) (Nakamae et al., 2009). El acondicionamiento de intensidad reducida es menos tóxico, lo que da como resultado el establecimiento inicial de un quimerismo de células T mixto, con presencia prolongada de inmunidad de células T del huésped (Nakamae et al., 2009). Sin embargo, este efecto no parece proteger contra las complicaciones graves que CMV provoca (Nakamae et al., 2009).

En la mayoría de estudios, el riesgo de reactivación de CMV es mayor en trasplantes con un donante no emparentado o no compatible (Lin et al., 2002; Marty et al., 2007; Nakamae et al., 2009; Takenaka et al., 2015).

No obstante, en lo que se refiere a la fuente de las células madre que se utilizan en el trasplante, no parece haber diferencias significativas entre los diferentes grupos (Walker, van Burik, De For, & Weisdorf, 2007).

El EICH agudo o crónico es el factor de riesgo de reactivación y enfermedad por CMV predominante en todos los estudios, tanto a nivel

de reactivación temprana como tardía, independientemente de otros factores como el tratamiento utilizado o el tipo de donante (Ljungman et al., 2010; Ljungman et al., 2006; Takenaka et al., 2015; Teira et al., 2016; Walker et al., 2007).

Los regímenes inmunosupresores basadas en sirolimus reducen la incidencia acumulada de enfermedad por CMV, debido a que este fármaco posee propiedades antiproliferativas y, probablemente, inhibe la cinética de la replicación de CMV (Kudchodkar, Yu, Maguire, & Alwine, 2006; Marty et al., 2007; Mise, Dembitz, Banfic, & Visnjic, 2011).

Por todo esto, se precisa de modelos de parámetros biológicos que predigan aquellos pacientes que van a desarrollar una reactivación de la infección por CMV. A continuación, se introducen, de forma somera, cuatro parámetros biológicos, los cuales han sido elegidos para desarrollar los cuatro modelos que se presentan en este documento de tesis.

2. Estrés oxidativo

Las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés, *reactive oxygen species*) es un término utilizado para referirse a una serie de moléculas inestables, reactivas, derivadas de la reducción parcial de oxígeno y que se crean como subproducto del normal funcionamiento del metabolismo (Wang & Yi, 2008). Algunas de ellas son: el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión superóxido (O_2^-), el oxígeno singlete (1O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$), entre otras. Todas ellas actúan como segundos mensajeros en la señalización celular y son esenciales en diversos procesos biológicos del metabolismo (Andersen, 2004). Así mismo, dentro de



los mecanismos de balance intracelular, también existen diferentes enzimas y otras formas de moléculas antioxidantes que cooperan para eliminar las ROS y mantener el correcto funcionamiento del sistema metabólico (Nathan & Cunningham-Bussel, 2013). Esto se debe a que las ROS son un mecanismo de estrés oxidativo que está involucrado, también, en la toxicidad celular (Furue, 1995). Por tanto, la homeostasis de las ROS es esencial durante la función celular.

En la presente tesis, se hace referencia a dos subproductos del metabolismo del estrés oxidativo. Por tanto, se precisa realizar una introducción con una minúscula explicación de qué son. El MDA es un componente orgánico que se origina durante la peroxidación de lípidos de ácidos grasos poliinsaturados. Las proteínas carboxiladas (CPs), sin embargo, son derivados carbonilo formados por el ataque oxidativo a las cadenas laterales de proteínas con aminoácidos prolina, arginina, lisina y treonina.

El MDA es un producto final generado por la descomposición del ácido araquidónico y los ácidos grasos poliinsaturados, a través de procesos enzimáticos y no enzimáticos (Esterbauer, Schaur, & Zollner, 1991). El MDA producido mediante procesos enzimáticos se caracteriza por actuar como mensajero en la señalización celular y puede regular la expresión génica (Ayala, Munoz, & Arguelles, 2014). Por el contrario su producción mediante procesos no enzimáticos se origina en condiciones de estrés y tiene una alta capacidad de reacción con múltiples biomoléculas como proteínas o DNA, además de estar asociado con diferentes estados patológicos (Garcia et al., 2013; Luczaj & Skrzydlewska, 2003), y es el originado mediante este proceso el de mayor interés en el caso aquí estudiado.



La carboxilación de proteínas es el tipo de daño más utilizado para inferir el estrés oxidativo, debido al hecho de que las modificaciones de carbonilo pueden ser producidas por una amplia variedad de ROS. Sin embargo, se cree que las carboxilaciones proteicas específicas tienen una importancia adicional, más allá de su uso como biomarcador, porque pueden funcionar como señales biológicas o conferir una pérdida irreversible de la función proteica en relación con la enfermedad. En general, hay tres tipos de modificaciones oxidativas de aminoácidos que puede dar lugar a proteínas carbonilos (Yan & Forster, 2011):

- 1- Ataque directo de especies reactivas de oxígeno en ciertas cadenas laterales de aminoácidos (Glu, Thr, Asp, Lys, Arg y Pro).
- 2- Modificación de los residuos de histidina, cisteína y lisina por productos de peroxidación lipídica como el MDA.
- 3- Reacción con azúcares reductores, formando aductos de productos finales de glicación avanzada.

3. Metabolómica

El estudio metabolómico se basa en análisis cualitativos y cuantitativos de los productos finales de un organismo específico o un grupo de células (Liu et al., 2016). El estudio metabolómico permite analizar metabolitos de bajo peso molecular, dependientes del estado metabolómico de la célula, tejido, biofluido u organismo que se quiera analizar. Un perfil metabolómico incluye cualquier compuesto, ya sea de origen endógeno o exógeno, que se encuentre en ese momento en la célula (u otra unidad de estudio), como pueden ser: péptidos,



aminoácidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, ácidos grasos, ácidos orgánicos, vitaminas, hormonas, drogas, aditivos alimentarios, etc (Locci et al., 2013). La metabolómica es la plataforma ómica que refleja de forma más directa el estado fisiológico de la unidad de estudio. Permite conocer el perfil concreto de metabolitos de dicha unidad en un momento dado, ya que proporciona la unión entre genotipo y fenotipo (Goodacre, 2005). El estudio metabolómico por RMN (o por cualquier otra técnica) proporciona una “imagen instantánea” de aquello que se está midiendo.

El enfoque metabolómico consiste en dos pasos secuenciales: una técnica analítica, que se usa para medir la concentración de los múltiples metabolitos que se encuentran en nuestra muestra de estudio; y una técnica de procesamiento de datos que se usa para identificar patrones mediante el uso de complejas bases de datos (Locci et al., 2013).

La RMN es una técnica que permite el estudio de los metabolitos sin destruirlos, lo cual es una facilidad añadida a la hora de estudiar material de difícil obtención, como fluido cerebroespinal, fluidos digestivos u otros, y que requiere mucha concentración de los metabolitos a estudiar para poder detectarlos. El estudio mediante RMN se basa en el mismo principio físico que utiliza un aparato de resonancia magnética disponible en cualquier hospital; sin embargo, el rango

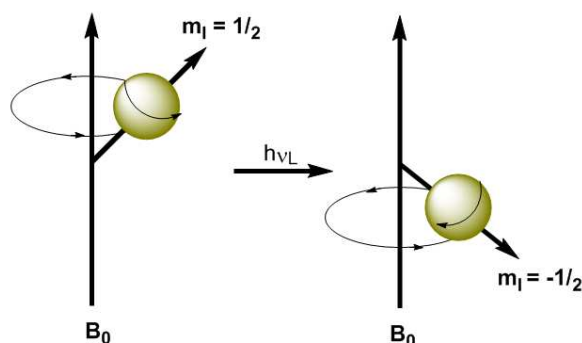


Figura 3. Esquema del cambio del número de *spin* tras la aplicación de un campo magnético. Al aplicar una radiación electromagnética de frecuencia adecuada (ondas de radio) se consigue promover los núcleos desde el nivel de energía inferior ($m_l=1/2$) al nivel de energía superior ($m_l=-1/2$). Es el cambio en este nivel de energía, y su posterior retorno a la energía basal, la que es registrada por el espectómetro, dando una señal característica para cada molécula.

energético de trabajo es mucho mayor. Así, la base de esta técnica radica en el uso del *spin* nuclear de cada molécula durante la aplicación de un campo magnético (Teng, 2012).

El *spin* (figura 3) es una propiedad física de las partículas subatómicas. Cada partícula elemental tiene un momento angular intrínseco de valor fijo. Es una propiedad intrínseca de la partículas, de igual modo que la masa o la carga eléctrica. El *spin* proporciona una medida del momento angular intrínseco de toda partícula.

En esencia, un espectrómetro de RMN (figura 4) es más o menos como una radio. En una radio, las señales de audio dentro del rango de frecuencias de los kilohertzios son las señales de interés, que permiten que el sonido se oiga a través del aparato. Sin embargo, las señales enviadas por las estaciones de difusión están en el rango de 10 Mhz para la banda de FM y de hasta 1 Ghz para la banda de AM. Las señales de audio con una frecuencia de kilohertzios debe separarse de las frecuencias de transmisión comentadas antes de ser emitidas por los altavoces. En la espectroscopía de RMN, los núcleos de los átomos que forman las moléculas tienen una frecuencia intrínseca de megahertzios, que se conoce



Figura 4. Equipo de resonancia magnética nuclear utilizado para el procesamiento de muestras durante los análisis de perfiles metabolómicos.



como frecuencia de Larmor. En una molécula, todos los protones tienen la misma frecuencia de Larmor. Sin embargo, las señales de interés son los cambios generados por la densidad de electrones que rodea a un protón, y que se encuentran en el rango de los kilohertzios. Los diferentes protones de una molécula, por tanto, tienen ambientes químicos distintos que dan diferentes señales dentro de este rango de frecuencias (Teng, 2012).

Por tanto, un espectrómetro de RMN funciona igual que una radio. Primero emite una cantidad de energía dada, que excita y modifica el número *spin* de los núcleos que forman las moléculas que hay en nuestra muestra de estudio. El espectrómetro registra este cambio energético y nos da una señal en forma de espectro (figura 5), en el que cada pico de la imagen corresponde a una molécula en concreto.

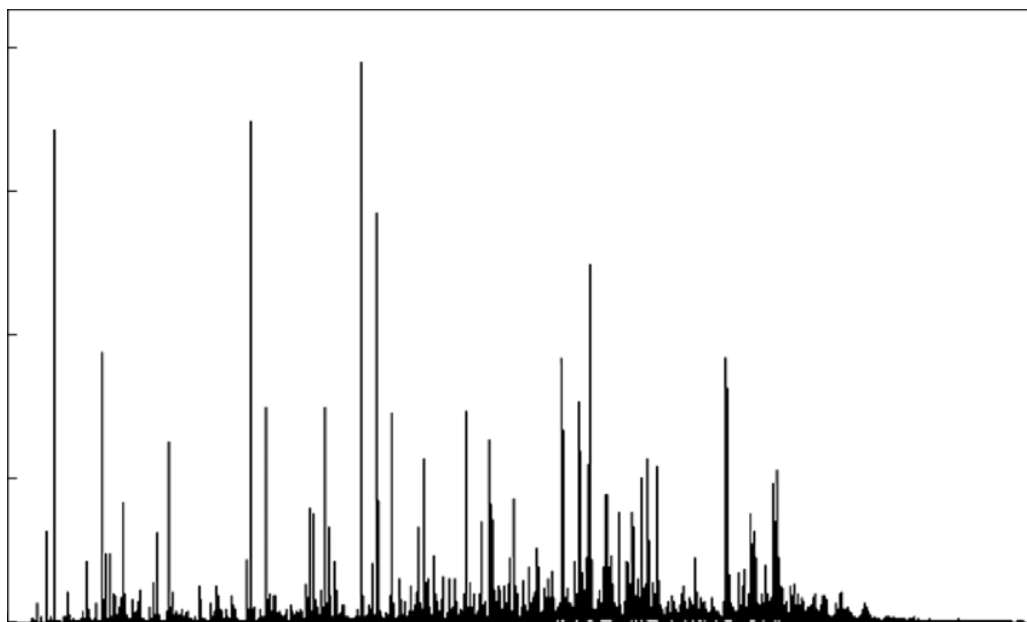


Figura 5. Ejemplo de espectro metabolómico. El eje x expresa unidades de frecuencia. El eje y, intensidad de señal. Cada pico representa a una molécula concreta, debido a sus características físico-químicas intrínsecas. La altura del pico es proporcional a la cantidad de molécula que hay en la muestra de estudio.

El análisis de datos multivariante es la herramienta idónea para aplicar durante el estudio de los espectros metabolómicos, puesto que dan una eficiencia y una robustez idónea para su uso. De hecho, este mismo tipo de análisis es el utilizado durante la medición mediante otras técnicas espectrométricas (Teng, 2012).

El análisis estadístico por PLS-DA proporciona diversos estadísticos, entre los que se encuentra el coeficiente de regresión, que se puede utilizar para identificar las variables más importantes. Esta técnica permite la interpretación visual de conjuntos de datos complejos, como es el gráfico de puntos, de fácil interpretación, y que ilustra de forma perfecta la separación entre los diferentes grupos de estudio (Gromski et al., 2015).

En resumen, el análisis estadístico por PLS-DA es un método analítico que relaciona los datos de los metabolitos con el grupo al que pertenece la muestra. Esto permite mantener una clara separación entre los diferentes grupos. Cada muestra se coloca en un espacio n-dimensional, basándose en su perfil metabolómico, obteniéndose diferentes grupos en los que se puede encajar cada muestra. Además, el estudio permite predecir en qué grupo caerá una muestra que no se haya utilizado en el estudio, atendiendo al perfil metabolómico que se detecte (Tognarelli et al., 2015).

4. Citoquinas

Las citoquinas son proteínas solubles que median la comunicación celular. Las citoquinas son polipéptidos o glucoproteínas con un peso



molecular de unos 30 kDa que promueven el crecimiento, la diferenciación y diversas señales inflamatorias o anti-inflamatorias en diferentes tipos celulares (Isaacs & Lindenmann, 1957). Las citoquinas pro-inflamatorias promueven inflamación autoinmune y daño tisular, mientras que las citoquinas anti-inflamatorias ayudan a resolver la inflamación y facilitan la reparación de los tejidos (Kim & Moudgil, 2017).

El perfil pro-inflamatorio se ha convertido en una importante herramienta para conocer el estatus inmunológico del paciente (Trzonkowski et al., 2003). La infección por CMV y su posterior reactivación provocan un cambio en este perfil de citoquinas del paciente (Lang et al., 2002; Pawelec, Larbi, & Derhovanessian, 2010). De nuevo y dado que posteriormente se indica la utilización de diversas citoquinas en las experiencias llevadas a cabo durante los trabajos que conforman este documento, se precisa dar una explicación sobre ellas. Estas son: PCR, IP10, sTNFR2 y TGF- β 1.

La PCR es un proteína de fase aguda producida por los hepatocitos del hígado, y es un marcador confiable de inflamación sistémica (Schots et al., 2002). Es una proteína muy conservada filogenéticamente hablando, con homólogos tanto en vertebrados como en muchos invertebrados. Su concentración plasmática aumenta durante los estados inflamatorios, por lo que se ha extendido su uso con fines clínicos. La PCR es una molécula de reconocimiento de patrones, que se une a configuraciones moleculares específicas expuestas durante la muerte celular o que se encuentran en las superficies de los patógenos. Su rápido aumento en la síntesis dentro de las horas posteriores a una lesión o infección del tejido, sugiere que contribuye a la defensa del huésped y es parte de la respuesta inmune innata (Black, Kushner, & Samols, 2004).



La IP10 es una proteína que se produce en diversas células en respuesta al IFN- γ y que está asociada a infecciones víricas. Cuando se une a su receptor puede inducir quimiotaxis, apoptosis, crecimiento celular y angiostasis. La alteración de sus niveles de expresión se ha asociado con enfermedades infecciosas, disfunción inmune y desarrollo tumoral. Pero esta citoquina también es reconocida como un biomarcador que predice la gravedad de diversas enfermedades, por lo que puede resultar útil como un objetivo terapéutico para enfermedades infecciosas (Romagnani & Crescioli, 2012).

El sTNFR2 pertenece a la superfamilia de receptores para el factor de necrosis tumoral. Esta citoquina se expresa tanto en células tumorales como en células inmunosupresoras (células T reguladoras y células supresoras derivadas de la línea mieloide). sTNFR2 promueve la proliferación de algunos tipos de células tumorales, así como activa células inmunosupresoras y apoya el escape inmune (Balkwill, 2009).

Y, por último, el TGF- β 1 es una citoquina perteneciente a la superfamilia de factores de crecimiento transformante beta. Esta citoquina tiene un papel prominente en la homeostasis de los tejidos y está presente en todos los procesos inflamatorios y de herida crónicos. A nivel celular, patrulla varios eventos biológicos, ya sea en condiciones fisiológicas o patológicas, como el ciclo celular y la apoptosis. A nivel tisular y orgánico, regula la diferenciación y la respuesta inmunológica de los linfocitos B y T que participan en la cascada inflamatoria (Bellomo, Caja, & Moustakas, 2016).

Todas son proteínas solubles que circulan a niveles mucho más altos que otros marcadores inflamatorios convencionales (Rollag et al., 2012; Rollag et al., 2013).



5. miRNAs de CMV

Los miRNAs son moléculas de RNA no codificante, pequeñas (no más de 22 nucleótidos), que regulan la expresión de genes a nivel post-transcripcional en todos los organismos eucariotas y en algunos virus, en especial en los herpesvirus (Dolken, Pfeffer, & Koszinowski, 2009). Los miRNAs son moléculas no inmunogénicas. En el caso de CMV, se han identificado 24 miRNAs diferentes codificados por el virus (Grey et al., 2005; Kawano et al., 2016; Pfeffer et al., 2005). Se piensa que estas pequeñas moléculas de RNA provocan una orientación de la expresión génica celular para inducir un ambiente más favorable para el virus, además de dirigir la regulación de la expresión de los genes virales (Grey, Meyers, White, Spector, & Nelson, 2007; Grey & Nelson, 2008; Stern-Ginossar et al., 2007). Por todo esto, los miRNAs de CMV están implicados en la regulación de la replicación viral, la modulación inmune y la evasión inmune (Fu et al., 2014; Stern-Ginossar et al., 2007; Stern-Ginossar et al., 2009).

Recientemente se ha observado que la mayoría de células liberan estos miRNAs al espacio extracelular, predominantemente en el interior de vesículas (exosomas) o entramados proteínicos que los protegen de las RNasas. Estos miRNAs alcanzan el compartimento vascular, constituyendo el denominado miRNAoma vascular, cuyo análisis permite inferir algunas particularidades de la fisiología tisular (de Candia, Torri, Pagani, & Abrignani, 2014). Los miRNAs pueden ser extraídos del plasma (o cualquier otro líquido biológico) con relativa facilidad y detectarse mediante *microarrays* o por *deep-sequencing*.

Los miRNAs que aparecen más adelante en la tesis son: mir-UL36,

mir-US33, mir-UL148D, mir-UL22A y mir-UL112. mir-UL36 se encuentra codificado dentro del gen UL36, encargado de la codificación de una proteína del tegumento de los herpesvirus; mir-US33 es un transcrito anti-sentido dentro del gen US29 (encargado de la codificación de una proteína de membrana de CMV); mir-UL148D se encuentra dentro del gen de la proteína UL148D, una hélice transmembrana; mir-UL22A, que tiene el nivel de lectura más alto, forma parte del gen UL22A, que codifica una glicoproteína; y mir-UL112 está integrado dentro del gen UL112 de codificación de una fosfoproteína temprana (Meshesha et al., 2012), además de poseer como diana celular el IRF-1 (Li et al., 2011; Mohammad et al., 2014).

HIPÓTESIS



HIPÓTESIS

Para el presente documento de tesis se trabajó con la hipótesis de que diversos parámetros biológicos, en concreto, componentes metabolómicos, sustancias derivadas del metabolismo de estrés oxidativo, citoquinas y miRNA procedentes de la replicación del Citomegalovirus, pueden actuar como predictores de la infección activa precoz por Citomegalovirus en el trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos. La anticipación del desarrollo de infección activa puede permitir la implementación de medidas preventivas (por ejemplo, profilaxis o transferencia de células T específicas) que podría reducir la morbimortalidad asociada a la infección por CMV en estos pacientes.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

A continuación, se exponen los objetivos que se buscaban en cada uno de los artículos que forman parte del presente documento de tesis. Esta esquematización de los mismos es importante, pues es la que se va a seguir en los diferentes apartados durante todo el texto. Además, los artículos están listados en el documento por orden cronológico de publicación.

1. Investigación de marcadores de estrés oxidativo como mecanismo predictivo de la infección por Citomegalovirus.

El objetivo del artículo I consistió en la monitorización de niveles plasmáticos de MDA y CP con el propósito de investigar su capacidad como predictores de la DNAemia por CMV.

2. Validación del modelo metabolómico en plasma que permite la anticipación de la infección por CMV en el alo-TPH.

El objetivo del artículo II consistió en la validación del modelo metabolómico de predicción de la infección activa por CMV en una cohorte de pacientes sometidos a alo-TPH con riesgo diferencial de infección por CMV (riesgo alto, intermedio y bajo).



3. Investigación de marcadores de inflamación como predictores de la infección activa por CMV.

El objetivo del artículo III consistió en la monitorización de citoquinas (PCR, IP10, sTNFR2 y TGF- β 1) en plasma con el propósito de investigar su capacidad como predictores de la infección activa por CMV.

4. Utilización de los miRNA de CMV presentes en plasma para la predicción de la infección activa por CMV.

El objetivo del artículo IV consistió en el estudio de diferentes miRNAs de CMV para comprobar si su presencia en plasma durante la monitorización temprana tras el alo-TPH eran útiles como predictores de la infección activa por el virus.

METODOLOGÍA



METODOLOGÍA

1. Manejo terapéutico de la infección sistémica por CMV.

El Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario de Valencia (HCUV) emplea dos estrategias de tratamiento anticipado. Por este motivo, se realiza un seguimiento frecuente, de la carga del virus en plasma, de todos los pacientes durante su ingreso, para, así, conocer el inicio y la finalización de la terapia antiviral.

En la primera de estas estrategias, se determina el inicio del tratamiento cuando la carga viral en plasma alcanza o supera un valor concreto. Desde el año 2012, para el HCUV queda establecido dicho valor en 1.000 copias/mL. Sin embargo, con anterioridad a esta fecha, el valor de referencia era 500 copias/mL. Ambos casos, en realidad, establecen un umbral de 1.500 UI/mL como valor de corte para iniciar la terapia antiviral comentada (Clari et al., 2013).

Para la segunda estrategia, que se viene llevando a cabo desde 2014 (Gimenez, Munoz-Cobo, Solano, Amat, & Navarro, 2014), se utiliza como variable resolutive el tiempo de duplicación (td) del virus. Teniendo en cuenta tan solo las dos primeras monitorizaciones positivas del virus tras el alo-TPH, se establece un valor de 2 o menor para iniciar el tratamiento, en relación a la siguiente fórmula:

$$td=(t_2-t_1)\times\left[\frac{\log 2}{\log\left(\frac{q_2}{q_1}\right)}\right]$$



donde t_2-t_1 es la diferencia en días entre las dos determinaciones de carga viral, y q_1 y q_2 son la primera y la segunda carga viral respectivamente (Emery, Cope, Bowen, Gor, & Griffiths, 1999; Munoz-Cobo et al., 2011).

Ambas estrategias son autoexcluyentes entre sí. Si con la primera y la segunda carga se establece un td igual o inferior a 2, se inicia el tratamiento. Pero si alguna de estas dos cargas ya supera las 1.500 UI/mL, se inicia el tratamiento sin tener en cuenta el td . Solo en caso de que el td sea mayor a 2, se pasa a comprobar la estrategia de las 1.500 UI/mL de plasma en sucesivas mediciones para iniciar el tratamiento. Además, existen una serie de limitaciones que hay que tener en cuenta a la hora de calcular el td para que este sea válido: la carga viral del t_2 tiene que ser, al menos, 3 veces superior a la del t_1 para así poder evitar el coeficiente de variación de la técnica; y el tiempo máximo transcurrido entre la primera carga viral y la segunda debe ser inferior a 10 días (C. Solano et al., 2016).

El tratamiento se realiza con ganciclovir (5 mg/kg/12h, IV) o valganciclovir (900 mg/12h, oral), o con foscarnet (60 mg/kg/12h, IV) hasta que se consigue la negativización de la carga viral en plasma (C. Solano et al., 2008).

2. Monitorización virológica mediante PCR en tiempo real.

Durante los primeros cien días post-trasplante, se realiza la monitorización de la carga viral plasmática una o dos veces por semana, con la intención de conocer la situación del paciente y aplicar, o no, la estrategia de tratamiento anticipado que se ha descrito en el subapartado anterior. Después de este periodo inicial, el seguimiento se realiza durante

las visitas programadas de cada paciente. Sin embargo, aquellos pacientes que tengan pautadas dosis altas de corticosteroides continúan con una monitorización semanal, con la intención de conocer el marco de la enfermedad de injerto contra huésped (EICH).

El Servicio de Microbiología del HCUV recibe las muestras de sangre periférica (EDTA) inmediatamente después de su extracción. Una vez allí, se centrifugan a 2500 rpm durante 10 minutos. Tras esto, se extrae el plasma resultante, que se mantiene a 4 °C hasta el proceso de extracción del material genético. Si este no pudiera realizarse durante las dos horas siguientes, las muestras son almacenadas a -20 °C hasta su análisis.

Para la extracción del material genético, que se realiza dentro de la rutina de trabajo del servicio, se hace uso del sistema automatizado m24sp de Abbott, cuya capacidad de trabajo es de 18 muestras simultáneas. A partir de los 500 µL de plasma de cada muestra que se utilizan en el proceso, se obtiene un volumen de elución de 80 µL.

La cuantificación de la carga viral se realiza, desde el año 2012 (como se ha dicho anteriormente), mediante la PCR Abbot *RealTime* CMV (Abbot Molecular, Des Plaines, Illinois, USA), dado que posee una gran sensibilidad y especificidad, y un límite de detección de 20 copias/mL, pudiendo detectar hasta 100×10^6 copias/mL (Gimenez et al., 2014; Tormo et al., 2011). Con anterioridad al año 2012, para la cuantificación de la carga viral se utilizaba la PCR de Abbot CMV PCR Kit. Ambas presentan el mismo límite de detección y el mismo rango de cuantificación, sin embargo, el kit actual es capaz de detectar cargas virales más elevadas (alrededor de $1 \log_{10}$) cuando se compara con el anterior (Clari et al., 2013; C. Solano et al., 2015).

Durante la realización de las experiencias de los artículos que



aparecen en la presente tesis, se incluyeron, también, pacientes procedentes del Hospital Gregorio Marañón de Madrid, del Hospital Regional de Málaga y del Hospital Clínico Universitario de Salamanca. En todos ellos se utiliza la misma PCR descrita con anterioridad (PCR Abbot RealTime CMV, Abbot Molecular, Des Plaines, Illinois, USA).

3. Medición de marcadores de estrés oxidativo en plasma.

La medición de los marcadores de estrés oxidativo se hizo en plasma, el cual se obtuvo de la misma forma que se indica en el subapartado anterior. En este caso, se obtuvieron tres medidas consecutivas tras el alo-TPH de cada paciente. El primer plasma se obtuvo alrededor de una semana después post-trasplante. El segundo, tras 15 días post-trasplante. Y el tercero, tras un mes post-trasplante.

El MDA se midió mediante cromatografía líquida de alta eficacia-luz ultravioleta (HPLC-UV), tal y como describen Breusing *et al* (Breusing et al., 2010). Para ello, se mezcló 50 μ L de cada muestra con 0,44 M de ácido fosfórico y 42 mM de ácido tiobarbitúrico (TBA), y se incubó durante una hora en un baño de agua a 95 °C, con el objetivo de hidrolizar los lipoperóxidos para liberar el malondialdehído. Inmediatamente después, se procedió a enfriar las muestras y diluirlas 1:1 con metanol. Las muestras se centrifugaron entonces a 13.000 xg , durante 5 minutos, a 4 °C. Se diluyó (dilución 1:1) 200 μ L de cada sobrenadante con 50 mM de KH_2PO_4 (pH 3,5). Cada sobrenadante se separó mediante HPLC, usando un método isocrático. La fase A consistió en KH_2PO_4 50 mM a pH 6,8 y acetonitrilo (ACN) (KH_2PO_4 :ACN, 83:17). Y la fase B, en una mezcla de

ACN:agua (70:30). Posteriormente, se procedió a la detección del MDA mediante luz visible-UV a 532 nm.

Para medir las proteínas oxidadas en plasma, cada muestra se derivatizó con 2,4-dinitrophenylhydrazone (DNP-hydrazone), lo que les permitió reaccionar con 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) (Shacter, Williams, Lim, & Levine, 1994). El contenido en las muestras de plasma se cuantificó mediante el método de Lowry (Noble & Bailey, 2009): se desnaturalizaron 10 µg de proteínas de cada muestra con 5 µL de sulfato dodecil de sodio (SDS) al 12%. Posteriormente, se agregó a cada muestra 10 µL de DNPH 10 mM en ácido trifluoroacético al 10% (v/v). Después, se neutralizó la mezcla, de la que se obtuvo 10 µL que se dispusieron en una membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloqueó con BSA al 5% en PBST durante una hora, durante la cual se incubó con anticuerpos anti-DNP, tal y como describe el fabricante (*OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit* de Millipore) (Wehr & Levine, 2012). Las imágenes se capturaron usando un ImageQuant LAS-4000 (GE Healthcare Life Sciences) y la densidad de señal se analizó con el software ImageJ (NIH Image)

4. Análisis metabolómico en plasma.

Igual que en el caso de los marcadores de estrés oxidativo, las muestras de plasma empleadas en la validación del modelo metabolómico como predictor de la aparición de viremia por CMV se extrajeron siguiendo el mismo protocolo. El procesamiento del plasma para la obtención de su perfil metabolómico ha sido descrito en detalle en un estudio previo (Monleon et al., 2015). Las muestras antes citadas se



mantuvieron congeladas hasta el momento de estudio, en el cual se procedió a su descongelación mediante su mantenimiento en hielo. Una vez descongeladas, se tomó 500 μL de plasma de cada una de ellas y se les añadió 50 μL de D_2O . Se tomó 500 μL de esta alícuota y se puso en un tubo NMR de 5 mm. Este proceso se llevó a cabo de forma automática mediante el procesador de muestras Gilson 125. Los espectros de RMN- H^1 se registraron con un espectrómetro Bruker Avance DRX 600 (Bruker GmbH). Las muestras se midieron a 37 °C. Los espectros metabólicos se procesaron con el programa MNova (Mestrelab) y se analizaron con MATLAB (MathWorks) (Bodi et al., 2012; Dumas et al., 2006)

Se investigó las regiones químicas de resonancia entre 0.50 y 4.70 ppm y entre 5.50 y 5.90 ppm. Las regiones de EDTA (2.53-2.58, 3.10-3.30 y 3.60-3.70 ppm) fueron excluidas del análisis.

5. Medición de marcadores citoquímicos en plasma.

El plasma utilizado para la cuantificación de los marcadores citoquímicos se obtuvo de igual forma a la descrita en los análisis anteriores. En este caso, se utilizaron muestras de plasma desde el día cero tras el trasplante, hasta un máximo de 50 días posteriores, para así poder anteceder los datos de las citoquinas estudiadas a la aparición de la infección por CMV. Cada muestra de plasma de cada uno de los pacientes fue analizada por triplicado dentro del mismo ensayo.

En concreto, para este estudio se monitorizaron las siguientes citoquinas: PCR, IP10, sTNFR2 y TGF- β 1, todas ellas ya descritas en el apartado de INTRODUCCIÓN del presente documento.

En el caso de la citoquina PCR, se procedió a su cuantificación mediante nefelometría, utilizando el análisis de alta sensibilidad a proteína C-reactiva desarrollado por *Siemens Healthineers* (Erlangen, Alemania). La sensibilidad del ensayo es de 0.10 mg/L, y el rango de 0.10 a 50 mg/L, con una reproducibilidad del 6.8% a 1.16 mg/L. En el caso de IP10, sTNFR2 y TGF- β 1, se cuantificaron utilizando la plataforma Luminex (*ProcartaPlex immunoassays*; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La sensibilidad de esta técnica para IP10 es de 0.3 pg/mL, con un rango de cuantificación de 1.95-8000 pg/mL y unos coeficientes de variación inter- e intra-ensayo de 5.5% y 6.6%. Para sTNFR2, la sensibilidad del ensayo es de 0.1 pg/mL, mientras que el rango es de 1.27-5200 pg/mL y los coeficientes de variación inter- e intra-ensayo son menores al 10%. Finalmente, en el caso de la citoquina TGF- β 1, la técnica posee una sensibilidad y unos coeficientes de variación iguales al caso anterior (sTNFR2) (0.1 pg/mL y menor al 10% respectivamente), pero un rango de 1.1-4500 pg/mL.

6. Medición de miRNAs de CMV en plasma.

La detección en plasma de los miRNAs maduros de CMV se llevó a cabo utilizando el *miScript PCR System* (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, se tomó el plasma sobrante utilizado para la detección de CMV, y criopreservado a -80 °C, de los días +7, +14 y +30 post-trasplante. De cada muestra de plasma se tomaron 200 μ L para extraer los miRNA totales. Para este menester se utilizó el *miRNeasy Serum/Plasma Kit*, de nuevo siguiendo las



instrucciones facilitadas por el fabricante. La transcripción de los miRNAs maduros de CMV, paso siguiente tras la extracción, se realizó mediante el uso de *Hispec Buffer*. Los *primers* utilizados en este caso fueron diseñados utilizando secuencias de nucleótidos presentes en la versión v11.0 de miRBase. Posteriormente, se procedió a la cuantificación de los miRNAs de CMV obtenidos en los pasos anteriores. Para lo cual, se realizó una PCR en tiempo real utilizando el *miScript SYBR Green PCR Kit* en el sistema de PCR en tiempo real ABI Prism 7500 (Applied Bioscienciens). Como control positivo del ensayo de cada muestra, se utilizó el miRNA miR-39 de *C. elegans* antes de la extracción. Además, el miRNA let-7i se utilizó como miRNA endógeno control para normalizar las diferentes muestras. También se hizo uso del miRNA miRTC como control de la reacción de transcripción. Por último, se utilizó plasma de receptores de trasplante seronegativo para CMV, cuyos donantes también eran seronegativos para CMV, para optimizar los datos obtenidos. Además, valores de C_T s mayores o iguales a 40 se consideraron como ruido de fondo y no se tuvieron en cuenta en los análisis.

7. Pacientes.

7.1. Investigación de marcadores de estrés oxidativo como mecanismo predictivo de la infección por Citomegalovirus.

Este análisis consistió en un estudio observacional retrospectivo en el que se incluyó 55 pacientes del Hospital Clínico Universitario de Valencia, sometidos a alo-TPH, durante los años 2013 y 2015. El único

criterio de exclusión de pacientes fue el hecho de no disponer de los plasmas consecutivos descritos con anterioridad en el apartado correspondiente. La mediana de la edad de los pacientes fue 50.9 años, con un rango de 18-70 años. El periodo de estudio comprendió los primeros 100 días tras el alo-TPH.

7.2. Validación del modelo metabólico en plasma que permite la anticipación de la infección por CMV en el Alo-TPH.

La cohorte seleccionada para este estudio estaba formada por 79 pacientes adultos no consecutivos que fueron sometidos a alo-TPH en el servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario de Valencia, desde junio de 2013 a agosto de 2015.

7.3. Investigación de marcadores de inflamación como predictores de la infección activa por CMV.

La cohorte que formó parte de este estudio constaba de 46 pacientes adultos no consecutivos, que fueron sometido a un alo-TPH de células T, en el Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario de Valencia, entre mayo de 2011 y junio de 2014. El único criterio de exclusión para los pacientes fue la falta de muestras consecutivas disponibles, definidas de forma arbitraria como menor a tres. La cohorte fue representativa de toda la población de pacientes sometidos a alo-TPH



en dicho centro. La mediana de edad de pacientes en el momento del trasplante fue de 51 años, con un rango de entre 18 y 66 años. El periodo de estudio comprendió los primeros 100 días después del trasplante.

7.4. Utilización de los miRNA de CMV presentes en plasma para la predicción de la infección activa por CMV.

Un total de 62 pacientes adultos consecutivos, sometidos a un alo-TPH de células T, fueron incluidos en este estudio prospectivo multicéntrico observacional. Los pacientes provenían de diferentes Servicios de Hematología de hospitales de la geografía española: Hospital Regional Universitario de Málaga ($n = 29$), Hospital Clínico Universitario de Valencia ($n = 14$), Hospital General Universitario de Salamanca ($n = 11$) y Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid ($n = 8$). El periodo de estudio comprendió entre diciembre de 2015 y mayo de 2018. La cohorte incluyó, principalmente, pacientes sometidos a alo-TPH haploidéntico con ciclofosfamida postrasplante. La mediana de edad de los pacientes en el momento del trasplante fue de 56 años, con un rango comprendido entre los 24 y los 73 años. Solo los 100 primeros días formaron parte del estudio.

8. Análisis estadístico.

Para los diferentes análisis estadísticos realizados en todos los estudios que conforman el presente documento de tesis, se utilizó tanto el programa SPSS, versión 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA), como el programa

GraphPad Prism Software (La Jolla, CA, USA). La normalidad de las diferentes variables estudiadas se comprobó con el test de Kolmogorov-Smirnov ($P \geq 0.200$). Las diferencias de medianas se compararon utilizando el test U de Mann-Whitney (para dos variables independientes) o el test de Kruskal-Wallis (para más de dos muestras independientes), en el caso de variables no paramétricas. Para variables paramétricas, se utilizó el test t (para comparar la media de dos grupos) o el test ANOVA (para comparar la media de tres o más grupos). Las frecuencias de las diferentes variables estudiadas se compararon utilizando el test X^2 y el test de Fisher según correspondiera. Los datos de las curvas ROC se consiguieron utilizando los mismos paquetes estadísticos. En todos los casos se informaron valores de P menores a 0.05 como valores estadísticamente significativos.

9. Comité Ético.

Los cuatro estudios fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospital Clínico Fundación INCLIVA. De igual forma, todos los participantes en dichos estudios firmaron el correspondiente consentimiento informado.

RESULTADOS



RESULTADOS

Los resultados que se van a presentar a continuación intentan responder a los diferentes objetivos planteados en la sección correspondiente. Por ello mismo, se ha decidido esquematizarlos en la misma forma y orden que los mencionados objetivos, para así poder tener una visión más ordenada y clarificadora de estos.

Como primera toma de contacto con los resultados de los diferentes estudios, en la tabla 2 se muestran las características demográficas y clínicas de los pacientes que se incluyeron en cada uno de los mismos.

Tabla 2. Características demográficas y clínicas de los pacientes de los diferentes estudios.

Parámetro	Nº de pacientes (%)			
	Estudio I	Estudio II	Estudio III	Estudio IV
Sexo				
Hombre	33 (60,0%)	51 (65,0%)	30 (57,7%)	39 (62,9%)
Mujer	22 (40,0%)	28 (35,0%)	22 (42,3%)	23 (37,1%)
Enfermedad subyacente				
Leucemia aguda	16 (29,1%)	26 (32,9%)	22 (42,3%)	24 (38,7%)
Leucemia crónica	4 (7,3%)	21 (26,6%)	6 (11,5%)	4 (6,5%)
Linfoma	19 (34,5%)	15 (19,0%)	20 (38,5%)	17 (27,4%)
Síndrome mielodisplásico / Mielofibrosis	7 (12,7%)	9 (11,4%)	2 (3,8%)	17 (27,4%)
Mieloma múltiple	2 (3,6%)	3 (3,8%)	2 (3,8%)	-
Otros	7 (12,7)	5 (6,3%)	-	-
Compatibilidad HLA				
Idéntico	16 (29,1%)	48 (60,0%)	37 (71,2%)	15 (24,2%)
Haploidéntico	34 (61,8%)	25 (32,0%)	5 (9,6%)	44 (71,0%)
No idéntico	5 (9,1%)	6 (8,0%)	10 (19,2%)	3 (5,8%)
Tipo de donante				
Emparentado	39 (70,9%)	-	27 (51,9%)	52 (83,9%)
No emparentado	16 (29,1%)	-	25 (48,1%)	10 (16,1%)
Fuente del TPH				



Sangre periférica	53 (96,4%)	76 (96,0%)	40 (76,9%)	56 (90,3%)
Sangre de cordón umbilical	1 (1,8%)	1 (1,0%)	7 (13,5%)	-
Médula ósea	1 (1,8%)	2 (3,0%)	5 (9,6%)	6 (9,7%)
Acondicionamiento				
Intensidad reducida	46 (83,6%)	59 (75,0%)	33 (63,5%)	43 (69,4%)
Intensidad estándar	9 (16,4%)	20 (25,0%)	19 (36,5%)	19 (30,6%)
Profilaxis frente a EICH				
Regimen con Ciclofosfamida	16 (29,1%)	26 (33,0%)	5 (9,6%)	53 (85,5%)
Regimen con Ciclosporin A	23 (41,8%)	31 (39,0%)	32 (61,5%)	5 (8,1%)
Regimen con Sirolimus	16 (29,1%)	22 (28,0%)	15 (28,8%)	4 (6,5%)
Profilaxis con ATG				
Sí	-	-	9 (17,3%)	-
No	-	-	43 (82,7%)	62 (100,0%)
Serología para CMV				
D+/R+	44 (80,0%)	53 (67,0%)	24 (46,2%)	33 (53,2%)
D+/R-	-	8 (10,0%)	7 (13,5%)	6 (9,7%)
D-/R+	11 (20,0%)	15 (19,0%)	18 (34,6%)	23 (37,1%)
D-/R-	-	3 (4,0%)	3 (5,8%)	-
Existus antes de 100 días				
Sí	-	-	3 (5,8%)	-
No	-	-	49 (94,2%)	-
Existus antes de 365 días				
Sí	-	-	-	17 (27,4%)
No	-	-	-	45 (72,6%)
EICH				
Grado 0-I	38 (69,1%)	61 (90,0%)	35 (67,3%)	40 (64,5%)
Grado II-IV	17 (30,9%)	18 (10,0%)	17 (32,7%)	22 (35,5%)

1. Investigación de marcadores de estrés oxidativo como mecanismo predictivo de la infección por Citomegalovirus.

1.1. Incidencia y características de los episodios de DNAemia por CMV.

De los 55 pacientes incluidos en la cohorte de estudio (todos ellos R+ para CMV), 39 desarrollaron un primer episodio de DNAemia causado

por CMV, siendo la mediana del día de aparición del mismo de 34 días después de la fecha de trasplante, con una rango mínimo-máximo de 10 a 84 días. De estos, 20 pacientes (el 52,6%) precisaron de antivirales como estrategia de tratamiento anticipado, tal y como se ha explicado en la sección correspondientes. El rango de la carga inicial del primer episodio para estos pacientes fue de 20 a 2.590 UI/mL, mientras que el rango del pico fue de 83 a 420.000 UI/mL. Así mismo, los episodios comentados tuvieron una duración de 4 a 149 días. En la tabla 3 pueden encontrarse las diferentes características clínicas estudiadas, ninguna de las cuales mostró una significancia estadística en relación a su distribución cuando se comparó pacientes que desarrollaron la DNAemia por CMV con pacientes que no lo hicieron. De igual forma, la edad de los pacientes fue comparable ($P = 0,185$) en los pacientes con y sin DNAemia causada por CMV, siendo la mediana de la edad de 55 años, con un rango mínimo-máximo de 18 a 70 años para los pacientes con CMV, y una mediana de 45 años y rango de 25 a 68 para los pacientes sin CMV. Sin embargo, sí se observó una tendencia hacia una mayor incidencia de DNAemia por CMV en pacientes que recibieron un aloinjerto no compatible en su HLA (se incluye en este grupo los pacientes sometidos a un trasplante haploidéntico) con respecto a aquellos con un HLA compatible ($P = 0.081$).



Tabla 3. Niveles plasmáticos medios de los marcadores de estrés oxidativo según el trasplante basal y los parámetros cinéticos de DNAemia por CMV. Se considera un P -valor ≤ 0.05 como estadísticamente significativo.

Parámetro	Media del Ln AUC		Media del Ln AUC de las proteínas carboxiladas	
	MDA (IC 95%)	P -valor	(IC 95%)	P -valor
Sexo				
Hombre	4,7 (4,3 – 5,1)	0,215	10,3 (9,8 – 10,7)	0,567
Mujer	5,1 (4,7 – 5,5)		10,5 (10,1 – 10,9)	
Compatibilidad HLA				
Haploidéntico	4,2 (3,8 – 4,6)	< 0,001	10,3 (9,6 – 10,9)	0,766
Idéntico	5,3 (5,1 – 5,6)		10,5 (10,1 – 10,7)	
No idéntico	4,9 (4,2 – 6,9)		10,3 (9,5 – 11,5)	
Tipo de donante				
Emparentado	4,8 (4,5 – 5,2)	0,312	10,5 (10,2 – 10,8)	0,310
No emparentado	5,1 (4,7 – 5,5)		10,2 (9,8 – 10,5)	
Fuente del TPH				
Sangre periférica	4,9 (4,6 – 5,2)	0,948	10,4 (10,1 – 10,6)	0,445
Médula ósea	4,9 (-)		11,4 (-)	
Sangre de cordón umbilical	- (-)		9,9 (-)	
Acondicionamiento				
Intensidad estándar	5,2 (4,5 – 5,9)	0,320	10,2 (9,7 – 10,6)	0,387
Intensidad reducida	4,9 (4,6 – 5,2)		10,4 (10,2 – 10,7)	
Profilaxis frente a EICH				
Ciclosporin A / Micofenolato de mofetilo*	4,2 (3,8 – 4,6)	< 0,001	10,3 (9,8 – 10,9)	0,305
Otras combinaciones	5,3 (4,7 – 5,9)		10,5 (9,8 – 11,3)	
Serología para CMV				
D+/R+	5,4 (5,1 – 5,6)	0,070	10,4 (10,1 – 10,7)	0,845
D-/R+	4,8 (4,5 – 5,1)		10,4 (10,0 – 10,9)	
Infección por CMV				
Sí	4,7 (4,4 – 5,1)	0,043	10,3 (10,0 – 10,5)	0,079
No	5,3 (4,8 – 5,7)		10,7 (10,2 – 11,3)	
Pico de la viremia				
< 1500 UI/mL	4,9 (4,3 – 5,6)	0,326	10,1 (9,6 – 10,5)	0,211
\geq 1500 UI/mL	4,6 (4,2 – 5,0)		10,4 (10,1 – 10,8)	
Tiempo de duplicación				
< 2 días	4,1 (2,9 – 5,3)	0,142	9,9 (8,9 – 11,0)	0,208
\geq 2 días	5,0 (4,8 – 5,3)		10,4 (10,0 – 10,7)	

*Dentro de este grupo se incluyen, también, todos los pacientes tratados con ciclofosfamida.

1.2. Niveles plasmáticos de marcadores de estrés oxidativo como predictores de DNAemia por CMV.

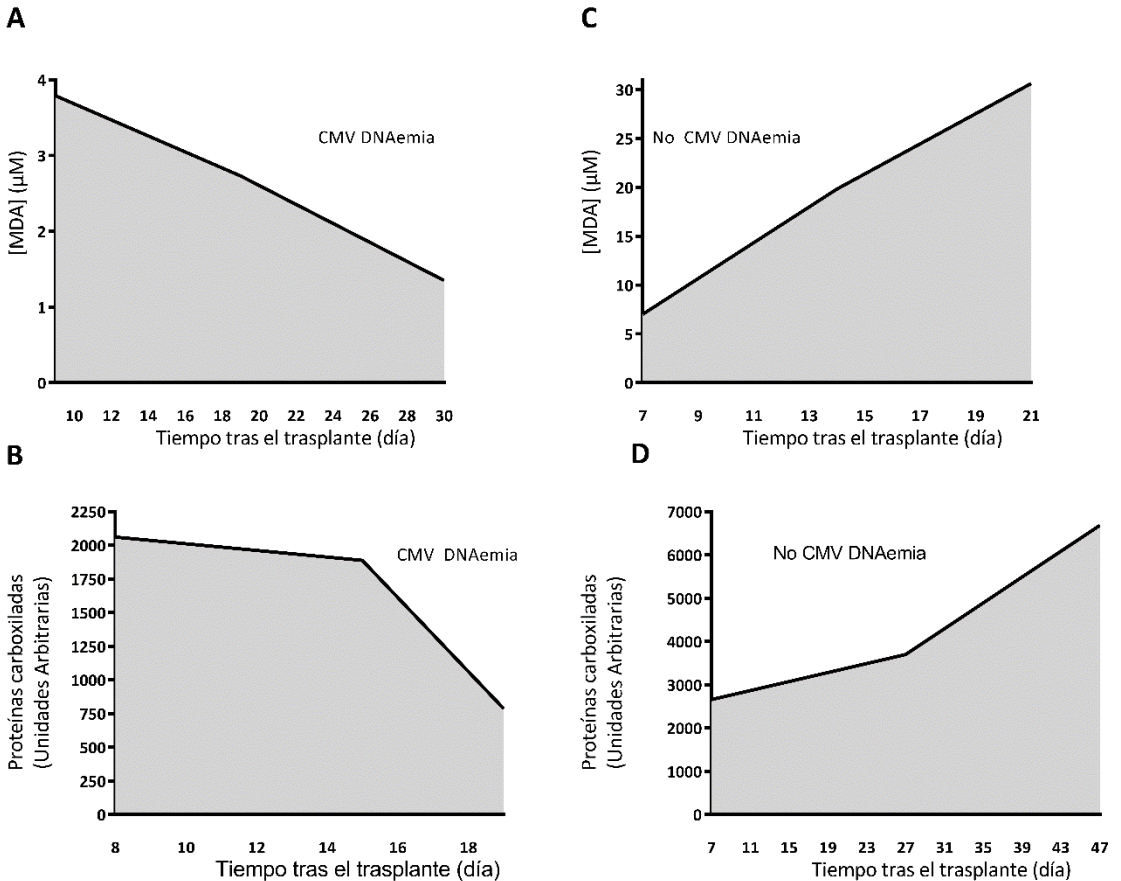


Figura 6. Perfiles representativos de AUC para MDA y CP en receptores de alo-TPH sin DNAemia por CMV documentada (A, B), o en aquellos que posteriormente desarrollaron DNAemia por CMV (C, D).

Se midió los niveles de malondialdehído y proteínas carboxiladas en muestras de plasma (tres por individuo) en todos los pacientes. Solo se obtuvo resultado para el MDA en 43 pacientes, debido a que el volumen de la muestra de plasma fue insuficiente para llevar a cabo la medición en todos. De estos 43 paciente, solo 28 de ellos tenían DNAemia causada por



CMV. De igual forma, se consiguió cuantificar el nivel de CP en 53 pacientes (por el mismo motivo descrito con anterioridad), de los que solo 38 desarrollaron DNAemia por CMV. Con estos datos, se comparó el área bajo la curva y los valores máximos (pico) de ambos marcadores en los pacientes que desarrollaron la DNAemia y en los que no. En la figura 6 se muestran diversos perfiles representativos de AUC de los pacientes de ambos grupos.

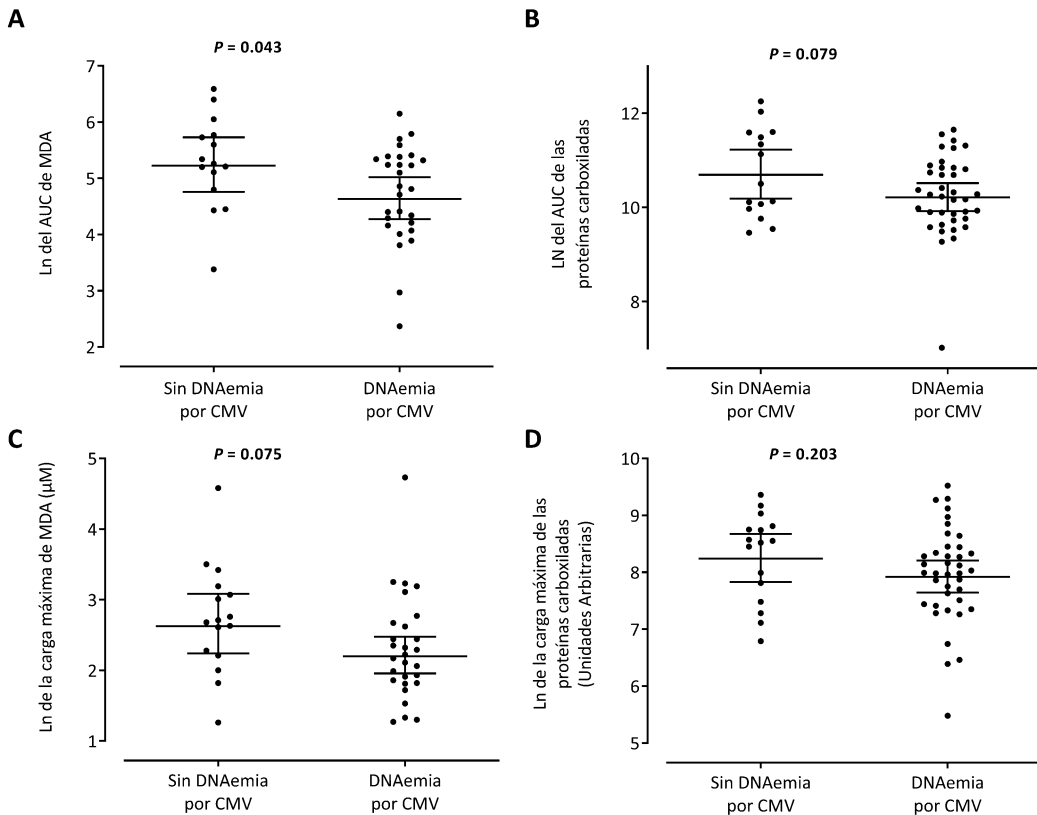


Figura 7. AUC (A, B, respectivamente) y valores máximos (C, D, respectivamente) en receptores de alo-TPH que desarrollaron o no, con posterioridad, DNAemia por CMV para MDA y CP.

Los valores del AUC para el MDA fueron significativamente más bajos en aquellos pacientes que desarrollaron DNAemia por CMV,

comparados con los valores de los pacientes que no la desarrollaron. El *P*-valor de la prueba fue de 0,043. Así mismo, también se observó una tendencia hacia valores más bajos en el AUC de las proteínas carboxiladas en pacientes que desarrollaron la DNAemia ($P = 0,079$). Los niveles máximos de MDA, pero no los de CP, también tendieron a ser más bajos en pacientes que acabarían desarrollando la DNAemia por CMV ($P = 0,075$ para el MDA y $P = 0,203$ para las CP). Todos estos datos pueden observarse en la figura 7. Las curvas ROC construidas con las AUC para el MDA y la CP indicaron que solo el biomarcador MDA (figura 8) poseía suficiente capacidad predictiva para discriminar entre pacientes que desarrollaron o no la DNAemia por CMV con posterioridad AUC = 0,69; IC95%: 0,51 – 0,58; $P = 0,050$]. Sin embargo, este poder discriminatorio resultó ser bastante modesto, pues el umbral establecido en el valor superior del IC95% para los pacientes que desarrollaron la DNAemia por CMV (AUC $\leq 5,1$) pronosticó valores predictivos negativos y positivos del 78,9% y el 45,8% respectivamente.

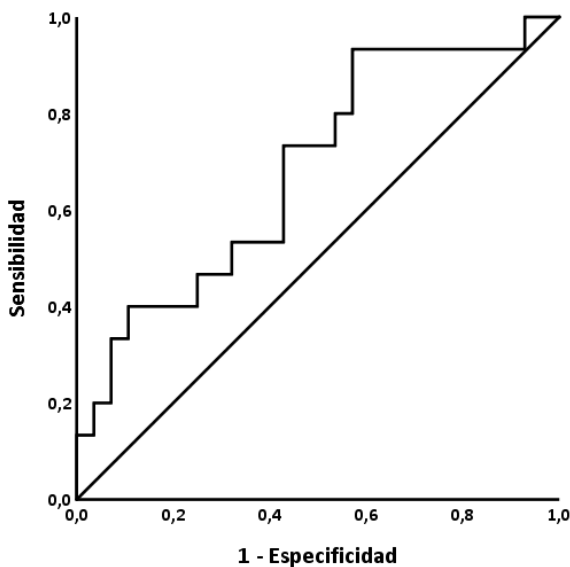


Figura 8. Curva ROC construida a partir del AUC de MDA.

Sin embargo, los AUC de ambos marcadores (MDA y CP) fueron más bajos en los episodios de DNAemia causada por CMV con una cinética replicativa del virus más rápida ($td < 2$ días) y en aquellos que alcanzaron niveles máximos de DNA de CMV (1.500 UI/mL) y que, por lo tanto, requirieron terapia antiviral según los parámetros explicados en el punto correspondiente (tabla 3). No obstante, las diferencias no alcanzaron una significación estadística relevante.

1.3. Parámetros de trasplante basales y marcadores de estrés oxidativo presentes en plasma.

Dos parámetros previos al trasplante se asociaron con AUC significativamente más bajas (tabla 3) o niveles máximos de MDA (tabla 4): la recepción de un aloinjerto haploidéntico (y no compatible con proteínas HLA en general) y el uso de Ciclosporina A y Micofenolato Mofetilo en regímenes conjuntos con Ciclofosfamida como profilaxis preventiva de EICH. Sin embargo, no se encontraron asociaciones con valores estadísticos significativos entre estos parámetros y los AUC o niveles máximos de CP (tablas 3 y 4)

Tabla 4. Niveles plasmáticos máximos de los marcadores de estrés oxidativo según el trasplante basal y los parámetros cinéticos de DNAemia por CMV. Se considera un P -valor ≤ 0.05 como estadísticamente significativo.

Parámetro	Media del pico	P -valor	Media del pico de las	P -valor
	de MDA (IC 95%)		proteínas carboxiladas (IC 95%)	
Sexo				
Hombre	2.4 (2.2 – 2.7)	0.706	8.1 (7.9 – 8.4)	0.335
Mujer	2.5 (2.0 – 3.0)		8.0 (7.8 – 8.4)	
Compatibilidad HLA				



Haploidéntico	1.9 (1.7 – 2.1)		8.0 (7.5 – 8.5)	
Idéntico	2.7 (2.4 – 3.0)	< 0.001	8.0 (7.6 – 8.3)	0.684
No idéntico	3.7 (1.4 – 6.0)		8.4 (6.4 – 10.7)	
Tipo de donante				
Emparentado	2.3 (2.1 – 2.6)		8.1 (7.9 – 8.4)	
No emparentado	2.7 (2.2 – 3.2)	0.160	7.8 (7.6 – 8.4)	0.222
Fuente del TPH				
Sangre periférica	2.5 (2.2 – 2.7)		8.0 (7.9 – 8.3)	
Médula ósea	2.1 (-)	0.658	8.6 (-)	0.774
Sangre de cordón umbilical	-		8.1 (-)	
Acondicionamiento				
Intensidad estándar	2.8 (2.0 – 3.6)		7.9 (7.4 – 8.4)	
Intensidad reducida	2.4 (2.1 – 2.6)	0.198	8.1 (8.0 – 8.4)	0.487
Profilaxis frente a EICH				
Ciclosporin A / Micofenolato de mofetilo*	1.9 (1.7 – 2.1)		8.0 (7.5 – 8.5)	
Otras combinaciones	2.8 (2.1 – 3.3)	< 0.001	8.1 (-)	0.698
Serología para CMV				
D+/R+	2.4 (2.1 – 2.7)		8.1 (7.9 – 8.4)	
D-/R+	2.7 (2.3 – 3.1)	0.322	8.1 (7.7 – 8.5)	0.984
Infección por CMV				
Sí	2.3 (2.0 – 2.6)		8.0 (7.8 – 8.3)	
No	2.7 (2.3 – 3.2)	0.075	8.3 (8.0 – 8.8)	0.203
Pico de la DNAemia				
< 1500 UI/mL	2.5 (2.2 – 2.9)		7.9 (7.6 – 8.2)	
≥ 1500 UI/mL	2.1 (1.7 – 2.6)	0.205	8.0 (7.8 – 8.6)	0.579
Tiempo de duplicación				
< 2 días	2.3 (1.2 – 3.3)		7.9 (7.4 – 9.0)	
≥ 2 días	2.4 (2.1 – 2.7)	0.715	8.0 (7.7 – 8.3)	0.767

*Dentro de este grupo se incluyen, también, todos los pacientes tratados con ciclofosfamida.

2. Validación del modelo metabólico en plasma que permite la anticipación de la infección por CMV en el Alo-TPH.

La cohorte de estudio incluyó 79 pacientes adultos no consecutivos que se sometieron a alo-TPH de células T a raíz de algún trastorno



hematológico, en la Unidad de Hematología del Hospital Clínico Universitario de Valencia, entre junio de 2013 y agosto de 2015. La mediana de edad de los diferentes pacientes fue de 54 años, con un rango mínimo-máximo de 20 a 70 años. Los datos clínicos y demográficos relevantes de los pacientes se han mostrado previamente en la tabla 1. El único criterio de exclusión que se aplicó fue la falta de muestras de plasma disponibles para la realización del perfil metabolómico. El periodo de estudio comprendió los primeros 100 días tras el trasplante y solo se consideraron los primeros episodios de DNAemia por CMV.

2.1. Éxito de la predicción.

De los 79 pacientes que incluyó la cohorte de estudio, 50 (63,2%) desarrollaron DNAemia por CMV con una mediana de 39 días tras el Alo-TPH y un rango mínimo-máximo de 10 a 99 días. La mediana de la carga inicial de DNA de CMV fue de 102 UI/mL, con un rango de 30 a 177.086 UI/mL, y una mediana de 1.803 UI/mL para el pico de la carga de DNA de CMV y un rango de 75 a 4.159.486 UI/mL. El resto de pacientes (29, 36,8%) no tuvieron DNAemia por CMV durante el periodo de estudio. Solo 25 pacientes (el 50% de los pacientes con DNAemia por CMV) precisaron de terapia antiviral preventiva. La incidencia de infecciones bacterianas de cualquier origen y EICH grave que requirió la administración de corticoides a dosis altas durante el periodo de estudio se equilibró con pacientes con y sin DNAemia por CMV, aunque no se muestra. La relevancia de esto radica en el potencial efecto de estos dos eventos en la composición del perfil metabolómico del plasma (Mickiewicz et al., 2014).

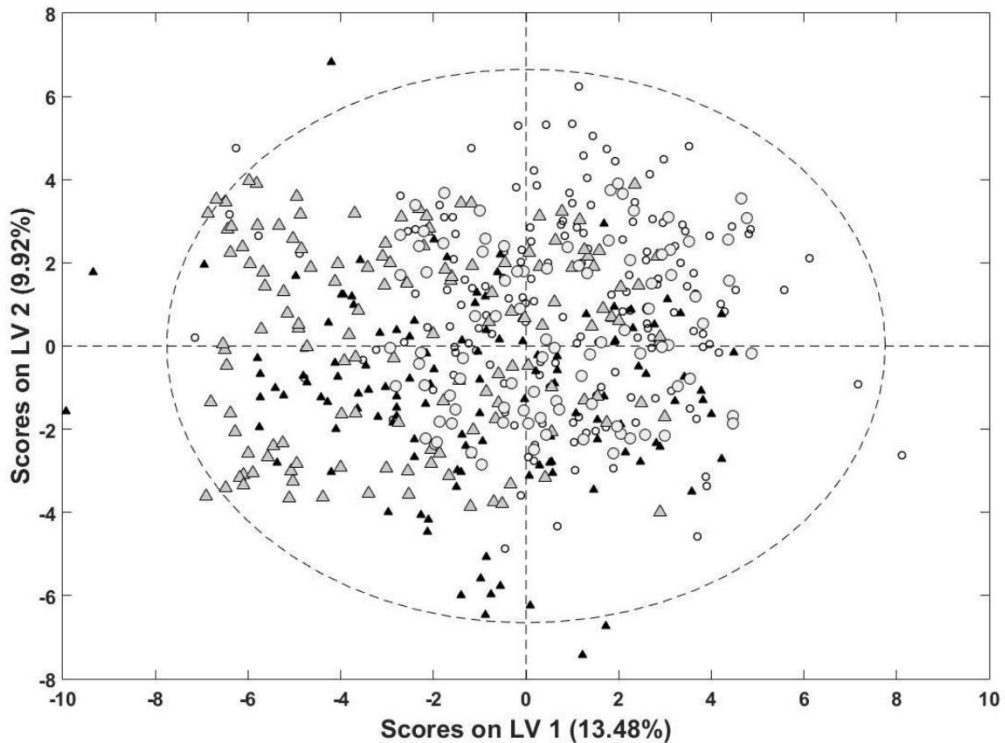


Figura 9. Proyección de la cohorte de validación sobre el diagrama de gráfico de puntuaciones del modelo de entrenamiento PLS-DA de metabolómica (Monleon et al., 2015). Los íconos pequeños representan los datos de la cohorte de entrenamiento (triángulos negros para muestras de pacientes que posteriormente desarrollan DNAemia por CMV y círculos blancos para pacientes que no la desarrollan, dentro de un marco de tiempo comparable). Los íconos grises más grandes representan los datos de la cohorte de validación (triángulos gris oscuro para muestras de pacientes que posteriormente desarrollan DNAemia por CMV y círculos grises claros para pacientes que no la desarrollan dentro de un marco de tiempo comparable). La línea de puntos representa el rango de confianza del 95% del modelo de metabolómica plasmática PLS-DA. Los valores atípicos se incluyen en el gráfico.

Un total de 135 muestras de plasma de pacientes que desarrollaron DNAemia por CMV (mediana de 2 muestras por pacientes y un rango de 1 a 8 muestras por pacientes) estaban disponibles. Todas estas muestras se recolectaron a intervalos de una semana aproximadamente y fueron extraídas antes de la aparición de la DNAemia. La mayoría de las muestras, alrededor del 90%, se obtuvieron antes del día 40 tras el trasplante. De igual forma, se obtuvieron 92 muestras extraídas de pacientes sin

DNAemia que pertenecían a un marco de tiempo tras el trasplante comparable al de los pacientes que sí tuvieron DNAemia.

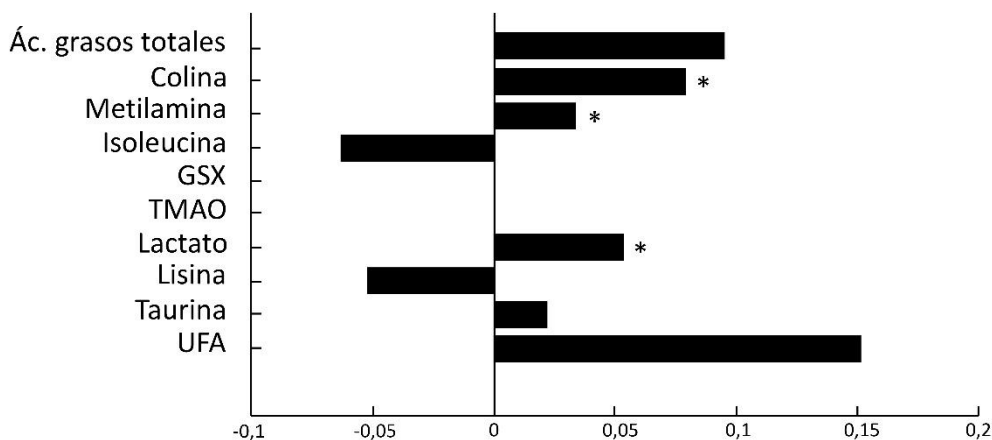


Figura 10. Cambios relativos en la concentración de metabolitos con las puntuaciones VIP ≥ 1 del modelo de metabolómica plasmática PLS-DA entre muestras de pacientes que posteriormente desarrollan DNAemia por CMV y muestras de pacientes sin DNAemia por CMV documentada dentro del período de estudio. Los cambios se calcularon como las diferencias entre los valores promedio de las muestras de prueba y las muestras de control normalizadas a los valores promedio de las muestras de control. Los valores positivos y negativos en el eje x significan que la concentración promedio para un metabolito dado en el grupo de prueba es mayor o menor, respectivamente, que en el grupo de control. Los valores numéricos representados $\times 100$ corresponden al porcentaje de aumento o disminución para cada metabolito. (* P-valor $< 0,05$).

La proyección de la cohorte de estudio dentro de diagrama de puntos del modelo PLS-DA metabolómico comentado anteriormente (Monleon et al., 2015) dio como resultado solo 3 muestras fuera del rango de confianza (95%) descrito en las figuras 9 y 10. 8 de los 10 metabolitos que contribuyeron al modelo descrito con anterioridad (Monleon et al., 2015) (puntuaciones VIP ≥ 1), incluyendo taurina, colina, metilamina, lactato y ácidos grasos totales e insaturados (regulados de forma positiva en muestras de plasma de pacientes que desarrollaron DNAemia por CMV con posterioridad), y la lisina y la isoleucina (regulados de forma negativa), reprodujeron la tendencia en la cohorte de validación (figura 9 y 10, tabla

5), aunque solo la colina, la metilamina y el lactato estaban en concentraciones que diferían de forma significativa entre las muestras de prueba y las muestras control. En contraste con los hallazgos anteriores en el modelo (Monleon et al., 2015), no se observaron diferencias entre las muestras de prueba y las muestras control en los dos metabolitos restantes, GSX y TMAO. A pesar de estas diferencias, la tasa de éxito predictivo del modelo para la DNAemia por CMV fue del 64% para muestras (87 de 135 muestras de plasma de pacientes que finalmente tuvieron DNAemia se clasificaron de forma correcta) y pacientes (32 de 50 pacientes con 1 o más muestras fueron clasificados de forma correcta).

Tabla 5. Contenido relativo de metabolitos individuales con respecto al contenido total de metabolitos en todas las muestras disponibles del trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas con o sin DNAemia por CMV posterior.

Metabolito más probable	DNAemia por CMV		No DNAemia por CMV		p-valor
	Media	SD	Media	SD	
Ácidos grasos totales	0,0021	0,0071	0,0023	0,0057	0,212
Colina	0,0038	0,0022	0,0041	0,0017	0,049
Metilamina	0,0047	0,0018	0,0049	0,0018	0,028
Isoleucina	0,0048	0,0028	0,0045	0,0034	0,391
GSX	0,0016	0,0012	0,0016	0,0010	0,403
TMAO	0,0016	0,0007	0,0016	0,0006	0,227
Lactato	0,0037	0,0004	0,0039	0,0004	0,045
Lisina	0,0039	0,0021	0,0037	0,0019	0,142
Taurina	0,0048	0,0019	0,0049	0,0015	0,139
UFA	0,0046	0,0021	0,0053	0,0022	0,059

La precisión en el modelo original (Monleon et al., 2015) fue del 73%. Las diferencias en las características entre los pacientes de dicho modelo y los de este estudio, así como en los tiempos de muestreo,



podrían explicar la pequeña disminución en la capacidad discriminativa del mismo.

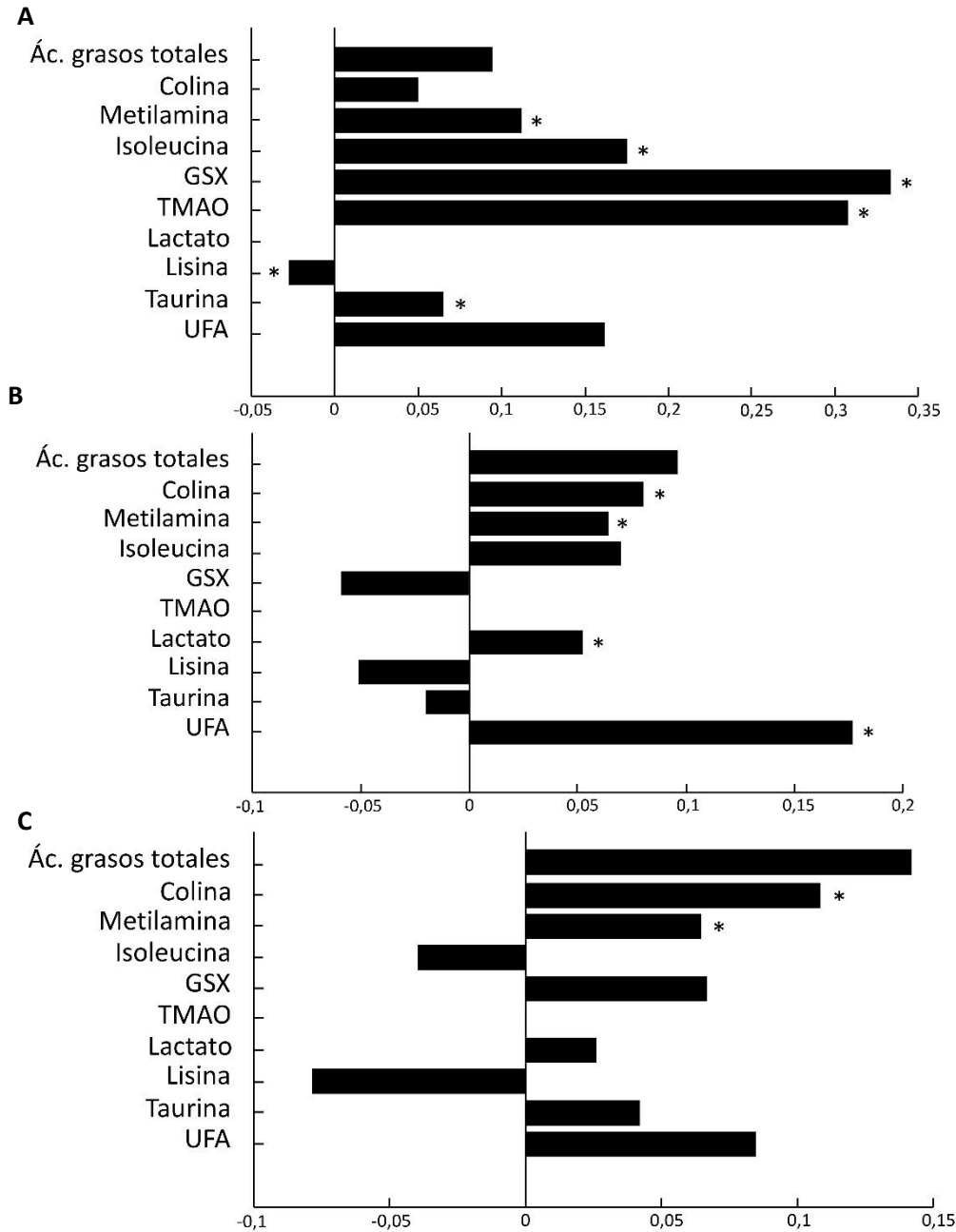


Figura 11. Diferencias metabólicas entre las muestras de pacientes con trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (alo-TPH) que posteriormente desarrollaron DNAemia por CMV y las de pacientes sin DNAemia por CMV documentada dentro del período de estudio. (A) Todas las muestras de pacientes de alto riesgo. (B) Todas las muestras de pacientes de bajo riesgo. (C) Una sola muestra obtenida en una mediana de 21 días después de alo-TPH. (* P -valor $< 0,05$).

2.2. Éxito de la predicción para grupos de alto y bajo riesgo.

También se evaluó la eficacia con que el modelo predice la aparición de DNAemia por CMV en pacientes clasificados como alto o bajo riesgo para este evento, de acuerdo con sus características de trasplante (Romero, Blanco, Giménez, Solano, & Navarro, 2015). Los pacientes que cumplieron con una o más de las condiciones que aparecen a continuación fueron catalogados como de alto riesgo: recibir sangre de cordón umbilical o aloinjerto de médula ósea, poseer como donante a alguien con HLA no compatible (incluidos los donantes haploidénticos) y relación serológica D-/R+ para CMV. Los pacientes de bajo riesgo son aquellos que no cumplieron ninguna de las condiciones anteriores.

Tabla 6. Contenido relativo de metabolitos individuales con respecto al contenido total de metabolitos en todas las muestras disponibles de trasplante de células madre hematopoyéticas alogénicas de alto riesgo con o sin DNAemia por CMV posterior.

Metabolito más probable	DNAemia por CMV		No DNAemia por CMV		p-valor
	Mean	SD	Mean	SD	
Ácidos grasos totales	0,0021	0,0078	0,0023	0,0060	0,097
Colina	0,0040	0,0026	0,0042	0,0018	0,051
Metilamina	0,0045	0,0025	0,0050	0,0029	0,025
Isoleucina	0,0034	0,0042	0,0040	0,0011	0,011
GSX	0,0012	0,0004	0,0016	0,0020	0,043
TMAO	0,0013	0,0003	0,0017	0,0014	0,021
Lactato	0,0040	0,0007	0,0040	0,0008	0,517
Lisina	0,0038	0,0016	0,0037	0,0023	0,049
Taurina	0,0046	0,0016	0,0049	0,0017	0,022
UFA	0,0050	0,0033	0,0058	0,0029	0,059

Un total de 59 pacientes de alto riesgo se incluyeron en la cohorte de validación, de los cuales, 39 tenían DNAemia por CMV. 173 muestras

de sangre de estos pacientes estaban disponibles para analizar. Pero solo 106 pertenecían a pacientes que desarrollaron la DNAemia. El modelo pudo clasificar correctamente el 65% de las muestras de plasma (69 de 106) y categorizó con precisión el 64% de los pacientes (12 de 20). Las tendencias y la concentración relativa de la mayoría de los metabolitos que contribuyen al modelo en las muestras de prueba y control para este subgrupo de receptores de trasplante (figura 11 y tabla 6) se superponen casi en su totalidad con la cohorte del modelo. Solo la isoleucina mostró una tendencia opuesta.

Tabla 7. Contenido relativo de metabolitos individuales con respecto al contenido total de metabolitos en todas las muestras disponibles de trasplante de células madre hematopoyéticas alogénicas de bajo riesgo con o sin DNAemia por CMV posterior.

Metabolito más probable	DNAemia por CMV		No DNAemia por CMV		p-valor
	Mean	SD	Mean	SD	
Ácidos grasos totales	0,0021	0,0085	0,0023	0,0045	0,171
Colina	0,0037	0,0023	0,0040	0,0015	0,047
Metilamina	0,0046	0,0018	0,0049	0,0017	0,015
Isoleucina	0,0042	0,0023	0,0045	0,0036	0,422
GSX	0,0017	0,0011	0,0016	0,0009	0,312
TMAO	0,0016	0,0006	0,0016	0,0007	0,121
Lactato	0,0037	0,0003	0,0039	0,0004	0,037
Lisina	0,0039	0,0019	0,0037	0,0020	0,107
Taurina	0,0050	0,0023	0,0049	0,0019	0,095
UFA	0,0045	0,0021	0,0053	0,0021	0,049

Además, en la cohorte de estudio se incluyeron 20 pacientes de bajo riesgo, 11 de los cuales desarrollaron DNAemia por CMV. Se dispuso de 54 muestras de plasma de este subconjunto de pacientes. 29 de ellas pertenecían a los pacientes que desarrollaron la DNAemia con posterioridad. La tasa de éxito de predicción del modelo de metabolómica

fue del 6% (18 de 29 muestras fueron clasificadas de forma correcta; 7 de 11 pacientes se categorizaron correctamente). La concentración relativa de los metabolitos que contribuyeron al modelo en las muestras de prueba y control fue ligeramente diferente de la de la cohorte inicial (Monleon et al., 2015) (figura 11 y tabla 7). En concreto, GsX y taurina mostraron una tendencia opuesta a la del primer modelo.

2.3. Éxito de la predicción en un solo punto temporal.

Tabla 8. Contenido relativo de metabolitos individuales con respecto al contenido total de metabolitos en muestras obtenidas en un solo punto de tiempo (mediana, día 21 tras el trasplante) del trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas con o sin DNAemia por CMV posterior.

Metabolito más probable	DNAemia por CMV		No DNAemia por CMV		p-valor
	Mean	SD	Mean	SD	
Ácidos grasos totales	0,0021	0,0063	0,0024	0,0059	0,100
Colina	0,0037	0,0017	0,0041	0,0021	0,038
Metilamina	0,0046	0,0021	0,0049	0,0019	0,031
Isoleucina	0,0050	0,0017	0,0048	0,0024	0,172
GSX	0,0015	0,0009	0,0016	0,0010	0,081
TMAO	0,0017	0,0008	0,0017	0,0006	0,145
Lactato	0,0038	0,0005	0,0039	0,0004	0,072
Lisina	0,0039	0,0021	0,0036	0,0022	0,189
Taurina	0,0047	0,0016	0,0049	0,0018	0,079
UFA	0,0048	0,0018	0,0052	0,0019	0,061

En el estudio anterior (Monleon et al., 2015) se observó que la tasa de predicción máxima del modelo se logró al analizar las muestras extraídas alrededor de las 3 semanas después del alo-TPH. Se obtuvieron muestras, para ese rango de tiempo (mediana 21 días, rango mínimo-máximo 18 a 29 días) de 77 pacientes de la presente cohorte, de los



cuales, 38 desarrollaron DNAemia por MCV. El modelo metabolómico predijo correctamente la aparición de la DNAemia por CMV en 27 de los 38 pacientes (71%). La concentración relativa de metabolitos en las muestras de prueba y control (figura 11 tabla 8) reflejó las mismas que las de la cohorte inicial, pero con diversas diferencias en algunos de los componentes (GsX, TMAO, lactato y lisina perdieron significancia estadística).

3. Investigación de marcadores de inflamación como predictores de la infección activa por CMV.

3.1. Episodios de DNAemia por CMV en la población de estudio.

De los 46 pacientes incluidos en el estudio, 22 tuvieron un primer episodio de DNAemia por CMV, con una mediana de 34 días tras el alo-TPH y un rango mínimo-máximo de 19 a 50 días. Las medianas de las cargas iniciales y los picos de DNA fueron de 80,5 UI/mL (rango: 30,5 – 398 UI/mL) y 3.141 UI/mL (rango 80,5 – 123.393 UI/mL) respectivamente. Los episodios de DNAemia por CMV duraron una media de 43 días, con un rango mínimo-máximo de 18 a 142 días. 14 de los 22 pacientes recibieron terapia antiviral preventiva con (val)ganciclovir. No se encontraron diferencias significativas entre pacientes con o sin DNAemia por CMV con respecto a la mayoría de las características demográficas y clínicas (tabla 9). Solo el estado serológico del receptor para CMV obtuvo un valor estadístico significativo ($P = 0,003$) entre los grupos de comparación.

Tabla 9. Características demográficas y clínicas de los pacientes con y sin DNAemia por CMV.

Parametro	Nº. de pacientes (%)		P-value
	CMV (n = 22)	No CMV (n =24)	
Sexo			
Masculino	14 (48.3%)	15 (51.7%)	0.936
Femenino	8 (47.1%)	9 (52.9%)	
Underlying disease			
Leucemia aguda	8 (53.3%)	7 (46.7%)	0.589
Leucemia crónica	3 (37.5%)	5 (62.5%)	
Linfoma	9 (50.0%)	9 (50.0%)	
Síndrome mielodisplásico/ Mielofibrosis	2 (66.7%)	1 (33.3%)	
Mieloma múltiple	0 (0.0%)	2 (100.0%)	
Compatibilidad HLA			
Idéntico	14 (43.8%)	18 (56.2%)	0.403
No idéntico	8 (57.1%)	6 (42.9%)	
Tipo de donante			
Emparentado	11 (39.3%)	17 (60.7%)	0.148
No emparentado	11 (61.1%)	7 (38.9%)	
Fuente del TPH			
Sangre periférica	17 (45.9%)	20 (54.1%)	0.605
No sangre periférica	5 (55.6%)	4 (44.4%)	
Acondicionamiento			
Intensidad reducida	15 (50.0%)	15 (50.0%)	0.686
Intensidad estándar	7 (43.8%)	9 (56.3%)	
Profilaxis frente a EICH			
Régimen con Ciclofosfamida	5 (62.5%)	3 (37.5%)	0.215
Régimen con Ciclosporin A	9 (36.0%)	16 (64.0%)	
Régimen con Sirolimus	8 (61.5%)	5 (38.5%)	
Profilaxis con ATG			
Sí	5 (62.5%)	3 (37.5%)	0.361
No	17 (44.7%)	21 (55.3%)	
Seroestatus para CMV del donante			
D+	14 (43.8%)	18 (56.3%)	0.403
D-	8 (57.1%)	6 (42.9%)	
Seroestatus para CMV del receptor			
R+	21 (60.0%)	14 (40.0%)	0.003



R-	1 (9.1%)	10 (90.9%)	
Enfermedad injerto contra huésped			
Grado 0-I	15 (44.1%)	19 (55.9%)	0.091
Grado II-IV	7 (58.3%)	5 (41.7%)	

3.2. Cinética de los biomarcadores inflamatorios plasmáticos en relación a la ocurrencia de DNAemia por CMV.

Tabla 10. Área bajo la curva (AUC) de citoquinas proinflamatorias en plasma, en receptores alogénicos de trasplante de células madre hematopoyéticas con o sin DNAemia por CMV posterior.

Biomarcador	Mediana del log ₁₀ del AUC	Rango del log ₁₀ del AUC	P-valor
CRP (mg/l)			
DNAemia por CMV	2.72	2.25 – 3.39	0.317
No DNAemia por CMV	2.87	2.25 – 3.41	
DNAemia por CMV contratamiento preventivo con antivirales	2.92	2.51-3.39	0.002
DNAemia por CMV con resolución sin tratamiento	2.54	2.25-2.74	
IP-10 (pg/l)			
DNAemia por CMV	2.99	1.43 – 3.91	0.291
No DNAemia por CMV	3.11	2.01 – 4.12	
DNAemia por CMV contratamiento preventivo con antivirales	3.35	1.43-3.76	0.525
DNAemia por CMV con resolución sin tratamiento	2.85	3.39-3.91	
sTNF-R2 (pg/ml)			
DNAemia por CMV	4.03	2.72 – 4.36	0.226
No DNAemia por CMV	4.06	3.36– 4.41	
DNAemia por CMV contratamiento preventivo con antivirales	4.09	2.72-4.36	0.526
DNAemia por CMV con resolución sin tratamiento	3.78	3.38-4.26	
TGFβ-1 (pg/ml)			
DNAemia por CMV	3.81	1.32 – 4.64	0.020
No DNAemia por CMV	4.17	1.64 – 4.92	

DNAemia por CMV con tratamiento preventivo con antivirales	3.95	1.32 – 4.64	0.764
DNAemia por CMV con resolución sin tratamiento	3.25	1.32 – 4.46	

A

Rango de días	-7 – 0	1 – 10	11 – 20	21 – 30	31 – 40	41 – 50
Paciente 1		x		x	x ↑	
Paciente 2	x		x		x ↑	
Paciente 3		x		x	x	↑
Paciente 4	x		x	x	↑	
Paciente 5	x		x x		↑	
Paciente 6	x	x	x x	↑		
Paciente 7	x	x	x x	↑		
Paciente 8	x	x	x x		↑	
Paciente 9	x	x	x x ↑			
Paciente 10		x	x	x ↑		
Paciente 11		x	x		x	↑
Paciente 12	x			x		↑
Paciente 13		x	x		x ↑	
Paciente 14	x	x	x	x ↑		
Paciente 15	x			x x		↑
Paciente 16	x	x	x	x	↑	
Paciente 17	x	x	x	x	↑	
Paciente 18		x	x	x	↑	
Paciente 19	x	x	x	x	↑	
Paciente 20	x	x	x	x	↑	
Paciente 21	x	x	x	x ↑		
Paciente 22			x	x	x	↑

B

Rango de días	-7 – 0	1 – 10	11 – 20	21 – 30	31 – 40	41 – 50
Paciente 23		x	x		x	
Paciente 24		x		x	x	
Paciente 25		x	x		x	
Paciente 26		x		x	x	
Paciente 27		x	x		x	
Paciente 28		x		x		x
Paciente 29	x	x		x		
Paciente 30	x		x		x	
Paciente 31	x	x	x x			
Paciente 32	x	x	x x			
Paciente 33		x	x		x	
Paciente 34	x	x	x x			
Paciente 35	x	x	x	x		
Paciente 36		x x	x	x		
Paciente 37	x	x	x x			
Paciente 38	x	x	x x			
Paciente 39			x	x	x	
Paciente 40			x	x	x	
Paciente 41			x	x	x	
Paciente 42			x	x	x	
Paciente 43		x x	x			
Paciente 44		x x		x		
Paciente 45		x	x	x x		
Paciente 46		x x	x	x		

Figura 12. Ventanas temporales (x) en las que se extrajeron muestras de plasma para análisis en pacientes que posteriormente desarrollaron infección activa por CMV (A, flechas) o no (B).



Se investigó si los niveles plasmáticos de biomarcadores inflamatorios medidos desde el momento del acondicionamiento predecían el desarrollo de DNAemia por CMV. Se dispuso de una mediana de 4 muestras de plasma por paciente, con un rango de 3 a 4 muestras. Los tiempos a los que se tomaron las muestras y el momento de aparición de la DNAemia por CMV se muestran en la figura (figura 12).

Tanto los tiempos de los pacientes con DNAemia como los tiempos de aquellos que nunca la tuvieron son equivalentes. En concreto, un total de 75 especímenes para los pacientes con DNAemia por CMV y 81 para los que no la tuvieron, fueron analizados.

Se consideró dos parámetros cinéticos: el AUC, que refleja la exposición real al biomarcador seleccionado, y el nivel máximo de dicho marcador. Se encontró que, tanto el AUC de TGF- β 1 como el nivel máximo de dicha citoquina, fueron significativamente más bajos ($P = 0,020$ y $P = 0,026$, respectivamente) en pacientes que posteriormente desarrollaron DNAemia por CMV, que en aquellos que nunca la desarrollaron (tabla 10 y 11). De forma general, los niveles máximos de este biomarcador se alcanzaron con una mediana de 14,5 días (rango mínimo-máximo de -6 a 39 días) después del alo-TPH. Si se compara entre pacientes con DNAemia por CMV y pacientes sin ella, la mediana es de 14 días (rango: -6 – 35 días) y 16 días (rango: 3 – 39 días) respectivamente ($P = 0,890$).

Tabla 11. Pico de los niveles de citoquinas proinflamatorias en plasma, en receptores alogénicos de trasplante de células madre hematopoyéticas con o sin DNAemia por CMV posterior.

Biomarcador	Mediana del \log_{10} del AUC	Rango del \log_{10} del AUC	P-valor
CRP (mg/l)			
DNAemia por CMV	45.85	8.70 – 294.70	0.636
No DNAemia por CMV	42.90	9.40 – 186.70	

DNAemia por CMV contratamiento preventivo con antivirales	76.65	17.50 – 294.70	0.005
DNAemia por CMV con resolución sin tratamiento	21.70	8.70 – 68.00	
IP-10 (pg/l)			
DNAemia por CMV	66.29	2.52 – 828.29	0.262
No DNAemia por CMV	99.14	8.49 – 2363.45	
DNAemia por CMV contratamiento preventivo con antivirales	119.38	2.52 – 828.29	0.453
DNAemia por CMV con resolución sin tratamiento	38.46	14.46 – 527.13	
sTNF-R2 (pg/ml)			
DNAemia por CMV	521.84	29.53 – 1123.91	0.301
No DNAemia por CMV	619.49	148.56 – 1682.93	
DNAemia por CMV contratamiento preventivo con antivirales	630.35	29.53 – 1123.91	0.267
DNAemia por CMV con resolución sin tratamiento	291.26	126.52 – 781.20	
TGFβ-1 (pg/ml)			
DNAemia por CMV	438.94	1.00 – 2852.25	0.026
No DNAemia por CMV	1423.58	5.57 – 4965.15	
DNAemia por CMV contratamiento preventivo con antivirales	798.89	1.00 – 2852.25	0.330
DNAemia por CMV con resolución sin tratamiento	107.05	1.00 – 1630.10	

Ni las AUC ni las concentraciones máximas del resto de biomarcadores mostraron diferencias significativas en los grupos comparados.

A continuación, se realizó el análisis de la curva ROC para determinar los valores de corte óptimos para el AUC y el nivel máximo de TGF-β1, para así discriminar entre los pacientes que desarrollaron la DNAemia por CMV de los que no (figura 13). Se encontró que los umbrales óptimos fueron 3,75 pg×días/mL para el AUC y 437 pg/mL para el nivel máximo, ambos con una sensibilidad del 83,3% (IC95%: 68,4% – 98,2%) y



una especificidad del 50% (IC95%: 20,4% – 79,5%). Se descubrió que los niveles máximos y AUC de TGF- β 1 por debajo de los umbrales óptimos mencionados anteriormente, se asociaron de forma independiente con la aparición de DNAemia por CMV (OR = 7,21; IC95%: 1,31 – 42,7) en modelos de regresión logística multivariada ajustados por sexo, tipo de donante, fuente de células madre hematopoyéticas, compatibilidad con HLA, régimen de acondicionamiento, profilaxis para EICH y *serostatus* de CMV de D/R (no se muestra).

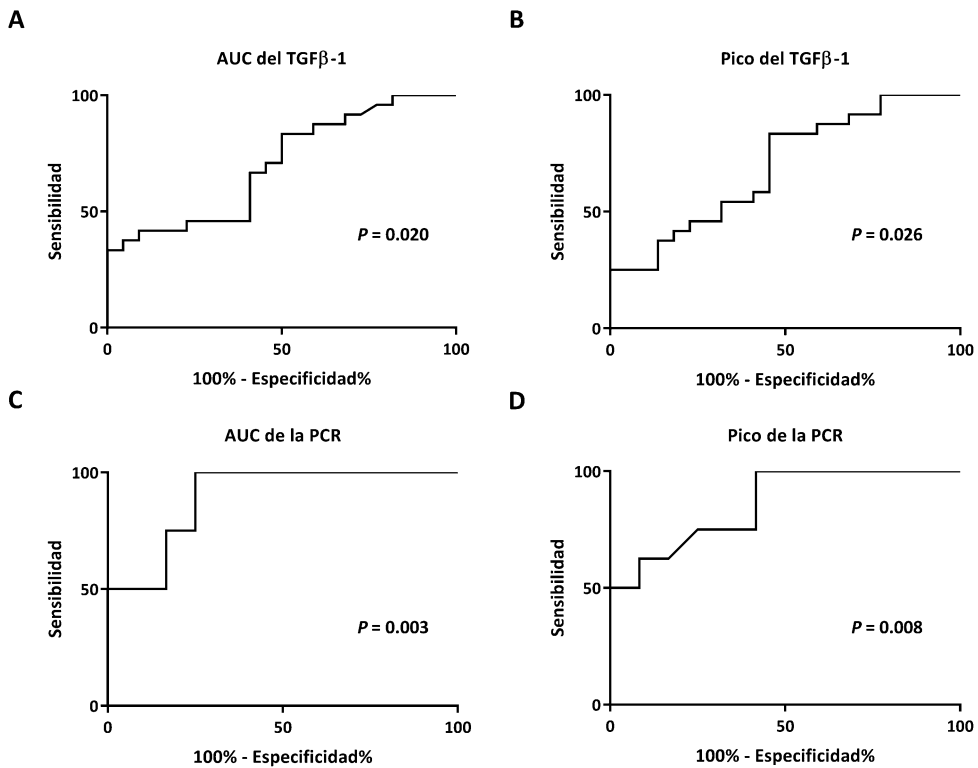


Figura 13. Curvas ROC que establecen el punto de corte para (A) el AUC y (B) el nivel máximo de TGF- β 1 en plasma, discriminando entre pacientes que posteriormente desarrollan DNAemia por CMV de aquellos que no la desarrollaron, y de (C) el AUC y (D) el nivel máximo de PCR que discrimina entre pacientes que eventualmente desarrollaron DNAemia por CMV y que requirieron terapia antiviral preventiva de aquellos que exhibían episodios de resolución automática.

Sin embargo, no se encontró correlación en la AUC o los niveles máximos de TGF- β 1 y la duración de la DNAemia por CMV ($\rho = -0,093$; $P = 0,681$. $\rho = -0,211$; $P = 0,345$).

De forma curiosa, fue el biomarcador inflamatorio PCR, y no el TGF- β 1, tanto en la magnitud AUC como en el nivel máximo, el que predijo la aparición de episodios de DNAemia por CMV que precisaron de PET (8 de 14 episodios). El análisis de la curva ROC (figura 13) para ambos parámetros (AUC y nivel máximo) indicó que los valores de corte óptimos para discriminar entre paciente que desarrollaron posteriormente DNAemia por CMV fueron 2,5 mg \times días/L y 16,7 mg/L respectivamente, con una sensibilidad del 100% (IC95%: 100%) y una especificidad del 50% (IC95%: 10% – 90%).

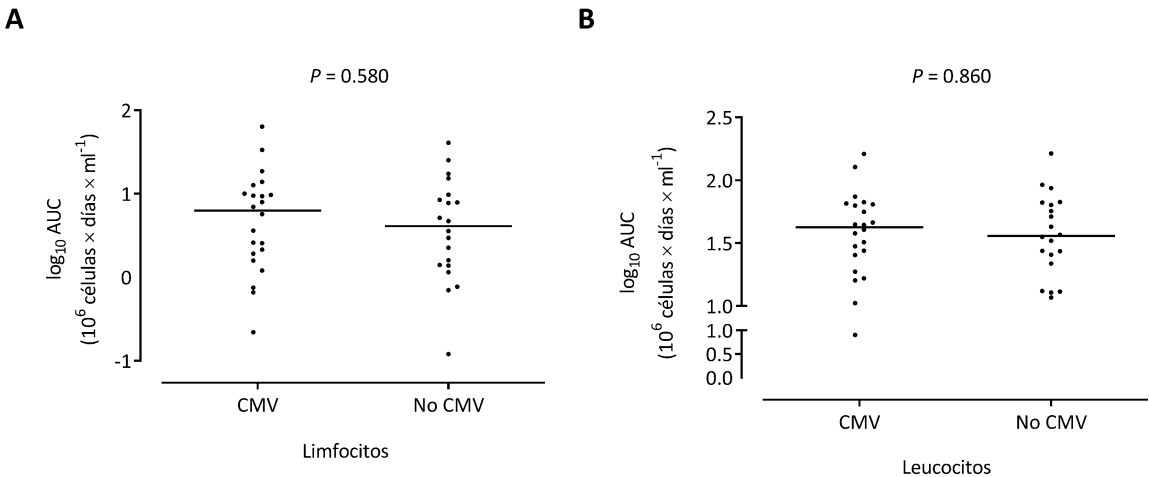


Figura 14. AUC para el \log_{10} del recuento de leucocitos y linfocitos absolutos medidos en los puntos de temporales elegidos para las mediciones de biomarcadores de plasma.

Es de destacar que los pacientes que desarrollaron DNAemia por CMV y los pacientes que no lo hicieron fueron comparables con respecto



a: incidencia de infecciones bacterianas de cualquier origen (que ocurren en 10 de 22 pacientes con DNAemia por CMV y en 12 de 24 pacientes sin DNAemia por CMV; $P = 0,400$); los valores de \log_{10} del AUC para leucocitos y linfocitos absolutos, cuyo cálculo tuvo en cuenta los recuentos de células sanguíneas medidos en los mismos puntos de tiempo que los seleccionados para las mediciones de los biomarcadores de plasma (figura 14); la incidencia de EICH (tabla 9); y el régimen de inmunosupresión utilizado para la prevención de EICH (tabla 9).

4. Utilización de los miRNA de CMV presentes en plasma para la predicción de la infección activa por CMV.

4.1. DNAemia por CMV en la población de estudio.

62 pacientes fueron incluidos en este estudio. De ellos, 42 desarrollaron un primer episodio de DNAemia por CMV, con una media de 35 días después del alo-TPH y un rango mínimo-máximo de 15 a 90 días. La mediana de las cargas iniciales y máximas de DNA de CMV fueron 152 UI/mL (rango: 30,5 – 1.707 UI/mL y 1.224 UI/mL (rango: 46 – 82.864 UI/mL) respectivamente. En esta cohorte, los pacientes con y sin DNAemia por CMV no diferían en cuanto a las variables clínicas y demográficas: sexo, enfermedad subyacente, tipo de aloinjerto, fuente de células madre hematopoyéticas, régimen de acondicionamiento, profilaxis frente al EICH, estado serológico de CMV de donante y receptor, e incidencia acumulada a EICH (tabla 12).

Tabla 12. Características demográficas y clínicas de los pacientes con y sin DNAemia por CMV.

Parámetro	Nº de pacientes (%)		P-valor
	CMV (n = 42)	No CMV (n = 20)	
Sexo			
Hombre	25 (64.1%)	14 (35.9%)	0.425
Mujer	17 (73.9%)	6 (26.1%)	
Enfermedad subyacente			
Leucemia aguda	15 (62.5%)	9 (37.5%)	0.147
Leucemia crónica	3 (75.0%)	1 (25.0%)	
Linfoma	9 (52.9%)	8 (47.1%)	
Síndrome mielodisplásico / Mielofibrosis	15 (88.2%)	2 (11.8%)	
Compatibilidad HLA			
Idéntico	11 (73.3%)	4 (26.7%)	0.371
Haplodéntico	28 (63.6%)	16 (36.4%)	
No idéntico	3 (100.0%)	0 (0.0%)	
Tipo de donante			
Emparentado	35 (67.3%)	17 (32.7%)	0.686
No emparentado	7 (70.0%)	3 (30.0%)	
Fuente del TPH			
Sangre periférica	36 (64.3%)	20 (35.7%)	0.075
Médula ósea	6 (100.0%)	0 (0.0%)	
Acondicionamiento			
Intensidad reducida	29 (67.4%)	14 (32.6%)	0.939
Intensidad estándar	13 (68.4%)	6 (31.6%)	
Profilaxis frente a EICH			
Régimen con Ciclofosfamida	34 (64.2%)	19 (35.8%)	0.248
Régimen con Ciclosporin A	5 (100.0%)	0 (0.0%)	
Régimen con Sirolimus	3 (75.0%)	1 (25.0%)	
Profilaxis con ATG			
No	42 (67.7%)	20 (32.3%)	-
Serología para CMV			
D+/R+	24 (72.7%)	9 (27.3%)	0.160
D+/R-	2 (33.3%)	4 (66.7%)	
D-/R+	16 (69.6%)	7 (30.4%)	
Existus antes de 365 días			
Sí	13 (76.5%)	4 (23.5%)	0.366
No	29 (64.4%)	16 (35.6%)	
EICH			
Grado 0-I	28 (70.0%)	12 (30.0%)	0.608
Grado II-IV	14 (63.6%)	8 (36.4%)	



4.2. miRNA de CMV en plasma en pacientes con o sin DNAemia posterior por CMV.

Se dispuso de un total de 163 muestras de plasma para la detección de miRNA de CMV. Estos plasmas se obtuvieron en diferentes momentos tras el alo-TPH: día +7 (58 pacientes), día +14 (54 pacientes) y día +30 (46 pacientes). En el caso de los que pacientes que acabaron desarrollando DNAemia por CMV, solo se consideró las muestras extraídas antes de la misma. Se realizaron ensayos para cinco de los siete miRNA de CMV (UL36-5p, US33-5p, UL148D, UL22A-5p y UL112-3p). Los miRNA de CMV Us25-1-5p y US4-5p no cumplieron con el criterio de validación predefinido (especificidad), por lo que se excluyeron del estudio.

Tabla 13. Tasa global de detección de especies de miRNAs de CMV en pacientes con o sin DNAemia por CMV posterior.

Número de miRNAs de CMV detectados en uno o más puntos temporales	DNAemia por CMV (número de pacientes)		P-valor
	Sí (42)	No (20)	
≥1	37	19	0.390
≥2	28	12	0.608
≥3	17	8	0.971
≥4	6	4	0.567

US33-5p y UL112-3p fueron los miRNA de CMV que se encontraron con mayor frecuencia en cualquiera de los puntos temporales establecidos, tanto en pacientes que desarrollaron DNAemia por CMV con posterioridad (el 66,6% y 69,0% de pacientes respectivamente), como en aquellos que no lo hicieron (el 75% y 65% de pacientes respectivamente). Como se muestra en la tabla 13, la tasa de detección de los miRNA de CMV no fue significativamente diferente entre los pacientes que desarrollaron la DNAemia por CMV y los que no lo hicieron, durante todo el período de

estudio. Este hecho fue independiente del estado serológico para CMV en relación al emparejamiento entre donante y receptor ($P = 0,395$). Tampoco hubo diferencias con respecto a las especies de miRNA de CMV en diferentes puntos temporales entre los pacientes con y sin DNAemia por CMV posterior a la monitorización de los mismos (tabla 14).

Tabla 14. Detección de las diferentes especies de miRNA de CMV, en cada uno de los puntos temporales, en pacientes con o sin DNAemia por CMV posterior.

Especies de miRNA de CMV/día tras el alo-TPH	DNAemia por CMV (número de pacientes)		P-value
	Sí (número total de pacientes estudiados)	No (número total de pacientes estudiados)	
UL36-5p			
+7	1 (41)	1 (17)	0.513
+14	3 (35)	3 (19)	0.420
+30	0 (28)	0 (18)	1.000
Cualquier punto temporal	4 (42)	3 (20)	0.624
US33-5p			
+7	14 (41)	8 (17)	0.356
+14	20 (35)	13 (19)	0.417
+30	1 (28)	1 (18)	0.747
Cualquier punto temporal	28 (42)	15 (20)	0.506
UL148D			
+7	13 (41)	9 (17)	0.129
+14	0 (35)	0 (35)	1.000
+30	0 (28)	1 (18)	0.207
Cualquier punto temporal	13 (42)	9 (20)	0.564
UL22A-5p			
+7	7 (41)	5 (17)	0.291
+14	6 (35)	3 (19)	0.899
+30	0 (28)	0 (18)	1.000
Cualquier punto temporal	12 (42)	5 (20)	0.629
UL112-3p			
+7	18 (41)	9 (17)	0.530
+14	20 (35)	9 (19)	0.492
+30	1 (28)	0 (18)	0.418
Cualquier punto temporal	29 (42)	13 (20)	0.750

La carga de miRNA de CMV, dato que se infiere por los C_T de las PCR realizadas, no varió entre los pacientes con DNAemia por CMV posterior y



aquellos pacientes que nunca desarrollaron la DNAemia. Esto ocurrió así en todos los puntos de tiempo que se evaluaron durante el período de estudio. Estos datos se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Carga de miRNAs de CMV en diferentes puntos de tiempo en pacientes con y sin DNAemia por CMV posterior.

Especies de miRNA de CMV/día tras el alo-TPH	Umbral de ciclo de PCR para miRNAs de CMV (C _T); mediana (rango)		P-valor
	Pacientes con DNAemia por CMV	Pacientes sin DNAemia por CMV	
US33-5p			
+7	35.2 (30.9-36.1)	35.2 (33.0-35.8)	0.631
+14	35.8 (32.8-37.4)	35.7 (33.0-37.0)	0.825
UL148D			
+7	36.3 (34.8-37.3)	36.2 (34.8-36.6)	0.825
UL22A-5p			
+7	36.9 (35.9-38.7)	36.2 (34.8-36.6)	0.227
UL112-3p			
+7	36.9 (35.9-38.7)	36.3 (35.4-37.2)	0.192
+14	36.4 (35.9-38.4)	35.9 (34.9-36.7)	0.291

No obstante, es de interés destacar que entre los pacientes que desarrollaron DNAemia por CMV, la detección de los miRNA de CMV US33-5p y UL112-3p en cualquier punto temporal, se asoció con mayores cargas iniciales de DNA de CMV (para US33-5p: media de 2,18 log₁₀ UI/mL frente a 1,98 log₁₀ UI/mL en pacientes con y sin miRNA detectable, $P = 0,019$; para UL112-3p: mediana de 2,19 log₁₀ UI/mL y 1,97 log₁₀ UI/mL en pacientes con y sin miRNA detectable, $P = 0,036$).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Igual que ha ocurrido en el apartado anterior, el de RESULTADOS, en este se van a exponer las diferentes discusiones de los mismos, derivadas de la hipótesis y de los objetivos planteados al principio del presente documento de tesis, siguiendo el esquema de los artículos que la conforman.

1. Investigación de marcadores de estrés oxidativo como mecanismo predictivo de la infección por Citomegalovirus.

En un estudio anterior (Monleon et al., 2015), se demostró que los niveles de antioxidante taurina y GSH presentes en el plasma, tras un alo-TPH, estaban elevados en pacientes que posteriormente desarrollaron DNAemia por CMV. En base a este hallazgo, se postuló la hipótesis de que el nivel neto de marcadores de estrés oxidativo en plasma también podría estar disminuido a la vez, y su cuantificación podría resultar útil para predecir la aparición de DNAemia por CMV. Para probar esta hipótesis, se midió los niveles plasmáticos de MDA, un compuesto orgánico que resulta de la peroxidación lipídica de ácidos grasos poliinsaturados (Moore & Roberts, 1998) y CP, derivados de carbonilo formados por el ataque oxidativo catalizado por metales hacia el amino de cadenas laterales con prolina, arginina, lisina y treonina (cadenas laterales ácidas) (Dalle-Donne et al., 2006). La utilidad de estos dos compuestos para inferir la magnitud de la oxidación de lípidos y proteínas mediada por ROS, ha sido demostrada de forma previa (Frijhoff et al., 2015).

Los datos obtenidos parecen apoyar la hipótesis inicial. En concreto, se observa que las AUC de MDA y los niveles máximos de MDA fueron más bajos en pacientes que luego desarrollaron DNAemia por CMV, en comparación con los medidos en los pacientes del estudio sin DNAemia por CMV documentada posteriormente. De hecho, las curvas ROC basadas en los datos de AUC para MDA indican que este biomarcador podría discriminar, aunque de forma bastante modesta, entre pacientes que desarrollaron o no DNAemia por CMV más tarde. Sin embargo, no ocurre lo mismo para el caso de la AUC y valores máximos de CP. Además, los estudios demuestran que la recepción de aloinjertos haploidénticos (junto con la profilaxis con ciclofosfamida para el EICH) u otras modalidades de aloinjerto no idéntico en cuanto a marcadores HLA, aumenta el riesgo de DNAemia por CMV (Boeckh, Murphy, & Peggs, 2015; Romero et al., 2015; Slade et al., 2017).

Cabe destacar que los dos grupos de estudio (pacientes con y sin DNAemia por CMV) estaban bien equilibrados en términos de edad, sexo, acondicionamiento quimioterápico y regímenes inmunosupresores frente al EICH. Este hecho es relevante, puesto que se ha demostrado en trabajos anteriores que todos los parámetros comentados modulan el nivel de marcadores de estrés oxidativo en tejidos y sangre (Lobo, Patil, Phatak, & Chandra, 2010; Mikhed, Daiber, & Steven, 2015; Sabuncuoglu, Kuskonmaz, Uckun Cetinkaya, & Ozgunes, 2012; Sari et al., 2008; Soldin & Mattison, 2009).

Ya se sabe que la inflamación desencadena la reactivación de CMV (Cook, Trgovcich, Zimmerman, Zhang, & Sedmak, 2006; Navarro, 2016; Prosch et al., 2000) y que el estrés oxidativo y la inflamación son procesos

fisiopatológicos estrechamente relacionados (Biswas, 2016). Por tanto, en

Receptores de alo-TPH seropositivos para CMV

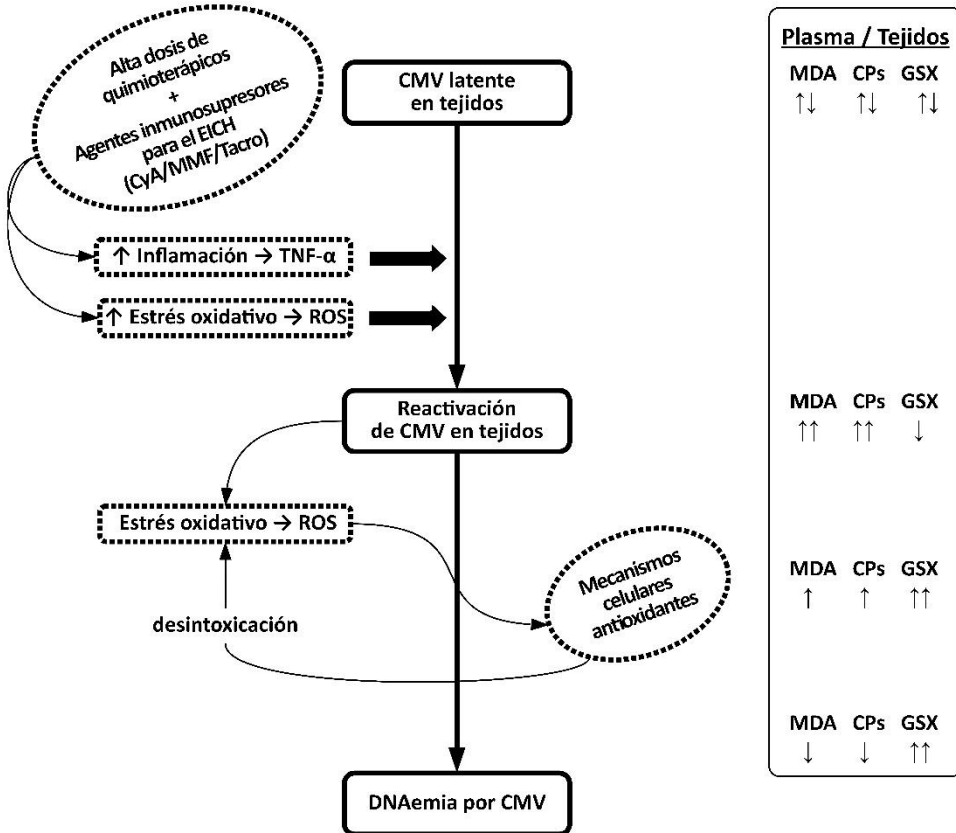


Figura 15. Diagrama de eventos secuenciales postulados para conducir a una disminución de los marcadores de estrés oxidativo en plasma antes de la detección de DNAemia por CMV en receptores de alo-TPH. La quimioterapia de dosis alta utilizada en el acondicionamiento y ciertos agentes inmunosupresores empleados para la profilaxis de la enfermedad aguda de injerto contra huésped generan un ambiente proinflamatorio y de estrés oxidativo que desencadena la reactivación del CMV en los tejidos a través de la acción de ciertos mediadores capaces de transactivar el CMV promotor inmediato-temprano 1, como TNF- α o ROS. La replicación del CMV causa estrés oxidativo celular, lo que lleva a la sobreproducción de moléculas antioxidantes como el tripéptido que contiene tiol GSH que elimina ROS. MDA y CP, marcadores de oxidación de lípidos o proteínas mediada por ROS, respectivamente, aumentan en los tejidos y el plasma poco después de alo-TPH y aumentan aún más en pacientes en los que el CMV se reactiva en tejidos y órganos. La hiperproducción local de antioxidantes como GSH se produce como un mecanismo compensatorio celular en un esfuerzo por desintoxicar ROS y evitar un mayor daño tisular. Como resultado, se puede evidenciar una disminución neta en los marcadores de estrés oxidativo, como MDA y CP, tanto localmente como más adelante en el compartimento vascular, antes del momento de la detección de ADNemia por CMV.



este contexto, las observaciones extraídas de los resultados expuestos aquí pueden parecer contradictorias. Sin embargo, esto puede explicarse si se supone que CMV se reactiva de forma principal en los tejidos y los órganos antes de acceder al torrente sanguíneo. Esto se ha demostrado con anterioridad en el modelo murino mCMV (Reddehase, Podlech, & Grzimek, 2002) y también se ha demostrado que ocurre en ciertos entornos clínicos, como en pacientes de la unidad de cuidados intensivos (Chilet et al., 2010). En el modelo propuesto en este documento de tesis (figura 15), la reactivación de CMV se desencadena en tejidos en un entorno local y sistémico de inflamación y estrés oxidativo, probablemente promovido por la quimioterapia de alta dosis utilizada en el acondicionamiento y los agentes inmunosupresores empleados para la prevención de EICH aguda (Sabuncuoglu et al., 2012; Sari et al., 2008; Soldin & Mattison, 2009). En este sentido, tanto TNF- α como los altos niveles de ROS activan NF- κ B, lo que a su vez desencadena la transactivación del promotor viral inmediato-temprano (Cook et al., 2006; Prosch et al., 2000; Speir, Shibutani, Yu, Ferrans, & Epstein, 1996), un paso crítico en la finalización del ciclo lítico de CMV. La replicación de CMV causa estrés celular, lo que lleva a la generación de ROS como subproductos de diferentes procesos celulares (Munger, Bajad, Coller, Shenk, & Rabinowitz, 2006). En respuesta a la lesión lítica inducida por CMV, las células producen en exceso ciertas enzimas antioxidantes y moléculas que eliminan ROS. De forma específica, el nivel de GSH es notablemente mayor en las células infectadas con CMV (Chambers, Maguire, & Alwine, 2010; Tilton, Clippinger, Maguire, & Alwine, 2011) que en aquellas que no lo están. Por lo tanto, se especuló que la hiperproducción de antioxidantes durante la replicación activa de CMV en

los tejidos puede dar lugar a una disminución neta de los marcadores de estrés oxidativo, como MDA y CP, tanto de forma local como más adelante, en el compartimento vascular, y que la magnitud de esta reducción puede correlacionarse directamente con la replicación de CMV. De hecho, los datos que se presentan aquí parecen apoyar esta idea. Se midió AUC y niveles máximos de MDA más bajos en episodios de infección activa por CMV con tasas de replicación de virus aparentemente más rápidas (td <2 días), lo que, en consecuencia, condujo a mayores niveles de DNA de CMV en plasma.

Las principales limitaciones de este estudio son su tamaño muestral, relativamente limitado, y su naturaleza retrospectiva. También se puede argumentar que los niveles de MDA y CP no proporcionan una imagen completa de los procesos de estrés oxidativo en curso. Sin embargo, ambos se han utilizado ampliamente para ese propósito (Breusing et al., 2010) y pueden medir de forma directa el impacto químico de las ROS en sistemas biológicos (Frijhoff et al., 2015).

En resumen, en este trabajo se muestra por primera vez que la medición de marcadores de estrés oxidativo en plasma puede ayudar a predecir la aparición de DNAemia por CMV en receptores de alo-TPH. Además de proporcionar más información sobre la patogénesis de la reactivación de CMV en pacientes con alo-TPH, estos hallazgos también son de interés clínico, pues la cuantificación en serie de estos biomarcadores, MDA en particular, puede ser útil para individualizar las terapias de profilaxis antiviral (profilaxis dirigida) en la próxima era de nuevos medicamentos antivirales con mejores perfiles de seguridad. No obstante, la validación de los datos aquí mostrados requiere más estudios prospectivos y que sean estadísticamente sólidos, tanto en receptores de

alo-TPH como en entornos no experimentales, como es el caso murino (mCMV).

2. Validación del modelo metabolómico en plasma que permite la anticipación de la infección por CMV en Alo-TPH.

En este estudio, se validó el perfil metabolómico plasmático previamente informado por el grupo de investigación del Dr. Navarro (Monleon et al., 2015) y que permite anticipar la aparición de DNAemia por CMV tras el alo-TPH.

En el citado trabajo (Monleon et al., 2015), se informó un modelo quimiométrico en muestras con y sin DNA de CMV detectable. Con el que aquí aparece, se valida ese modelo con una nueva cohorte independiente. El modelo reveló que varios metabolitos contribuyen de forma significativa a la discriminación entre paciente que desarrollarán DNAemia por CMV de aquellos que no lo harán. Los niveles plasmáticos de los metabolitos discriminativos pudieron reflejar inflamación sistémica (metilaminas), respuestas antiinflamatorias compensatorias en curso (taurina y glutatión total) o ambas. La mayoría de estos metabolitos siguen siendo discriminatorios en este estudio de validación, aunque sus valores medios y su significancia estadística varían según el riesgo del paciente.

Las metilaminas, especialmente TMAO, son metabolitos de la microbiota intestinal que están relacionados, de forma potencial, con la translocación bacteriana y con respuestas inflamatorias elevadas y estrés oxidativo (Tang et al., 2014). El estudio de validación revela que las

diferencias de TMAO son estadísticamente significativas solo en el grupo de pacientes de algo riesgo. Algo similar se observa para la taurina y el glutatión, que son antioxidantes celulares bien conocidos y potentes moléculas antiinflamatorias que se generan en respuesta a estados proinflamatorios (Tabas & Glass, 2013). El lactato, por el contrario, muestra asociaciones estadísticamente significativas con la posterior DNAemia de CMV en todos los análisis, excepto en el grupo de pacientes de alto riesgo. Se ha demostrado que el lactato en sangre aumenta después de la administración de LPS bacteriano (Michaeli et al., 2012).

Aunque el patrón metabólico se conserva prácticamente en todos los análisis, el grupo de alto riesgo muestra un aumento global en el contenido metabólico. Esto puede sugerir algún tipo de cambio en la osmolaridad de la sangre que puede afectar el perfil metabólico. Sin embargo, las puntuaciones y las cargas asociadas al PLS-DA codifican las principales fuentes de variabilidad en los datos y pueden representar patrones y relaciones ocultos en los datos (Trygg, Holmes, & Lundstedt, 2007). Por lo tanto, la presencia de algún tipo de efecto global en un grupo de muestra se incluiría de forma intrínseca en el modelo y no debería afectar al éxito de la predicción. Estos resultados sugieren que la respuesta al alo-TPH puede activar diferentes núcleos metabólicos y, por lo tanto, modular el riesgo de infección por CMV.

En general, se puede inferir de los datos, que las diferencias sutiles e incluso notables en las tendencias o la concentración de ciertos metabolitos que contribuyen al modelo de la cohorte inicial y de la de validación, tienen un impacto mínimo en su capacidad predictiva. Esto se debe a que la fuerza de este enfoque quimiométrico radica en el perfil metabólico en sí mismo, que se basa en una combinación de pequeñas

variaciones del metaboloma, en lugar de las concentraciones de metabolitos individuales (Monleon et al., 2015).

El presente estudio confirma la utilidad de los perfiles de metabolómica plasmática para predecir los primeros episodios de DNAemia por CMV en receptores de alo-TPH, como se anticipó en el citado estudio anterior (Monleon et al., 2015). De particular interés clínico es la capacidad predictiva del modelo cuando se usa una sola muestra de plasma extraída poco después del injerto (día 21), dado que la mayoría de los primeros episodios de DNAemia por CMV ocurren más tarde (Romero et al., 2015). Una nueva observación obtenida aquí es la consistencia de la capacidad discriminativa del modelo en subconjuntos de pacientes con diferente riesgo de complicaciones relacionadas con CMV, lo que minimiza el impacto potencial de la heterogeneidad de la cohorte en la validez de los resultados.

La capacidad predictiva de modelo fue casi del 70% en el mejor de los casos (muestra única obtenida poco después del injerto), lo que significa que la información proporcionada por este enfoque biológico solo sería auxiliar para la orientación de la profilaxis dirigida. Quizás se podría desarrollar una puntuación de riesgo para anticipar la DNAemia por CMV que integrase los datos obtenidos por la metabolómica del plasma con los datos obtenidos utilizando otros enfoques biológicos complementarios, como el monitoreo de células T para CMV y los análisis del genoma del huésped (Romero et al., 2015), así como la información derivada de las características basales del paciente, trabajo que se está llevando a cabo.

3. Investigación de marcadores de inflamación como predictores de la infección activa por CMV.

Se ha reconocido que una serie de factores clínicos basales y posteriores al trasplante, así como los rasgos genéticos del huésped y los biomarcadores inmunológicos, tienen un impacto en el riesgo de DNAemia por CMV en receptores de alo-TPH (Navarro, 2016; Romero et al., 2015). Aquí, se evaluó el valor predictivo de los niveles plasmáticos de PCR, sTNF-R2, TGF- β 1 e IP-10 para anticipar la aparición y las características de la DNAemia por CMV en receptores de alo-TPH, que se monitorizó por medio de PCR entiempos real de alta sensibilidad. La razón por la que se seleccionaron estos biomarcadores fue:

1. Se encontró que los niveles plasmáticos de IP-10 y PCR se asociaron, de forma independiente, con la presencia de DNAemia por CMV y con la enfermedad invasiva de tejidos por CMV en el contexto del trasplante de órgano sólido (Rollag et al., 2013).
2. El papel potencial de TGF- β 1 en la patogénesis de la lesión orgánica inducida por CMV (Shimamura, Murphy-Ullrich, & Britt, 2010).
3. La fiabilidad de sTNF-R2 como marcador sustituto de la inflamación mediada por TNF- α (Gohda et al., 2012).

Aquí se ha mostrado que la cinética de TGF- β 1 en plasma podría usarse como un parámetro auxiliar para anticipar la aparición de DNAemia por CMV. En efecto, se encontró que, tanto el AUC de TGF- β 1 como el nivel máximo, eran significativamente más bajos en pacientes que desarrollaron primeros episodios de DNAemia por CMV después del



trasplante (hasta el día 50 después del alo-TPH) en comparación con aquellos que no lo hicieron. De hecho, el AUC de TGF- β 1 y el nivel máximo por debajo de los umbrales óptimos, se asociaron de forma independiente con el desarrollo de la DNAemia por CMV. Hay que tener en cuenta que los pacientes con y sin DNAemia por CMV no difirieron significativamente en términos de características demográficas o de base y características posteriores al trasplante, incluyendo entre estas últimas el régimen inmunosupresor utilizado para la prevención del EICH agudo, la incidencia de EICH agudo y las infecciones bacterianas de cualquier origen, y que posiblemente puedan afectar a los niveles plasmáticos de biomarcadores inflamatorios. De hecho, los valores de \log_{10} de AUC para recuentos de leucocitos y linfocitos absolutos, medidos en los mismos puntos de tiempo que los seleccionados para las mediciones de biomarcadores en plasma, fueron comparables entre ambos grupos.

TGF- β 1 es una citoquina multifuncional que participa en el control del crecimiento y la diferenciación celular, induce fibrosis, suprime las respuestas de NK y de células T citotóxicas y puede contrarrestar la actividad biológica de ciertos mediadores de inflamación (Blobe, Schiemann, & Lodish, 2000; Letterio & Roberts, 1998; Wahl, 2007). Con respecto al último efecto, que puede explicar el hallazgo aquí expuesto, TGF- β 1 puede inhibir la secreción y la actividad de muchas citoquinas, incluido TNF- α , y obstaculizar la proliferación de macrófagos y monocitos, evitando así que produzcan oxígeno reactivo [por ejemplo, superóxido ($O_2^{\cdot-}$)] y nitrógeno [por ejemplo, óxido nítrico (NO) intermedio] (Blobe et al., 2000; Letterio & Roberts, 1998; Wahl, 2007). En este contexto, tanto TNF- α como los niveles reactivos de especies de oxígeno en plasma se han correlacionado directamente con el riesgo de DNAemia por CMV (Gimeno

et al., 2008; Humar et al., 1999; Talaya et al., 2017), tal y como ya se decía en los resultados y la discusión de la sección correspondiente del artículo I (Investigación de marcadores de estrés oxidativo como mecanismo predictivo de la infección por Citomegalovirus).

Resultó sorprendente comprobar que los niveles de sTNF-R2 no fueran predictores de la DNAemia por CMV, dado que se cree que las concentraciones circulantes de receptores de TNF- α (sTNFRs) reflejan una exposición a largo plazo a esta citoquina proinflamatoria (Gohda et al., 2012). Sin embargo, se ha demostrado que los ensayos que miden TNF- α son, a menudo, de confiabilidad cuestionable, lo que ocasiona resultados inconsistentes. Esto, probablemente, se deba a la presencia de formas biológicas de TNF- α en plasma que permanecen indetectables debido a la formación de complejos sTNFR, cuya constante de velocidad de disociación parece depender del ensayo o conformación monomérica (Corti, Poesi, Merli, & Cassani, 1994). En relación con esto, el fracaso para detectar TNF- α es frecuente en sujetos sanos, mientras que sTNF-R2 es, sistemáticamente, cuantificable (Aziz, Nishanian, Mitsuyasu, Detels, & Fahey, 1999).

PCR es una proteína de fase aguda producida por los hepatocitos, y se comporta como un marcador confiable de inflamación sistémica (Schultz & Arnold, 1990). Se sabe que los niveles de PCR en sangre aumentan en asociación con infecciones bacterianas y EICH agudo, y, en última instancia, se relaciona con mortalidad asociada con el alo-TPH (Schots et al., 2003; Schots et al., 1998; Schots et al., 2002). Sin embargo, hasta donde se sabe, no se ha informado de ningún vínculo previo entre los niveles de PCR en plasma y la infección activa por CMV en este entorno clínico. En este trabajo no se encuentra ninguna asociación entre el AUC

y los niveles máximos de PCR y la aparición de DNAemia por CMV. Sin embargo, ambos parámetros parecen ser de mayor magnitud en pacientes que desarrollan episodios de DNAemia por CMV y que requieren PET, usando un umbral relativamente conservador para el inicio antiviral (1.500 UI/mL), en relación con los pacientes que desarrollaron DNAemia por CMV pero que no precisaron de terapia antiviral. El bajo número de pacientes con DNAemia por CMV y que requirieron PET en la cohorte, impide sacar conclusiones más sólidas e invita a más especulaciones sobre el mecanismo fisiopatológico subyacente en este tema. En este sentido, el estado neto de inflamación al inicio de la DNAemia por CMV, según se infiere de los niveles plasmáticos de PCR, puede influir directamente en la tasa de crecimiento viral y, por tanto, en la eventual necesidad de PET.

Sin embargo, el presente estudio tiene varias limitaciones que merecen ser comentadas. Primero, el bajo número de pacientes incluidos impidió realizar análisis estadísticos sólidos. Segundo, la relativa heterogeneidad que poseyeron los pacientes en la cohorte. Tercero, se usaron muestras crioconservadas en lugar de muestras frescas, para los análisis. Sin embargo, es poco probable que esto último haya tenido un impacto en los resultados aquí presentados, dada la estabilidad de los biomarcadores medidos en las muestras congeladas (Schultz & Arnold, 1990). Cuarto, no se consideraron varios factores que pueden afectar al riesgo de DNAemia por CMV, como la respuesta temprana de células T específicas frente a CMV (Romero et al., 2015). Además, el uso de dos ensayos de PCR en tiempo real diferentes podría verse como una limitación. Sin embargo, ambos tienen un rendimiento comparable en

términos de sensibilidad y rango lineal de cuantificación (C Solano et al., 2013).

La medición prospectiva de biomarcadores de inflamación y activación inmune en sangre ha demostrado ser útil para predecir la aparición de enfermedad por CMV en pacientes con trasplante de órgano sólido, y para guiar la profilaxis antiviral y así evitar la enfermedad por CMV en trasplante de riñón e hígado en receptores de trasplante de alto riesgo (Limaye, La Rosa, Longmate, & Diamond, 2016; Rollag et al., 2012; Rollag et al., 2013; Weseslindtner et al., 2014). En línea con estudios anteriores (Gimeno et al., 2008; Humar et al., 1999), los datos aquí presentados sugieren que también puede encontrar su lugar en el manejo de la infección por CMV en el entorno alo-TPH. La estratificación precisa del riesgo de eventos clínicos relacionados con CMV en las primeras etapas del alo-TPH puede ser útil en un futuro cercano para la identificación de pacientes que requieran profilaxis antiviral con nuevos agentes (profilaxis dirigida) (Francisco M Marty et al., 2017). En este sentido, se encontró que los niveles máximos de TGF- β 1 se alcanzaron dentro de este marco de tiempo. Sin embargo, es poco probable que un solo parámetro, independientemente de su naturaleza, pueda hacerlo. Por el contrario, se prevé que puedan ser una gran cantidad de factores, incluyendo los inmunológicos (como los biomarcadores inflamatorios), los genéticos y los clínicos, los que puedan mejorar la capacidad de predecir eventos relacionados con CMV, e individualizar estrategias de prevención. Y este es un hecho en el que se está trabajando para poder abordar este problema.

4. Utilización de los miRNA de CMV presentes en plasma para la predicción de la infección activa por CMV.

La identificación precisa de los receptores de alo-TPH con mayor riesgo de desarrollar DNAemia por CMV puede mejorar el manejo de la infección por el virus en este escenario clínico. En particular, puede ayudar a racionalizar el uso de los nuevos antivirales profilácticos (profilaxis dirigida) (Chemaly et al., 2014; F. M. Marty et al., 2017; Romero et al., 2015). En estudios previos se demostró que los rasgos genéticos e inmunológicos del huésped, así como varios biomarcadores metabólicos relacionados con el estrés oxidativo y las citoquinas, pueden permitir la estratificación del riesgo con valores predictivos variables (Monleon et al., 2018; Romero et al., 2015; Talaya et al., 2019; Talaya et al., 2017). Aquí, se investiga si la detección cualitativa y/o la cuantificación de los miRNA de CMV circulantes, de forma libre, en plasma, podrían anticipar la aparición de DNAemia por CMV en el entorno del alo-TPH.

Entre la amplia gama de miRNA de CMV caracterizados hasta ahora (Diggins & Hancock, 2018; Hook et al., 2014; Lisboa et al., 2015; Ng, Li, & Gleadle, 2015), se seleccionaron aquellos que se sabe que se expresan de forma abundante en células infectadas productivamente poco o muy poco después de la infección (W. Dunn et al., 2003; W. Dunn et al., 2005; Grey et al., 2005; Murphy, Vanicek, Robins, Shenk, & Levine, 2008; Stark, Arnold, Spector, & Yeo, 2012; Stern-Ginossar et al., 2007; Stern-Ginossar et al., 2009), incluyendo UI36-5p, US33-5p, UL148D, U22A-5p, UL112-3p, US25-1-5p y US4-5p. Entre estos, ya se demostró que la detección al inicio del estudio del miRNA de CMV UL22A-5p predice, de forma independiente, la recurrencia de la viremia por el virus en receptores de

órgano sólido con enfermedad por CMV sintomática previa tras la supresión de la terapia antiviral (Lisboa et al., 2015). Dado que los ensayos con los miRNA de CMV US25-1-5p y US4-5p no pudieron estandarizarse en este estudio, solo se presentan y discuten aquí los datos sobre las especies de miRNA restante.

En el presente estudio, todos los miRNA de CMV se detectaron poco después del trasplante, independientemente del estado serológico de CMV entre el donante y el receptor, aunque con frecuencia variable. Los miRNA de CMV US33-5p y UL112-3p fueron las especies más comúnmente detectadas en cualquier momento, sobre todo en el día 15 tras el a-TPH (más de dos tercios de los pacientes). Sin embargo, ni la tasa de detección de los miRNA ni su carga en plasma permitieron discriminar entre pacientes con DNAemia posterior y aquellos que nunca la tuvieron. Como la mayoría de los pacientes de la serie que formaron parte del presente estudio eran seropositivos para CMV en el momento del trasplante, se respalda la suposición de que la reactivación de CMV en los tejidos o en la mucosa ocurre con frecuencia, independientemente de si se produce o no viremia.

Curiosamente, la detección de los miRNA de CMV US33-5p y UL112-3p predijo tiempos de duplicación de virus más altos durante los episodios de DNAemia de CMV, como se infiere por la magnitud de la carga de DNA de CMV en el momento de la primera prueba de PCR positiva (Cromer, Tey, Khanna, & Davenport, 2013). El número limitado de episodios de resolución espontánea en esta serie (n = 9), así como el uso de diferentes umbrales de DNA de CMV para el inicio de la terapia antiviral en los centros participantes (no se muestran), impidieron un análisis significativo sobre si la detección o cuantificación de miRNA de

CMV podría predecir otras características de los episodios de DNAemia por CMV (niveles máximos de DNA de CMV dentro del episodio o su duración, entre otros).

Además de su tamaño relativamente pequeño, el estudio actual tiene ciertas limitaciones que, hasta el momento, descartan la detección/cuantificación de miRNA de CMV en plasma como herramienta útil para anticipar la DNAemia por CMV:

1. El estudio se enfocó en detectar los miRNA de CMV circulante en plasma y, por tanto, no se hizo ningún intento de detectar los que potencialmente se transportan dentro de vesículas extracelulares (Huang et al., 2013; Valadi et al., 2007).
2. Se utilizaron muestras sobrantes congeladas para los análisis, pero, aunque no se pudo descartar la degradación de miRNA en algunas muestras, es poco probable que la criopreservación haya tenido algún impacto en los resultados.
3. Una serie de especies de miRNA de CMV, cuya detección puede ser probada útil en el futuro, no fue seleccionada para el estudio actual.
4. El tiempo transcurrido entre el último análisis de miRNA de CMV y el diagnóstico de la DNAemia por CMV podría haber sido demasiado largo en varios pacientes (solo las muestras obtenidas los días +7, +15 y +30 después del alo-TPH se examinaron para detectar la presencia de miRNA de CMV).
5. No se determinó la sensibilidad (límite de detección) de los diferentes ensayos, por lo que las especies de miRNA presentes en cantidades muy bajas podrían haberse perdido. Sin embargo, el sistema miRNA miScript disponible de forma

comercial ha sido optimizado para la detección y cuantificación de trazas de miRNA maduro en fluidos biológicos.

Hasta donde se sabe, ningún estudio previo ha investigado el valor clínico potencial de la detección/cuantificación de miRNA de CMV para predecir la aparición de DNAemia por CMV en cualquier entorno clínico. Los datos presentados aquí son inconsistentes con la hipótesis de que la especie de miRNA de CMV objetivo podría ayudar a predecir los primeros episodios de DNAemia de CMV en una cohorte consistente, principalmente, en pacientes con alo-TPH que reciben aloinjertos haploidénticos. Por tanto, se deben realizar más estudios para determinar si esto se puede extrapolar a episodios recurrentes de DNAemia por CMV y a todas las modalidades de alo-TPH.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Tras los diferentes experimentos realizados para el presente documento de tesis, se puede concluir que:

1. Los marcadores de estrés oxidativo son útiles para predecir la infección activa por CMV tras el trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos. En concreto, CPs y, más específicamente, MDA muestran valores de AUC y valores máximos más bajos en pacientes con infección activa.
2. El perfil metabolómico en plasma de pacientes sometidos a trasplante alógeno de precursores hematopoyéticos funciona como predictor de la infección activa por CMV.
3. Los marcadores de inflamación, también llamados citoquinas, pueden utilizarse para predecir la infección activa por CMV en el trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos. Concretamente, el AUC y el valor máximo de la citoquina TGF- β 1 muestra niveles más bajos en pacientes que posteriormente desarrollan la infección activa por CMV. Sin embargo, es la citoquina PCR la que discrimina entre pacientes que requieren PET de los que no, también mediante los niveles de AUC y valores máximos.
4. El perfil de miRNA de CMV presente en plasma de pacientes sometidos a trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos no muestra utilidad para predecir la infección activa de CMV tras el TPH.

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

Andersen, J. K. (2004). Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med*, *10 Suppl*, S18-25. doi:10.1038/nrn1434

Appay, V., Dunbar, P. R., Callan, M., Klenerman, P., Gillespie, G. M., Papagno, L., Rowland-Jones, S. L. (2002). Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med*, *8*(4), 379-385. doi:10.1038/nm0402-379

Ayala, A., Munoz, M. F., & Arguelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*, *2014*, 360438. doi:10.1155/2014/360438

Aziz, N., Nishanian, P., Mitsuyasu, R., Detels, R., & Fahey, J. L. (1999). Variables that affect assays for plasma cytokines and soluble activation markers. *Clin Diagn Lab Immunol*, *6*(1), 89-95.

Baldanti, F., Lurain, N., & Gerna, G. (2004). Clinical and biologic aspects of human cytomegalovirus resistance to antiviral drugs. *Hum Immunol*, *65*(5), 403-409. doi:10.1016/j.humimm.2004.02.007

Balkwill, F. (2009). Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer*, *9*(5), 361-371. doi:10.1038/nrc2628

Baxter, M. K., & Gibson, W. (2001). Cytomegalovirus basic phosphoprotein (pUL32) binds to capsids in vitro through its amino one-third. *J*



Viol, 75(15), 6865-6873. doi:10.1128/JVI.75.15.6865-6873.2001

Bellomo, C., Caja, L., & Moustakas, A. (2016). Transforming growth factor beta as regulator of cancer stemness and metastasis. *Br J Cancer*, 115(7), 761-769. doi:10.1038/bjc.2016.255

Biswas, S. K. (2016). Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 5698931. doi:10.1155/2016/5698931

Black, S., Kushner, I., & Samols, D. (2004). C-reactive Protein. *J Biol Chem*, 279(47), 48487-48490. doi:10.1074/jbc.R400025200

Blobe, G. C., Schiemann, W. P., & Lodish, H. F. (2000). Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med*, 342(18), 1350-1358. doi:10.1056/NEJM200005043421807

Bodi, V., Sanchis, J., Morales, J. M., Marrachelli, V. G., Nunez, J., Forteza, M. J., Monleon, D. (2012). Metabolomic profile of human myocardial ischemia by nuclear magnetic resonance spectroscopy of peripheral blood serum: a translational study based on transient coronary occlusion models. *J Am Coll Cardiol*, 59(18), 1629-1641. doi:10.1016/j.jacc.2011.09.083

Boeckh, M., Leisenring, W., Riddell, S. R., Bowden, R. A., Huang, M.-L., Myerson, D., Corey, L. (2003). Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 101(2), 407-414.

- Boeckh, M., Murphy, W. J., & Peggs, K. S. (2015). Reprint of: Recent advances in cytomegalovirus: an update on pharmacologic and cellular therapies. *Biol Blood Marrow Transplant*, *21*(2 Suppl), S19-24. doi:10.1016/j.bbmt.2014.12.034
- 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. doi:10.1016/s1083-8791(03)00287-8
- Boehme, K. W., & Compton, T. (2004). Innate sensing of viruses by toll-like receptors. *J Virol*, *78*(15), 7867-7873. doi:10.1128/JVI.78.15.7867-7873.2004
- Booy, F. P., Newcomb, W. W., Trus, B. L., Brown, J. C., Baker, T. S., & Steven, A. C. (1991). Liquid-crystalline, phage-like packing of encapsidated DNA in herpes simplex virus. *Cell*, *64*(5), 1007-1015. doi:10.1016/0092-8674(91)90324-r
- Boppana, S. B., & Britt, W. J. (1995). Antiviral antibody responses and intrauterine transmission after primary maternal cytomegalovirus infection. *J Infect Dis*, *171*(5), 1115-1121. doi:10.1093/infdis/171.5.1115
- Boyle, K. A., & Compton, T. (1998). Receptor-binding properties of a soluble form of human cytomegalovirus glycoprotein B. *J Virol*, *72*(3), 1826-1833.
- Bravender, T. (2010). Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and infectious



mononucleosis. *Adolesc Med State Art Rev*, 21(2), 251-264, ix.

Bresnahan, W. A., & Shenk, T. E. (2000). UL82 virion protein activates expression of immediate early viral genes in human cytomegalovirus-infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(26), 14506-14511. doi:10.1073/pnas.97.26.14506

Breusing, N., Grune, T., Andrisic, L., Atalay, M., Bartosz, G., Biasi, F., Spickett, C. M. (2010). An inter-laboratory validation of methods of lipid peroxidation measurement in UVA-treated human plasma samples. *Free Radic Res*, 44(10), 1203-1215. doi:10.3109/10715762.2010.499907

Britt, W. J., Vugler, L., Butfiloski, E. J., & Stephens, E. B. (1990). Cell surface expression of human cytomegalovirus (HCMV) gp55-116 (gB): use of HCMV-recombinant vaccinia virus-infected cells in analysis of the human neutralizing antibody response. *J Virol*, 64(3), 1079-1085. doi:10.1128/JVI.64.3.1079-1085.1990

Browne, E. P., Wing, B., Coleman, D., & Shenk, T. (2001). Altered cellular mRNA levels in human cytomegalovirus-infected fibroblasts: viral block to the accumulation of antiviral mRNAs. *J Virol*, 75(24), 12319-12330. doi:10.1128/JVI.75.24.12319-12330.2001

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

Brune, W. (2011). Inhibition of programmed cell death by



- cytomegaloviruses. *Virus Res*, 157(2), 144-150. doi:10.1016/j.virusres.2010.10.012
- Bukowski, J. F., Warner, J. F., Dennert, G., & Welsh, R. M. (1985). Adoptive transfer studies demonstrating the antiviral effect of natural killer cells in vivo. *J Exp Med*, 161(1), 40-52. doi:10.1084/jem.161.1.40
- Cavanaugh, V. J., Deng, Y., Birkenbach, M. P., Slater, J. S., & Campbell, A. E. (2003). Vigorous innate and virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses to murine cytomegalovirus in the submaxillary salivary gland. *J Virol*, 77(3), 1703-1717. doi:10.1128/jvi.77.3.1703-1717.2003
- Cha, T. A., Tom, E., Kemble, G. W., Duke, G. M., Mocarski, E. S., & Spaete, R. R. (1996). Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J Virol*, 70(1), 78-83.
- Chambers, J. W., Maguire, T. G., & Alwine, J. C. (2010). Glutamine metabolism is essential for human cytomegalovirus infection. *J Virol*, 84(4), 1867-1873. doi:10.1128/JVI.02123-09
- Chang, C. P., Vesole, D. H., Nelson, J., Oldstone, M. B., & Stinski, M. F. (1989). Identification and expression of a human cytomegalovirus early glycoprotein. *J Virol*, 63(8), 3330-3337.
- Chee, M. S., Bankier, A. T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C. M., Cerny, R., et al. (1990). Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol*, 154, 125-169. doi:10.1007/978-3-642-74980-3_6



- Chemaly, R. F., Ullmann, A. J., Stoelben, S., Richard, M. P., Bornhauser, M., Groth, C., Team, A. I. C. S. (2014). Letermovir for cytomegalovirus prophylaxis in hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med*, *370*(19), 1781-1789. doi:10.1056/NEJMoa1309533
- Chen, D. H., Jiang, H., Lee, M., Liu, F., & Zhou, Z. H. (1999). Three-dimensional visualization of tegument/capsid interactions in the intact human cytomegalovirus. *Virology*, *260*(1), 10-16. doi:10.1006/viro.1999.9791
- Cheung, T. W., & Teich, S. A. (1999). Cytomegalovirus infection in patients with HIV infection. *Mt Sinai J Med*, *66*(2), 113-124.
- Chilet, M., Aguilar, G., Benet, I., Belda, J., Tormo, N., Carbonell, J. A., Navarro, D. (2010). Virological and immunological features of active cytomegalovirus infection in nonimmunosuppressed patients in a surgical and trauma intensive care unit. *J Med Virol*, *82*(8), 1384-1391. doi:10.1002/jmv.21825
- Clari, M. A., Gimenez, E., Aguilar, G., Corrales, I., Alberola, J., & Navarro, D. (2013). Need to evaluate the performance of real-time PCR assays for the quantitation of cytomegalovirus DNA load in lower respiratory tract specimens. *Crit Care*, *17*(6), 465. doi:10.1186/cc13119
- Compton, T., & Feire, A. (2007). Early events in human cytomegalovirus infection. In *Human herpesviruses: biology, therapy, and immunoprophylaxis*: Cambridge University Press.
- Compton, T., Nowlin, D. M., & Cooper, N. R. (1993). Initiation of human

cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology*, 193(2), 834-841. doi:10.1006/viro.1993.1192

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

Corti, A., Poiesi, C., Merli, S., & Cassani, G. (1994). Tumor necrosis factor (TNF) alpha quantification by ELISA and bioassay: effects of TNF alpha-soluble TNF receptor (p55) complex dissociation during assay incubations. *J Immunol Methods*, 177(1-2), 191-198. doi:10.1016/0022-1759(94)90156-2

Cromer, D., Tey, S. K., Khanna, R., & Davenport, M. P. (2013). Estimating cytomegalovirus growth rates by using only a single point. *J Virol*, 87(6), 3376-3381. doi:10.1128/JVI.02821-12

Crough, T., Burrows, J. M., Fazou, C., Walker, S., Davenport, M. P., & Khanna, R. (2005). Contemporaneous fluctuations in T cell responses to persistent herpes virus infections. *Eur J Immunol*, 35(1), 139-149. doi:10.1002/eji.200425548

Crough, T., & Khanna, R. (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev*, 22(1), 76-98, Table of Contents. doi:10.1128/CMR.00034-08

Dalle-Donne, I., Aldini, G., Carini, M., Colombo, R., Rossi, R., & Milzani, A.



- (2006). Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med*, 10(2), 389-406. doi:10.1111/j.1582-4934.2006.tb00407.x
- Davison, A. J., & Bhella, D. (2007). Comparative genome and virion structure. In A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P. S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, & K. Yamanishi (Eds.), *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press
- Davison, A. J., Dolan, A., Akter, P., Addison, C., Dargan, D. J., Alcendor, D. J., Hayward, G. S. (2003). The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J Gen Virol*, 84(Pt 1), 17-28. doi:10.1099/vir.0.18606-0
- Day, E. K., Carmichael, A. J., ten Berge, I. J., Waller, E. C., Sissons, J. G., & Wills, M. R. (2007). Rapid CD8+ T cell repertoire focusing and selection of high-affinity clones into memory following primary infection with a persistent human virus: human cytomegalovirus. *J Immunol*, 179(5), 3203-3213. doi:10.4049/jimmunol.179.5.3203
- de Candia, P., Torri, A., Pagani, M., & Abrignani, S. (2014). Serum microRNAs as Biomarkers of Human Lymphocyte Activation in Health and Disease. *Front Immunol*, 5, 43. doi:10.3389/fimmu.2014.00043
- Diggins, N. L., & Hancock, M. H. (2018). HCMV miRNA Targets Reveal Important Cellular Pathways for Viral Replication, Latency, and Reactivation. *Noncoding RNA*, 4(4). doi:10.3390/ncrna4040029

- Dioverti, M. V., & Razonable, R. R. (2016). Cytomegalovirus. *Microbiol Spectr*, 4(4). doi:10.1128/microbiolspec.DMIH2-0022-2015
- Dohner, K., Nagel, C. H., & Sodeik, B. (2005). Viral stop-and-go along microtubules: taking a ride with dynein and kinesins. *Trends Microbiol*, 13(7), 320-327. doi:10.1016/j.tim.2005.05.010
- Dolan, A., Cunningham, C., Hector, R. D., Hassan-Walker, A. F., Lee, L., Addison, C., . . . Davison, A. J. (2004). Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J Gen Virol*, 85(Pt 5), 1301-1312. doi:10.1099/vir.0.79888-0
- Dolken, L., Pfeffer, S., & Koszinowski, U. H. (2009). Cytomegalovirus microRNAs. *Virus Genes*, 38(3), 355-364. doi:10.1007/s11262-009-0347-0
- Dumas, M. E., Maibaum, E. C., Teague, C., Ueshima, H., Zhou, B., Lindon, J. C., . . . Holmes, E. (2006). Assessment of analytical reproducibility of ¹H NMR spectroscopy based metabonomics for large-scale epidemiological research: the INTERMAP Study. *Anal Chem*, 78(7), 2199-2208. doi:10.1021/ac0517085
- Dunn, H. S., Haney, D. J., Ghanekar, S. A., Stepick-Biek, P., Lewis, D. B., & Maecker, H. T. (2002). Dynamics of CD4 and CD8 T cell responses to cytomegalovirus in healthy human donors. *J Infect Dis*, 186(1), 15-22. doi:10.1086/341079
- Dunn, W., Chou, C., Li, H., Hai, R., Patterson, D., Stolc, V., Liu, F. (2003). Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(24), 14223-14228.



doi:10.1073/pnas.2334032100

Dunn, W., Trang, P., Zhong, Q., Yang, E., van Belle, C., & Liu, F. (2005). Human cytomegalovirus expresses novel microRNAs during productive viral infection. *Cell Microbiol*, 7(11), 1684-1695. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00598.x

E, X., Pickering, M. T., Debatis, M., Castillo, J., Lagadinos, A., Wang, S., Kowalik, T. F. (2011). An E2F1-mediated DNA damage response contributes to the replication of human cytomegalovirus. *PLoS Pathog*, 7(5), e1001342. doi:10.1371/journal.ppat.1001342

Eid, A. J., Brown, R. A., Arthurs, S. K., Lahr, B. D., Eckel-Passow, J. E., Larson, T. S., & Razonable, R. R. (2010). A prospective longitudinal analysis of cytomegalovirus (CMV)-specific CD4+ and CD8+ T cells in kidney allograft recipients at risk of CMV infection. *Transpl Int*, 23(5), 506-513. doi:10.1111/j.1432-2277.2009.01017.x

Eid, A. J., & Razonable, R. R. (2010). New developments in the management of cytomegalovirus infection after solid organ transplantation. *Drugs*, 70(8), 965-981. doi:10.2165/10898540-000000000-00000

Einsele, H., Roosnek, E., Rufer, N., Sinzger, C., Riegler, S., Loffler, J., . . . Hebart, H. (2002). Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood*, 99(11), 3916-3922. doi:10.1182/blood.v99.11.3916

Emery, V. C., Cope, A. V., Bowen, E. F., Gor, D., & Griffiths, P. D. (1999). The

dynamics of human cytomegalovirus replication in vivo. *J Exp Med*, 190(2), 177-182.

Escobar, M. R., Allison, M. J., & Dalton, H. P. (1970). Etiology and laboratory diagnosis of infectious mononucleosis: II. Cytomegalovirus (CMV) mononucleosis. *Va Med Mon (1918)*, 97(3), 191-192.

Esterbauer, H., Schaur, R. J., & Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*, 11(1), 81-128. doi:10.1016/0891-5849(91)90192-6

Fowler, K. B., Stagno, S., Pass, R. F., Britt, W. J., Boll, T. J., & Alford, C. A. (1992). The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N Engl J Med*, 326(10), 663-667. doi:10.1056/NEJM199203053261003

Frijhoff, J., Winyard, P. G., Zarkovic, N., Davies, S. S., Stocker, R., Cheng, D., . . . Ghezzi, P. (2015). Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal*, 23(14), 1144-1170. doi:10.1089/ars.2015.6317

Fu, M., Gao, Y., Zhou, Q., Zhang, Q., Peng, Y., Tian, K., Zheng, X. (2014). Human cytomegalovirus latent infection alters the expression of cellular and viral microRNA. *Gene*, 536(2), 272-278. doi:10.1016/j.gene.2013.12.012

Furue, H. (1995). [Toxicity criteria]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 22(5), 616-626.

Garcia, S. C., Grotto, D., Bulcao, R. P., Moro, A. M., Roehrs, M., Valentini,



- J., Charao, M. F. (2013). Evaluation of lipid damage related to pathological and physiological conditions. *Drug Chem Toxicol*, 36(3), 306-312. doi:10.3109/01480545.2012.720989
- Gardner, T. J., & Tortorella, D. (2016). Virion Glycoprotein-Mediated Immune Evasion by Human Cytomegalovirus: a Sticky Virus Makes a Slick Getaway. *Microbiol Mol Biol Rev*, 80(3), 663-677. doi:10.1128/MMBR.00018-16
- Gibson, W. (1983). Protein counterparts of human and simian cytomegaloviruses. *Virology*, 128(2), 391-406. doi:10.1016/0042-6822(83)90265-9
- Gibson, W. (1996). Structure and assembly of the virion. *Intervirology*, 39(5-6), 389-400. doi:10.1159/000150509
- Gilbert, C., & Boivin, G. (2005). Human cytomegalovirus resistance to antiviral drugs. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(3), 873-883. doi:10.1128/AAC.49.3.873-883.2005
- Gimenez, E., Munoz-Cobo, B., Solano, C., Amat, P., & Navarro, D. (2014). Early kinetics of plasma cytomegalovirus DNA load in allogeneic stem cell transplant recipients in the era of highly sensitive real-time PCR assays: does it have any clinical value? *J Clin Microbiol*, 52(2), 654-656. doi:10.1128/JCM.02571-13
- Gimeno, C., Solano, C., Latorre, J. C., Hernandez-Boluda, J. C., Clari, M. A., Remigia, M. J., Navarro, D. (2008). Quantification of DNA in plasma by an automated real-time PCR assay (cytomegalovirus PCR kit) for surveillance of active cytomegalovirus infection and guidance of

preemptive therapy for allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *J Clin Microbiol*, 46(10), 3311-3318. doi:10.1128/JCM.00797-08

Gohda, T., Niewczas, M. A., Ficociello, L. H., Walker, W. H., Skupien, J., Rosetti, F., Krolewski, A. S. (2012). Circulating TNF receptors 1 and 2 predict stage 3 CKD in type 1 diabetes. *J Am Soc Nephrol*, 23(3), 516-524. doi:10.1681/ASN.2011060628

Gonczol, E., Ianacone, J., Ho, W. Z., Starr, S., Meignier, B., & Plotkin, S. (1990). Isolated gA/gB glycoprotein complex of human cytomegalovirus envelope induces humoral and cellular immune-responses in human volunteers. *Vaccine*, 8(2), 130-136. doi:10.1016/0264-410x(90)90135-9

Goodacre, R. (2005). Metabolomics – the way forward. *Metabolomics*, 1(1), 1-2. doi:10.1007/s11306-005-1111-7

Greber, U. F., & Way, M. (2006). A superhighway to virus infection. *Cell*, 124(4), 741-754. doi:10.1016/j.cell.2006.02.018

Gretch, D. R., Kari, B., Rasmussen, L., Gehrz, R. C., & Stinski, M. F. (1988). Identification and characterization of three distinct families of glycoprotein complexes in the envelopes of human cytomegalovirus. *J Virol*, 62(3), 875-881.

Grey, F., Antoniewicz, A., Allen, E., Saugstad, J., McShea, A., Carrington, J. C., & Nelson, J. (2005). Identification and characterization of human cytomegalovirus-encoded microRNAs. *J Virol*, 79(18), 12095-12099. doi:10.1128/JVI.79.18.12095-12099.2005



- Grey, F., Meyers, H., White, E. A., Spector, D. H., & Nelson, J. (2007). A human cytomegalovirus-encoded microRNA regulates expression of multiple viral genes involved in replication. *PLoS Pathog*, 3(11), e163. doi:10.1371/journal.ppat.0030163
- Grey, F., & Nelson, J. (2008). Identification and function of human cytomegalovirus microRNAs. *J Clin Virol*, 41(3), 186-191. doi:10.1016/j.jcv.2007.11.024
- Gromski, P. S., Muhamadali, H., Ellis, D. I., Xu, Y., Correa, E., Turner, M. L., & Goodacre, R. (2015). A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis--a marriage of convenience or a shotgun wedding. *Anal Chim Acta*, 879, 10-23. doi:10.1016/j.aca.2015.02.012
- Hamprecht, K., Maschmann, J., Vochem, M., Dietz, K., Speer, C. P., & Jahn, G. (2001). Epidemiology of transmission of cytomegalovirus from mother to preterm infant by breastfeeding. *The Lancet*, 357(9255), 513-518.
- Hamzeh, F. M., Lietman, P. S., Gibson, W., & Hayward, G. S. (1990). Identification of the lytic origin of DNA replication in human cytomegalovirus by a novel approach utilizing ganciclovir-induced chain termination. *J Virol*, 64(12), 6184-6195.
- Ho, M. (2008). The history of cytomegalovirus and its diseases. *Med Microbiol Immunol*, 197(2), 65-73. doi:10.1007/s00430-007-0066-x
- Hook, L., Hancock, M., Landais, I., Grabski, R., Britt, W., & Nelson, J. A.

- (2014). Cytomegalovirus microRNAs. *Curr Opin Virol*, 7, 40-46. doi:10.1016/j.coviro.2014.03.015
- Huang, X., Yuan, T., Tschannen, M., Sun, Z., Jacob, H., Du, M., Wang, L. (2013). Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics*, 14, 319. doi:10.1186/1471-2164-14-319
- Humar, A., St Louis, P., Mazzulli, T., McGeer, A., Lipton, J., Messner, H., & MacDonald, K. S. (1999). Elevated serum cytokines are associated with cytomegalovirus infection and disease in bone marrow transplant recipients. *J Infect Dis*, 179(2), 484-488. doi:10.1086/314602
- Irmiere, A., & Gibson, W. (1985). Isolation of human cytomegalovirus intranuclear capsids, characterization of their protein constituents, and demonstration that the B-capsid assembly protein is also abundant in noninfectious enveloped particles. *J Virol*, 56(1), 277-283.
- Isaacs, A., & Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 147(927), 258-267. doi:10.1098/rspb.1957.0048
- Isaacson, M. K., & Compton, T. (2009). Human cytomegalovirus glycoprotein B is required for virus entry and cell-to-cell spread but not for virion attachment, assembly, or egress. *J Virol*, 83(8), 3891-3903. doi:10.1128/JVI.01251-08
- Ishov, A. M., Stenberg, R. M., & Maul, G. G. (1997). Human



cytomegalovirus immediate early interaction with host nuclear structures: definition of an immediate transcript environment. *J Cell Biol*, 138(1), 5-16. doi:10.1083/jcb.138.1.5

Jesionek, A., & Kiolemenoglou, B. (1904). Ueber einen Befund von protozoenartigen Gebilden in den Organen eines Fetan. *Munch. Med. Wschr*, 51, 1095-1097.

Kawano, Y., Kawada, J., Kamiya, Y., Suzuki, M., Torii, Y., Kimura, H., & Ito, Y. (2016). Analysis of circulating human and viral microRNAs in patients with congenital cytomegalovirus infection. *J Perinatol*, 36(12), 1101-1105. doi:10.1038/jp.2016.157

Khan, N., Hislop, A., Gudgeon, N., Cobbold, M., Khanna, R., Nayak, L., Moss, P. A. (2004). Herpesvirus-specific CD8 T cell immunity in old age: cytomegalovirus impairs the response to a coresident EBV infection. *J Immunol*, 173(12), 7481-7489. doi:10.4049/jimmunol.173.12.7481

Kim, E. Y., & Moudgil, K. D. (2017). Immunomodulation of autoimmune arthritis by pro-inflammatory cytokines. *Cytokine*, 98, 87-96. doi:10.1016/j.cyto.2017.04.012

Klemola, E., von Essen, R., Henle, G., & Henle, W. (1970). Infectious-mononucleosis-like disease with negative heterophil agglutination test. Clinical features in relation to Epstein-Barr virus and cytomegalovirus antibodies. *Journal of Infectious Diseases*, 121(6), 608-614.

Kudchodkar, S. B., Yu, Y., Maguire, T. G., & Alwine, J. C. (2006). Human

cytomegalovirus infection alters the substrate specificities and rapamycin sensitivities of raptor- and rictor-containing complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(38), 14182-14187. doi:10.1073/pnas.0605825103

Kumar, M. L., Nankervis, G. A., Cooper, A. R., & Gold, E. (1984). Postnatally acquired cytomegalovirus infections in infants of CMV-excreting mothers. *J Pediatr*, 104(5), 669-673. doi:10.1016/s0022-3476(84)80941-5

Lang, K. S., Moris, A., Gouttefangeas, C., Walter, S., Teichgraber, V., Miller, M., Stevanovic, S. (2002). High frequency of human cytomegalovirus (HCMV)-specific CD8+ T cells detected in a healthy CMV-seropositive donor. *Cell Mol Life Sci*, 59(6), 1076-1080.

Letterio, J. J., & Roberts, A. B. (1998). Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol*, 16, 137-161. doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.137

Li, S., Zhu, J., Zhang, W., Chen, Y., Zhang, K., Popescu, L. M., Cai, J. (2011). Signature microRNA expression profile of essential hypertension and its novel link to human cytomegalovirus infection. *Circulation*, 124(2), 175-184. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.012237

Limaye, A. P., La Rosa, C., Longmate, J., & Diamond, D. J. (2016). Plasma IL-10 levels to guide antiviral prophylaxis prevention of late-onset cytomegalovirus disease, in high risk solid kidney and liver transplant recipients. *Transplantation*, 100(1), 210.

Limaye, A. P., Raghu, G., Koelle, D. M., Ferrenberg, J., Huang, M. L., &



- Boeckh, M. (2002). High incidence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection among lung transplant recipients receiving preemptive therapy. *J Infect Dis*, 185(1), 20-27. doi:10.1086/338143
- Lin, T. S., Zahrieh, D., Weller, E., Alyea, E. P., Antin, J. H., & Soiffer, R. J. (2002). Risk factors for cytomegalovirus reactivation after CD6+ T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation*, 74(1), 49-54. doi:10.1097/00007890-200207150-00009
- Lipschütz, B. (1921). Untersuchungen über die Ätiologie der Krankheiten der Herpesgruppe (Herpes zoster, Herpes genitalis, Herpes febrilis). *Archives of Dermatological Research*, 136(3), 428-482.
- Lisboa, L. F., Egli, A., O'Shea, D., Asberg, A., Hartmann, A., Rollag, H., Humar, A. (2015). Hcmv-miR-UL22A-5p: A Biomarker in Transplantation With Broad Impact on Host Gene Expression and Potential Immunological Implications. *Am J Transplant*, 15(7), 1893-1902. doi:10.1111/ajt.13222
- Liu, M., Tang, L., Liu, X., Fang, J., Zhan, H., Wu, H., & Yang, H. (2016). An Evidence-Based Review of Related Metabolites and Metabolic Network Research on Cerebral Ischemia. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 9162074. doi:10.1155/2016/9162074
- Ljungman, P., de la Camara, R., Cordonnier, C., Einsele, H., Engelhard, D., Reusser, P., European Conference on Infections in, L. (2008). Management of CMV, HHV-6, HHV-7 and Kaposi-sarcoma

herpesvirus (HHV-8) infections in patients with hematological malignancies and after SCT. *Bone Marrow Transplant*, 42(4), 227-240. doi:10.1038/bmt.2008.162

Ljungman, P., Hakki, M., & Boeckh, M. (2010). Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Infect Dis Clin North Am*, 24(2), 319-337. doi:10.1016/j.idc.2010.01.008

Ljungman, P., Perez-Bercoff, L., Jonsson, J., Avetisyan, G., Sparrelid, E., Aschan, J., Ringden, O. (2006). Risk factors for the development of cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*, 91(1), 78-83.

Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*, 4(8), 118-126. doi:10.4103/0973-7847.70902

Locci, E., Noto, A., Lanari, M., Lazzarotto, T., Fanos, V., & Atzori, L. (2013). Metabolomics: a new tool for the investigation of metabolic changes induced by cytomegalovirus. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 26 Suppl 2, 17-19. doi:10.3109/14767058.2013.829684

Luczaj, W., & Skrzydlewska, E. (2003). DNA damage caused by lipid peroxidation products. *Cell Mol Biol Lett*, 8(2), 391-413.

Manicklal, S., Emery, V. C., Lazzarotto, T., Boppana, S. B., & Gupta, R. K. (2013). The "silent" global burden of congenital cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev*, 26(1), 86-102. doi:10.1128/CMR.00062-12

Marchant, A., Appay, V., Van Der Sande, M., Dulphy, N., Liesnard, C., Kidd,



- M., Whittle, H. (2003). Mature CD8(+) T lymphocyte response to viral infection during fetal life. *J Clin Invest*, 111(11), 1747-1755. doi:10.1172/JCI17470
- Marty, F. M., Bryar, J., Browne, S. K., Schwarzberg, T., Ho, V. T., Bassett, I. V., Baden, L. R. (2007). Sirolimus-based graft-versus-host disease prophylaxis protects against cytomegalovirus reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a cohort analysis. *Blood*, 110(2), 490-500. doi:10.1182/blood-2007-01-069294
- Marty, F. M., Ljungman, P., Chemaly, R. F., Maertens, J., Dadwal, S. S., Duarte, R. F., Brown, J. (2017). Letermovir prophylaxis for cytomegalovirus in hematopoietic-cell transplantation. *New England Journal of Medicine*, 377(25), 2433-2444.
- Marty, F. M., Ljungman, P., Chemaly, R. F., Maertens, J., Dadwal, S. S., Duarte, R. F., Badshah, C. (2017). Letermovir Prophylaxis for Cytomegalovirus in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med*, 377(25), 2433-2444. doi:10.1056/NEJMoa1706640
- Melnick, J. L., Petrie, B. L., Dreesman, G. R., Burek, J., McCollum, C. H., & DeBakey, M. E. (1983). Cytomegalovirus antigen within human arterial smooth muscle cells. *Lancet*, 2(8351), 644-647. doi:10.1016/s0140-6736(83)92529-1
- Meshesha, M. K., Veksler-Lublinsky, I., Isakov, O., Reichenstein, I., Shomron, N., Kedem, K., Avni, Y. S. (2012). The microRNA Transcriptome of Human Cytomegalovirus (HCMV). *Open Virol J*, 6,



38-48. doi:10.2174/1874357901206010038

Michaeli, B., Martinez, A., Revely, J. P., Cayeux, M. C., Chiolero, R. L., Tappy, L., & Berger, M. M. (2012). Effects of endotoxin on lactate metabolism in humans. *Crit Care*, 16(4), R139. doi:10.1186/cc11444

Michaelis, M., Doerr, H. W., & Cinatl, J. (2009). The story of human cytomegalovirus and cancer: increasing evidence and open questions. *Neoplasia*, 11(1), 1-9. doi:10.1593/neo.81178

Mickiewicz, B., Duggan, G. E., Winston, B. W., Doig, C., Kubes, P., Vogel, H. J., & Alberta Sepsis, N. (2014). Metabolic profiling of serum samples by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy as a potential diagnostic approach for septic shock. *Crit Care Med*, 42(5), 1140-1149. doi:10.1097/CCM.0000000000000142

Mikhed, Y., Daiber, A., & Steven, S. (2015). Mitochondrial Oxidative Stress, Mitochondrial DNA Damage and Their Role in Age-Related Vascular Dysfunction. *Int J Mol Sci*, 16(7), 15918-15953. doi:10.3390/ijms160715918

Minder, W. H. (1953). [Etiology of cytomegaly in infants]. *Schweizerische medizinische Wochenschrift*, 83(49), 1180-1182.

Mise, J., Dembitz, V., Banfic, H., & Visnjic, D. (2011). Combined inhibition of PI3K and mTOR exerts synergistic antiproliferative effect, but diminishes differentiative properties of rapamycin in acute myeloid leukemia cells. *Pathol Oncol Res*, 17(3), 645-656. doi:10.1007/s12253-011-9365-z



- Mocarski, E. S., Jr. (2002). Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion. *Trends Microbiol*, 10(7), 332-339. doi:10.1016/s0966-842x(02)02393-4
- Mocarski, E., Shenk, T., & Pass, R. (2007). Fields Virology, eds DM Knipe and PM Howley. In: Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Mocarski Jr, E. (2007). Betaherpes viral genes and their functions. In A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P. S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, & K. Yamanishi (Eds.), *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge.
- Mohammad, A. A., Rahbar, A., Lui, W. O., Davoudi, B., Catrina, A., Stragliotto, G., Soderberg-Naucler, C. (2014). Detection of circulating hcmv-miR-UL112-3p in patients with glioblastoma, rheumatoid arthritis, diabetes mellitus and healthy controls. *PLoS One*, 9(12), e113740. doi:10.1371/journal.pone.0113740
- Monleon, D., Gimenez, E., Munoz-Cobo, B., Morales, J. M., Solano, C., Amat, P., & Navarro, D. (2015). Plasma metabolomics profiling for the prediction of cytomegalovirus DNAemia and analysis of virus-host interaction in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Gen Virol*, 96(11), 3373-3381. doi:10.1099/jgv.0.000275
- Monleon, D., Talaya, A., Gimenez, E., Vinuesa, V., Morales, J. M., Hernandez-Boluda, J. C., Navarro, D. (2018). Validation of a plasma metabolomics model that allows anticipation of the occurrence of cytomegalovirus DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Med Microbiol*, 67(6), 814-819.

doi:10.1099/jmm.0.000746

Moore, K., & Roberts, L. J., 2nd. (1998). Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic Res*, 28(6), 659-671. doi:10.3109/10715769809065821

Mori, Y., Akkapaiboon, P., Yang, X., & Yamanishi, K. (2003). The human herpesvirus 6 U100 gene product is the third component of the gH-gL glycoprotein complex on the viral envelope. *J Virol*, 77(4), 2452-2458. doi:10.1128/jvi.77.4.2452-2458.2003

Munger, J., Bajad, S. U., Collier, H. A., Shenk, T., & Rabinowitz, J. D. (2006). Dynamics of the cellular metabolome during human cytomegalovirus infection. *PLoS Pathog*, 2(12), e132. doi:10.1371/journal.ppat.0020132

Munoz-Cobo, B., Solano, C., Costa, E., Bravo, D., Clari, M. A., Benet, I., Navarro, D. (2011). Dynamics of cytomegalovirus (CMV) plasma DNAemia in initial and recurrent episodes of active CMV infection in the allogeneic stem cell transplantation setting: implications for designing preemptive antiviral therapy strategies. *Biol Blood Marrow Transplant*, 17(11), 1602-1611. doi:10.1016/j.bbmt.2011.08.014

Murphy, E., Vanicek, J., Robins, H., Shenk, T., & Levine, A. J. (2008). Suppression of immediate-early viral gene expression by herpesvirus-coded microRNAs: implications for latency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(14), 5453-5458. doi:10.1073/pnas.0711910105

Murphy, E., Yu, D., Grimwood, J., Schmutz, J., Dickson, M., Jarvis, M. A.,



- Shenk, T. E. (2003). Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(25), 14976-14981. doi:10.1073/pnas.2136652100
- Mussi-Pinhata, M. M., Yamamoto, A. Y., Moura Brito, R. M., de Lima Isaac, M., de Carvalho e Oliveira, P. F., Boppana, S., & Britt, W. J. (2009). Birth prevalence and natural history of congenital cytomegalovirus infection in a highly seroimmune population. *Clin Infect Dis*, *49*(4), 522-528. doi:10.1086/600882
- Mutter, W., Reddehase, M. J., Busch, F. W., Buhring, H. J., & Koszinowski, U. H. (1988). Failure in generating hemopoietic stem cells is the primary cause of death from cytomegalovirus disease in the immunocompromised host. *J Exp Med*, *167*(5), 1645-1658. doi:10.1084/jem.167.5.1645
- Myerson, D., Hackman, R. C., Nelson, J. A., Ward, D. C., & McDougall, J. K. (1984). Widespread presence of histologically occult cytomegalovirus. *Hum Pathol*, *15*(5), 430-439. doi:10.1016/s0046-8177(84)80076-3
- Nakamae, H., Kirby, K. A., Sandmaier, B. M., Norasetthada, L., Maloney, D. G., Maris, M. B., Boeckh, M. (2009). Effect of conditioning regimen intensity on CMV infection in allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, *15*(6), 694-703. doi:10.1016/j.bbmt.2009.02.009
- Nassetta, L., Kimberlin, D., & Whitley, R. (2009). Treatment of congenital cytomegalovirus infection: implications for future therapeutic

strategies. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 63(5), 862-867.

Nathan, C., & Cunningham-Bussel, A. (2013). Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat Rev Immunol*, 13(5), 349-361. doi:10.1038/nri3423

Navarro, D. (2016). Expanding role of cytomegalovirus as a human pathogen. *J Med Virol*, 88(7), 1103-1112. doi:10.1002/jmv.24450

Ng, K. R., Li, J. Y., & Gleadle, J. M. (2015). Human cytomegalovirus encoded microRNAs: hitting targets. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 13(12), 1469-1479. doi:10.1586/14787210.2015.1106939

Nichols, W. G., Corey, L., Gooley, T., Davis, C., & Boeckh, M. (2002). High risk of death due to bacterial and fungal infection among cytomegalovirus (CMV)-seronegative recipients of stem cell transplants from seropositive donors: evidence for indirect effects of primary CMV infection. *J Infect Dis*, 185(3), 273-282. doi:10.1086/338624

Nieto, F. J., Adam, E., Sorlie, P., Farzadegan, H., Melnick, J. L., Comstock, G. W., & Szklo, M. (1996). Cohort study of cytomegalovirus infection as a risk factor for carotid intimal-medial thickening, a measure of subclinical atherosclerosis. *Circulation*, 94(5), 922-927. doi:10.1161/01.cir.94.5.922

Nigro, G., Adler, S. P., La Torre, R., Best, A. M., & Congenital Cytomegalovirus Collaborating, G. (2005). Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N Engl J Med*, 353(13), 1350-1362. doi:10.1056/NEJMoa043337



- Ninomiya, T., Takimoto, H., Matsuzaki, G., Hamano, S., Yoshida, H., Yoshikai, Y., Nomoto, K. (2000). Vgamma1+ gammadelta T cells play protective roles at an early phase of murine cytomegalovirus infection through production of interferon-gamma. *Immunology*, 99(2), 187-194. doi:10.1046/j.1365-2567.2000.00938.x
- Noble, J. E., & Bailey, M. J. (2009). Quantitation of protein. *Methods Enzymol*, 463, 73-95. doi:10.1016/S0076-6879(09)63008-1
- Nogalski, M. T., Collins-McMillen, D., & Yurochko, A. D. (2014). Overview of human cytomegalovirus pathogenesis. In *Human Cytomegaloviruses* (pp. 15-28): Springer.
- Orloff, S. L., Hwee, Y. K., Kreklywich, C., Andoh, T. F., Hart, E., Smith, P. A., . . . Streblow, D. N. (2011). Cytomegalovirus latency promotes cardiac lymphoid neogenesis and accelerated allograft rejection in CMV naive recipients. *Am J Transplant*, 11(1), 45-55. doi:10.1111/j.1600-6143.2010.03365.x
- Pawelec, G., Larbi, A., & Derhovanessian, E. (2010). Senescence of the human immune system. *J Comp Pathol*, 142 Suppl 1, S39-44. doi:10.1016/j.jcpa.2009.09.005
- Pfeffer, S., Sewer, A., Lagos-Quintana, M., Sheridan, R., Sander, C., Grasser, F. A., Tuschl, T. (2005). Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods*, 2(4), 269-276. doi:10.1038/nmeth746
- Pignatelli, S., Dal Monte, P., Rossini, G., & Landini, M. P. (2004). Genetic polymorphisms among human cytomegalovirus (HCMV) wild-type



strains. *Rev Med Virol*, 14(6), 383-410. doi:10.1002/rmv.438

Prichard, M. N., Jairath, S., Penfold, M. E., St Jeor, S., Bohlman, M. C., & Pari, G. S. (1998). Identification of persistent RNA-DNA hybrid structures within the origin of replication of human cytomegalovirus. *J Virol*, 72(9), 6997-7004.

Prosch, S., Wendt, C. E., Reinke, P., Priemer, C., Oppert, M., Kruger, D. H., Docke, W. D. (2000). A novel link between stress and human cytomegalovirus (HCMV) infection: sympathetic hyperactivity stimulates HCMV activation. *Virology*, 272(2), 357-365. doi:10.1006/viro.2000.0367

Rasmussen, L., Matkin, C., Spaete, R., Pacht, C., & Merigan, T. C. (1991). Antibody response to human cytomegalovirus glycoproteins gB and gH after natural infection in humans. *J Infect Dis*, 164(5), 835-842. doi:10.1093/infdis/164.5.835

Reddehase, M. J., Podlech, J., & Grzimek, N. K. (2002). Mouse models of cytomegalovirus latency: overview. *J Clin Virol*, 25 Suppl 2, S23-36. doi:10.1016/s1386-6532(02)00087-2

Ribbert, H. (1904). Über protozoenartige Zellen in der Niere eines syphilitischen Neugeborenen und in der Parotis von Kindern. *Zbl Allg Pathol.*, 15, 945-948.

Roby, C., & Gibson, W. (1986). Characterization of phosphoproteins and protein kinase activity of virions, noninfectious enveloped particles, and dense bodies of human cytomegalovirus. *J Virol*, 59(3), 714-727.



- Rollag, H., Asberg, A., Ueland, T., Hartmann, A., Jardine, A. G., Humar, A., Aukrust, P. (2012). Treatment of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients: markers of inflammation as predictors of outcome. *Transplantation*, *94*(10), 1060-1065. doi:10.1097/TP.0b013e31826c39de
- Rollag, H., Ueland, T., Asberg, A., Hartmann, A., Jardine, A. G., Humar, A., Aukrust, P. (2013). Characterization of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients by markers of inflammation in plasma. *PLoS One*, *8*(4), e60767. doi:10.1371/journal.pone.0060767
- Romagnani, P., & Crescioli, C. (2012). CXCL10: a candidate biomarker in transplantation. *Clin Chim Acta*, *413*(17-18), 1364-1373. doi:10.1016/j.cca.2012.02.009
- Romero, P. 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 Virology*, *10*(2), 113-134.
- Ryckman, B. J., Chase, M. C., & Johnson, D. C. (2008). HCMV gH/gL/UL128-131 interferes with virus entry into epithelial cells: evidence for cell type-specific receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(37), 14118-14123. doi:10.1073/pnas.0804365105
- Ryckman, B. J., Rainish, B. L., Chase, M. C., Borton, J. A., Nelson, J. A., Jarvis, M. A., & Johnson, D. C. (2008). Characterization of the human cytomegalovirus gH/gL/UL128-131 complex that mediates entry



- into epithelial and endothelial cells. *J Virol*, 82(1), 60-70.
doi:10.1128/JVI.01910-07
- Sabuncuoglu, S., Kuskonmaz, B., Uckun Cetinkaya, D., & Ozgunes, H. (2012). Evaluation of oxidative and antioxidative parameters in pediatric hematopoietic SCT patients. *Bone Marrow Transplant*, 47(5), 651-656. doi:10.1038/bmt.2011.145
- Santos, C. A. (2016). Cytomegalovirus and Other beta-Herpesviruses. *Semin Nephrol*, 36(5), 351-361.
doi:10.1016/j.semnephrol.2016.05.012
- Sari, I., Cetin, A., Kaynar, L., Saraymen, R., Hacıoglu, S. K., Ozturk, A., . . . Eser, B. (2008). Disturbance of pro-oxidative/antioxidative balance in allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Ann Clin Lab Sci*, 38(2), 120-125.
- Schmidt-Hieber, M., Labopin, M., Beelen, D., Volin, L., Ehninger, G., Finke, J., Mohty, M. (2013). CMV serostatus still has an important prognostic impact in de novo acute leukemia patients after allogeneic stem cell transplantation: a report from the Acute Leukemia Working Party of EBMT. *Blood*, 122(19), 3359-3364.
doi:10.1182/blood-2013-05-499830
- Schots, R., Kaufman, L., Van Riet, I., Ben Othman, T., De Waele, M., Van Camp, B., & Demanet, C. (2003). Proinflammatory cytokines and their role in the development of major transplant-related complications in the early phase after allogeneic bone marrow transplantation. *Leukemia*, 17(6), 1150-1156.



doi:10.1038/sj.leu.2402946

Schots, R., Kaufman, L., Van Riet, I., Lacor, P., Trullemans, F., De Waele, M., & Van Camp, B. (1998). Monitoring of C-reactive protein after allogeneic bone marrow transplantation identifies patients at risk of severe transplant-related complications and mortality. *Bone Marrow Transplant*, *22*(1), 79-85. doi:10.1038/sj.bmt.1701286

Schots, R., Van Riet, I., Othman, T. B., Trullemans, F., De Waele, M., Van Camp, B., & Kaufman, L. (2002). An early increase in serum levels of C-reactive protein is an independent risk factor for the occurrence of major complications and 100-day transplant-related mortality after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, *30*(7), 441-446. doi:10.1038/sj.bmt.1703672

Schultz, D. R., & Arnold, P. I. (1990). Properties of four acute phase proteins: C-reactive protein, serum amyloid A protein, alpha 1-acid glycoprotein, and fibrinogen. *Semin Arthritis Rheum*, *20*(3), 129-147. doi:10.1016/0049-0172(90)90055-k

Shacter, E., Williams, J. A., Lim, M., & Levine, R. L. (1994). Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay. *Free Radic Biol Med*, *17*(5), 429-437.

Sester, M., Sester, U., Gartner, B., Heine, G., Girndt, M., Mueller-Lantsch, N., 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.

doi:10.1097/00007890-200105150-00018.

Sester, U., Gartner, B. C., Wilkens, H., Schwaab, B., Wossner, R., Kindermann, I., Sester, M. (2005). Differences in CMV-specific T-cell levels and long-term susceptibility to CMV infection after kidney, heart and lung transplantation. *Am J Transplant*, 5(6), 1483-1489. doi:10.1111/j.1600-6143.2005.00871.x

Shen, Y., Zhu, H., & Shenk, T. (1997). Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins are mutagenic and mediate "hit-and-run" oncogenic transformation in cooperation with the adenovirus E1A proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(7), 3341-3345. doi:10.1073/pnas.94.7.3341

Shenk, T., & Stinski, M. F. (2008). *Human cytomegalovirus*: Springer.

Shimamura, M., Murphy-Ullrich, J. E., & Britt, W. J. (2010). Human cytomegalovirus induces TGF-beta1 activation in renal tubular epithelial cells after epithelial-to-mesenchymal transition. *PLoS Pathog*, 6(11), e1001170. doi:10.1371/journal.ppat.1001170

Simmen, K. A., Singh, J., Luukkonen, B. G., Lopper, M., Bittner, A., Miller, N. E., Fruh, K. (2001). Global modulation of cellular transcription by human cytomegalovirus is initiated by viral glycoprotein B. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(13), 7140-7145. doi:10.1073/pnas.121177598

Sinzger, C., Kahl, M., Laib, K., Klingel, K., Rieger, P., Plachter, B., & Jahn, G. (2000). Tropism of human cytomegalovirus for endothelial cells is determined by a post-entry step dependent on efficient



translocation to the nucleus. *J Gen Virol*, 81(Pt 12), 3021-3035.
doi:10.1099/0022-1317-81-12-3021

Skaletskaya, A., Bartle, L. M., Chittenden, T., McCormick, A. L., Mocarski, E. S., & Goldmacher, V. S. (2001). A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(14), 7829-7834.
doi:10.1073/pnas.141108798

Slade, M., Goldsmith, S., Romee, R., DiPersio, J. F., Dubberke, E. R., Westervelt, P., Lawrence, S. J. (2017). Epidemiology of infections following haploidentical peripheral blood hematopoietic cell transplantation. *Transpl Infect Dis*, 19(1). doi:10.1111/tid.12629

Soderberg-Naucler, C., & Johnsen, J. I. (2012). Cytomegalovirus infection in brain tumors: A potential new target for therapy? *Oncoimmunology*, 1(5), 739-740. doi:10.4161/onci.19441

Solano, C., Benet, I., Clari, M. A., Nieto, J., de la Camara, R., Lopez, J., Navarro, D. (2008). Enumeration of cytomegalovirus-specific interferongamma 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., de la Camara, R., Vazquez, L., Lopez, J., Gimenez, E., & Navarro, D. (2015). Cytomegalovirus Infection Management in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients: a National Survey in Spain. *J Clin Microbiol*, 53(8), 2741-2744. doi:10.1128/JCM.01057-15

- Solano, C., Gimenez, E., Pinana, J. L., Vinuesa, V., Poujois, S., Zaragoza, S., Navarro, D. (2016). Preemptive antiviral therapy for CMV infection in allogeneic stem cell transplant recipients guided by the viral doubling time in the blood. *Bone Marrow Transplant*, 51(5), 718-721. doi:10.1038/bmt.2015.303
- Solano, C., Muñoz-Cobo, B., Giménez, E., Remigia, M., Amat, P., Clari, M., Navarro, D. (2013). Pre-emptive antiviral therapy for active CMV infection in adult allo-SCT patients guided by plasma CMV DNAemia quantitation using a real-time PCR assay: clinical experience at a single center. *Bone Marrow Transplant*, 48(7), 1010.
- Solano, C., & Navarro, D. (2010). Clinical virology of cytomegalovirus infection following hematopoietic transplantation. *Future Virology*, 5(1), 111-124.
- Soldin, O. P., & Mattison, D. R. (2009). Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacokinet*, 48(3), 143-157. doi:10.2165/00003088-200948030-00001
- Spaderna, S., Blessing, H., Bogner, E., Britt, W., & Mach, M. (2002). Identification of glycoprotein gpTRL10 as a structural component of human cytomegalovirus. *J Virol*, 76(3), 1450-1460. doi:10.1128/jvi.76.3.1450-1460.2002
- Speir, E., Shibutani, T., Yu, Z. X., Ferrans, V., & Epstein, S. E. (1996). Role of reactive oxygen intermediates in cytomegalovirus gene expression and in the response of human smooth muscle cells to viral



infection. *Circ Res*, 79(6), 1143-1152. doi:10.1161/01.res.79.6.1143

Stark, T. J., Arnold, J. D., Spector, D. H., & Yeo, G. W. (2012). High-resolution profiling and analysis of viral and host small RNAs during human cytomegalovirus infection. *J Virol*, 86(1), 226-235. doi:10.1128/JVI.05903-11

Stern-Ginossar, N., Elefant, N., Zimmermann, A., Wolf, D. G., Saleh, N., Biton, M., . . . Mandelboim, O. (2007). Host immune system gene targeting by a viral miRNA. *Science*, 317(5836), 376-381. doi:10.1126/science.1140956

Stern-Ginossar, N., Saleh, N., Goldberg, M. D., Prichard, M., Wolf, D. G., & Mandelboim, O. (2009). Analysis of human cytomegalovirus-encoded microRNA activity during infection. *J Virol*, 83(20), 10684-10693. doi:10.1128/JVI.01292-09

Stinski, M. F. (2014). History of the molecular biology of cytomegaloviruses. In *Human Cytomegaloviruses* (pp. 1-14): Springer.

Streblow, D. N., Orloff, S. L., & Nelson, J. A. (2001). Do pathogens accelerate atherosclerosis? *J Nutr*, 131(10), 2798S-2804S. doi:10.1093/jn/131.10.2798S

Tabas, I., & Glass, C. K. (2013). Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science*, 339(6116), 166-172. doi:10.1126/science.1230720

Takenaka, K., Nishida, T., Asano-Mori, Y., Oshima, K., Ohashi, K., Mori, T.,

- Fukuda, T. (2015). Cytomegalovirus Reactivation after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation is Associated with a Reduced Risk of Relapse in Patients with Acute Myeloid Leukemia Who Survived to Day 100 after Transplantation: The Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation Transplantation-related Complication Working Group. *Biol Blood Marrow Transplant*, 21(11), 2008-2016. doi:10.1016/j.bbmt.2015.07.019
- Talaya, A., Gimenez, E., Vinuesa, V., Perez, A., Amat, P., Pinana, J. L., Navarro, D. (2019). Kinetics of inflammatory biomarkers in plasma predict the occurrence and features of cytomegalovirus DNAemia episodes in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Med Microbiol Immunol*, 208(3-4), 405-414. doi:10.1007/s00430-019-00594-w
- Talaya, A., Solano, C., Gimenez, E., Garcia Gimenez, J. L., Vinuesa, V., Alberola, J., Navarro, D. (2017). Assessing the risk of cytomegalovirus DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients by monitoring oxidative-stress markers in plasma. *J Gen Virol*, 98(7), 1855-1863. doi:10.1099/jgv.0.000838
- Tang, Q., Zuo, T., Lu, S., Wu, J., Wang, J., Zheng, R., Xue, C. (2014). Dietary squid ink polysaccharides ameliorated the intestinal microflora dysfunction in mice undergoing chemotherapy. *Food Funct*, 5(10), 2529-2535. doi:10.1039/c4fo00408f
- Teira, P., Battiwalla, M., Ramanathan, M., Barrett, A. J., Ahn, K. W., Chen, M., Auletta, J. J. (2016). Early cytomegalovirus reactivation remains associated with increased transplant-related mortality in the



current era: a CIBMTR analysis. *Blood*, 127(20), 2427-2438.
doi:10.1182/blood-2015-11-679639

Teng, Q. (2012). *Structural biology: practical NMR applications*: Springer Science & Business Media.

Tilton, C., Clippinger, A. J., Maguire, T., & Alwine, J. C. (2011). Human cytomegalovirus induces multiple means to combat reactive oxygen species. *J Virol*, 85(23), 12585-12593.
doi:10.1128/JVI.05572-11

Tognarelli, J. M., Dawood, M., Shariff, M. I., Grover, V. P., Crossey, M. M., Cox, I. J., McPhail, M. J. (2015). Magnetic Resonance Spectroscopy: Principles and Techniques: Lessons for Clinicians. *J Clin Exp Hepatol*, 5(4), 320-328. doi:10.1016/j.jceh.2015.10.006

Tomazin, R., Boname, J., Hegde, N. R., Lewinsohn, D. M., Altschuler, Y., Jones, T. R., Johnson, D. C. (1999). Cytomegalovirus US2 destroys two components of the MHC class II pathway, preventing recognition by CD4+ T cells. *Nat Med*, 5(9), 1039-1043.
doi:10.1038/12478

Tormo, N., Solano, C., Benet, I., Nieto, J., de la Camara, R., Lopez, J., Navarro, D. (2011). Reconstitution of CMV pp65 and IE-1-specific IFN-gamma 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

Trus, B. L., Gibson, W., Cheng, N., & Steven, A. C. (1999). Capsid structure



of simian cytomegalovirus from cryoelectron microscopy: evidence for tegument attachment sites. *J Virol*, 73(3), 2181-2192.

Trus, B. L., Heymann, J. B., Nealon, K., Cheng, N., Newcomb, W. W., Brown, J. C., Steven, A. C. (2001). Capsid structure of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, a gammaherpesvirus, compared to those of an alphaherpesvirus, herpes simplex virus type 1, and a betaherpesvirus, cytomegalovirus. *J Virol*, 75(6), 2879-2890. doi:10.1128/JVI.75.6.2879-2890.2001

Trygg, J., Holmes, E., & Lundstedt, T. (2007). Chemometrics in metabonomics. *J Proteome Res*, 6(2), 469-479. doi:10.1021/pr060594q

Trzonkowski, P., Mysliwska, J., Szmit, E., Wieckiewicz, J., Lukaszuk, K., Brydak, L. B., Mysliwski, A. (2003). Association between cytomegalovirus infection, enhanced proinflammatory response and low level of anti-hemagglutinins during the anti-influenza vaccination--an impact of immunosenescence. *Vaccine*, 21(25-26), 3826-3836.

Tu, W., Chen, S., Sharp, M., Dekker, C., Manganello, A. M., Tongson, E. C., Lewis, D. B. (2004). Persistent and selective deficiency of CD4+ T cell immunity to cytomegalovirus in immunocompetent young children. *J Immunol*, 172(5), 3260-3267. doi:10.4049/jimmunol.172.5.3260

Tuthill, M., Chen, F., Paston, S., De La Pena, H., Rusakiewicz, S., & Madrigal, A. (2009). The prevention and treatment of cytomegalovirus



infection in haematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Immunol Immunother*, 58(9), 1481-1488. doi:10.1007/s00262-009-0722-7

Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J. J., & Lotvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 9(6), 654-659. doi:10.1038/ncb1596

Vancikova, Z., & Dvorak, P. (2001). Cytomegalovirus infection in immunocompetent and immunocompromised individuals--a review. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 1(2), 179-187.

Vauloup-Fellous, C., Berth, M., Heskia, F., Dugua, J. M., & Grangeot-Keros, L. (2013). Re-evaluation of the VIDAS((R)) cytomegalovirus (CMV) IgG avidity assay: determination of new cut-off values based on the study of kinetics of CMV-IgG maturation. *J Clin Virol*, 56(2), 118-123. doi:10.1016/j.jcv.2012.10.017

VonGlahn, W. C., & Pappenheimer, A. M. (1925). Intranuclear inclusions in visceral disease. *The American journal of pathology*, 1(5), 445.

Venema, H., van den Berg, A. P., van Zanten, C., van Son, W. J., van der Giessen, M., & The, T. H. (1994). Natural killer cell responses in renal transplant patients with cytomegalovirus infection. *J Med Virol*, 42(2), 188-192. doi:10.1002/jmv.1890420216

Wahl, S. M. (2007). Transforming growth factor-beta: innately bipolar. *Curr Opin Immunol*, 19(1), 55-62. doi:10.1016/j.coi.2006.11.008

- Walker, C. M., van Burik, J. A., De For, T. E., & Weisdorf, D. J. (2007). Cytomegalovirus infection after allogeneic transplantation: comparison of cord blood with peripheral blood and marrow graft sources. *Biol Blood Marrow Transplant*, 13(9), 1106-1115. doi:10.1016/j.bbmt.2007.06.006
- Wallace, P. R., Janet, W. H., Samuel, W., Horace, C. T., & Robert, J. H. (1956). Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 92(2), 418-424.
- Wang, J., & Yi, J. (2008). Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. *Cancer Biol Ther*, 7(12), 1875-1884.
- Watkins, R. R., Lemonovich, T. L., & Razonable, R. R. (2012). Immune response to CMV in solid organ transplant recipients: current concepts and future directions. *Expert Rev Clin Immunol*, 8(4), 383-393. doi:10.1586/eci.12.25
- Wehr, N. B., & Levine, R. L. (2012). Quantitation of protein carbonylation by dot blot. *Anal Biochem*, 423(2), 241-245. doi:10.1016/j.ab.2012.01.031
- Weller, T. H., Macauley, J., Craig, J., & Wirth, P. (1957). Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 94(1), 4-12.
- Weseslindtner, L., Görzer, I., Küng, E., Roedl, K., Jaksch, P., Klepetko, W., & Puchhammer-Stöckl, E. (2014). High CXCL-16 Levels Correlate With



Symptomatic Disease in Lung Transplant Recipients With Human Cytomegalovirus Replication in the Allograft. *American Journal of Transplantation*, 14(10), 2406-2411.

Woodhall, D. L., Groves, I. J., Reeves, M. B., Wilkinson, G., & Sinclair, J. H. (2006). Human Daxx-mediated repression of human cytomegalovirus gene expression correlates with a repressive chromatin structure around the major immediate early promoter. *J Biol Chem*, 281(49), 37652-37660. doi:10.1074/jbc.M604273200

Yan, L. J., & Forster, M. J. (2011). Chemical probes for analysis of carbonylated proteins: a review. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 879(17-18), 1308-1315. doi:10.1016/j.jchromb.2010.08.004

Zaia, J. A. (2002). Prevention of cytomegalovirus disease in hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis*, 35(8), 999-1004. doi:10.1086/342883

Zhou, M., Lanchy, J. M., & Ryckman, B. J. (2015). Human Cytomegalovirus gH/gL/gO Promotes the Fusion Step of Entry into All Cell Types, whereas gH/gL/UL128-131 Broadens Virus Tropism through a Distinct Mechanism. *J Virol*, 89(17), 8999-9009. doi:10.1128/JVI.01325-15

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

Zhou, Z. H., Chen, D. H., Jakana, J., Rixon, F. J., & Chiu, W. (1999). Visualization of tegument-capsid interactions and DNA in intact herpes simplex virus type 1 virions. *J Virol*, *73*(4), 3210-3218.

Zhu, H., Cong, J. P., Mamtora, G., Gingeras, T., & Shenk, T. (1998). Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: global monitoring with oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(24), 14470-14475. doi:10.1073/pnas.95.24.14470

Zhu, H., Cong, J. P., & Shenk, T. (1997). Use of differential display analysis to assess the effect of human cytomegalovirus infection on the accumulation of cellular RNAs: induction of interferon-responsive RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*(25), 13985-13990. doi:10.1073/pnas.94.25.13985

Zhu, J., Quyyumi, A. A., Norman, J. E., Csako, G., & Epstein, S. E. (1999). Cytomegalovirus in the pathogenesis of atherosclerosis: the role of inflammation as reflected by elevated C-reactive protein levels. *J Am Coll Cardiol*, *34*(6), 1738-1743. doi:10.1016/s0735-1097(99)00410-6

ANEXOS



ANEXOS

Informe del Director de la Tesis Doctoral sobre la coautoría de las publicaciones compendiadas en la Tesis Doctoral.

En cumplimiento del artículo 8.1 del Reglamento sobre depósito, evaluación y defensa de la tesis doctoral de la Universidad de Valencia, vigente a partir del 11 de febrero de 2012, realizo el presente escrito con el objetivo de justificar la situación del doctorando como segundo firmante en el artículo II de la presente tesis doctoral.

El doctorando, Alberto Talaya Peñalver, 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 artículo II nacen de la colaboración con el Servicio de Metabolómica de la fundación INCLIVA, por lo que se le ha otorgado el lugar de primer firmante al DR. Daniel Monleón por ser especialista en la técnica de la Resonancia Magnética Nuclear.

Además, los resultados obtenidos en coautoría no han sido utilizados, ni implícita ni explícitamente, para la realización de otra tesis doctoral.

Fdo. David Navarro Ortega.



Valencia, a 14 de septiembre de 2020.



Escrito del Director de la Tesis Doctoral sobre el Factor de Impacto de la publicaciones que se recogen en la Tesis Doctoral.

El Factor de Impacto de las revistas en las que se han publicado los trabajos compendiados en esta tesis doctoral, se presentan en la siguiente tabla por orden cronológico

Artículo	Revista	Año de publicación	Factor de impacto
I	<i>Journal of General Virology</i>	2017	2.809
II	<i>Journal of Medical Microbiology</i>	2018	1.926
III	<i>Medical Microbiology and Immunology</i>	2019	2.960
IV	<i>Medical Microbiology and Immunology</i>	2020	2.960



Dr. David Navarro Ortega.
Catedrático, Facultad de Medicina.
Departamento de Microbiología y Ecología.
Universidad de Valencia.
Valencia, a 14 de septiembre de 2020.

ARTÍCULOS



Assessing the risk of cytomegalovirus DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients by monitoring oxidative-stress markers in plasma

Alberto Talaya,¹ Carlos Solano,^{2,3} Estela Giménez,¹ José Luis García Giménez,⁴ Víctor Vinuesa,¹ Juan Alberola,⁵ Federico V. Pallardó⁴ and David Navarro^{1,5,*}

Abstract

The level of antioxidants, such as thiol-containing tripeptide glutathione (GSH), in cytomegalovirus (CMV)-infected cells is notably increased. We previously showed that GSH levels in plasma, as measured by untargeted ¹H nuclear magnetic resonance, are higher in allogeneic stem cell transplant (allo-SCT) recipients who subsequently develop CMV viraemia. We hypothesized that the net level of oxidative-stress markers present in plasma may be reduced in patients who develop CMV DNAemia compared to those who do not. We serially monitored the levels of malondialdehyde (MDA) and carbonylated proteins (CPs) early after allo-SCT and assessed whether they could predict the occurrence of CMV DNAemia. MDA levels were measured in 43 patients (28 had CMV DNAemia) and CPs were quantified in 53 patients (38 patients developed CMV DNAemia). The area under the curve (AUC) value for MDA, but not for CPs, was significantly lower in patients who subsequently developed CMV DNAemia compared to those who remained DNAemia-free ($P=0.043$). A trend toward lower MDA AUC values was observed in episodes of CMV DNAemia with faster CMV replicative kinetics and in those who reached higher peak CMV DNA levels. Moreover, receiver operating characteristic curve analyses indicated that the MDA biomarker had the predictive ability to discriminate between patients with or without subsequent CMV DNAemia (AUC=0.69, 95 % confidence interval 0.51–0.85, $P=0.05$). In summary, serial quantitation of MDA may be useful for individualizing antiviral prophylaxis therapies (targeted prophylaxis) in the upcoming era of new antiviral drugs with improved safety profiles.

INTRODUCTION

Cytomegalovirus (CMV) establishes a latent infection in human hosts and can be either reactivated stochastically [1, 2] or triggered by a variety of stimuli, including catecholamine-related stress signals and downstream inflammatory signals such as TNF- α [3, 4]. Cytomegalovirus reactivation frequently occurs in CMV-seropositive allogeneic stem cell transplant (allo-SCT) recipients and can result in significant morbidity, particularly in patients with poorly reconstituted T-cell immunity [5]. While preemptive antiviral therapy is the preferred strategy for preventing CMV end-organ disease there is renewed interest in universal prophylaxis due to the advent of new antivirals with high anti-CMV activity and better safety profiles than those of classic drugs such as ganciclovir and foscarnet [6, 7].

However, inherent to the choice of universal prophylaxis is the use of anti-CMV drugs in up to 65 % of patients who would never develop CMV disease, even in the absence of preventive measures.

An alternative approach to universal prophylaxis is the restriction of antiviral drug exposure only to patients at the highest risk of CMV viraemia (targeted prophylaxis). However, the precise identification of these patients remains an unmet need. In a recently published proof-of-concept study we found that plasma metabolomic profiling using ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy may prove useful in this respect. Specifically, we built a PLS-DA (projection to latent-structures for discriminant analysis) model which can predict the occurrence of CMV DNAemia in 73 % of cases [8]. Notably, taurine and the thiol-containing tripeptide glutathione (GSH), both known

Received 31 March 2017; Accepted 18 May 2017

Author affiliations: ¹Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Institute for Research INCLIVA, Valencia, Spain; ²Hematology Service, Hospital Clínico Universitario, Institute for Research INCLIVA, Valencia, Spain; ³Department of Medicine, School of Medicine and Dentistry, University of Valencia, Valencia, Spain; ⁴CIBERer, Department of Physiology, School of Medicine, University of Valencia, Institute for Research INCLIVA, Valencia, Spain; ⁵Department of Microbiology, School of Medicine and Dentistry, University of Valencia, Valencia, Spain.

*Correspondence: David Navarro, david.navarro@uv.es

Keywords: cytomegalovirus; oxidative stress; CMV DNAemia; CMV reactivation; allogeneic stem cell transplant recipients; plasma.

Abbreviations: allo-SCT, allogeneic stem cell transplant; AUC, area under the curve; CMV, cytomegalovirus; CP, carbonylated protein; dt, doubling time; GSH, glutathione; GvHD, graft versus host disease; MDA, malondialdehyde; ROC, receiver operating characteristic; ROS, reactive oxygen species; TBA, thiobarbituric acid.

to mediate antioxidant effects [9], were upregulated and significantly contributed to this model.

In light of this finding, we hypothesized that the net level of oxidative-stress markers in plasma may be reduced in patients who subsequently develop CMV DNAemia compared to those who do not. To test this hypothesis we serially monitored the levels of malondialdehyde (MDA) and carbonylated proteins (CPs), markers which are extensively used to identify either reactive oxygen species (ROS)-mediated lipid or protein oxidation, respectively [10], in plasma samples early after allo-SCT. We then assessed the usefulness of these markers for predicting the subsequent occurrence of CMV DNAemia in these subjects.

RESULTS

Incidence and features of CMV DNAemia episodes

Of the 55 patients included in the cohort, 39 developed CMV DNAemia (first episode) at a median of 34 days (range, 10–84 days) after transplant. Of these, 20 (52.6%) were preemptively treated with antivirals. The initial and peak CMV DNA loads in these episodes ranged between 20 and 2590 IU ml⁻¹, and from 83.2 to 420 000 IU ml⁻¹, respectively, and the episodes lasted between 4 and 149 days. In this cohort, the source of stem cells, donor type, conditioning regimen, donor and recipient CMV paired serostatus, or the graft versus host disease (GvHD) prophylactic regimen used were not significantly associated with

Table 1. Demographic and clinical characteristics of patients with or without CMV DNAemia

Parameter	No. of patients (%)		
	CMV DNAemia	No. CMV DNAemia	P-value*
Sex			0.547
Male	22 (66.7%)	11 (33.3%)	
Female	17 (77.3%)	5 (22.7%)	
Underlying disease			0.293
Acute leukaemia	12 (75.0%)	4 (25.0%)	
Chronic leukaemia	4 (100.0%)	0 (0.0%)	
Lymphoma	13 (68.4%)	6 (31.6%)	
Myelodysplastic syndrome/myelofibrosis	5 (9.1%)	0 (0.0%)	
Multiple myeloma	1 (50.0%)	1 (50.0%)	
Others	7 (100%)	0 (0.0%)	
Mismatched	17 (81.0%)	4 (19.0%)	
HLA-matching			0.245
Haploidentical	12 (75.0%)	4 (25%)	
Matched	22 (64.7%)	12 (35.3%)	
Mismatched	5 (100.0%)	0 (0.0%)	
Donor type			0.344
Related	26 (66.7%)	13 (33.3%)	
Unrelated	13 (81.2%)	3 (18.8%)	
Stem cell source			0.653
Peripheral blood	37 (69.8%)	16 (30.2%)	
Bone marrow	1 (100.0%)	0 (0.0%)	
Umbilical cord blood	1 (100.0%)	0 (0.0%)	
Conditioning regimen			0.710
Myeloablative	6 (66.7%)	3 (33.3%)	
Non-myeloablative	33 (71.7%)	13 (28.3%)	
Graft vs host disease prophylaxis			0.754
Cyclophosphamide/cyclosporin A/mycophenolate mofetil	12 (75.0%)	4 (30.8%)	
Other combinations	27 (69.2%)	12 (0.0%)	
CMV serostatus			0.102
D+/R+	29 (65.9%)	15 (34.1%)	
D-/R+	10 (90.9%)	1 (9.1%)	
Grade II-IV	15 (88.2%)	2 (11.8%)	

CMV, cytomegalovirus; D, donor; HLA, human leukocyte antigen; R, recipient.

*Frequency comparisons were performed using the χ^2 test (to compare more than two groups) or the Fisher exact test (to compare two groups). Two-tailed *P*-values < 0.05 were deemed to be significant.

the CMV DNAemia incidence rate (Table 1). Likewise, patients' age was comparable ($P=0.185$) in those either with or without CMV DNAemia (median 55 years, range 18–70 years vs median 45 years, range 25–68 years, respectively). Nevertheless, a trend towards a higher incidence of CMV DNAemia was observed in patients who received an HLA-mismatched allograft (including those undergoing haploidentical allo-SCT) with respect to their HLA-matched counterparts (81 vs 64 %; $P=0.081$).

Plasma levels of oxidative-stress markers for the prediction of CMV DNAemia

We measured MDA and CP levels in serial plasma specimens (median of three specimens per patient) in all of the patients. The MDA levels could only be measured in 43 patients (because of insufficient plasma sample volume), of whom 28 had CMV DNAemia. In turn, CPs were quantified in 53 patients, of whom 38 developed CMV DNAemia. We compared the area under the curve (AUC) and peak values of both markers in patients who did or did not subsequently develop CMV DNAemia. Representative AUC profiles from patients in both groups are shown in Fig. 1.

The MDA AUC values (Fig. 2a) were significantly lower in patients who developed CMV DNAemia than in those who did not ($P=0.043$). Likewise, we also observed a trend towards lower CP AUC values (Fig. 2b) in patients developing DNAemia later ($P=0.079$). The MDA (Fig. 2c), but not CP (Fig. 2d), peak levels also tended to be lower in patients who later developed CMV DNAemia ($P=0.075$ for MDA and $P=0.203$ for CPs). The receiver operating characteristic (ROC) curves built on the AUCs for MDA and CPs indicated that only the MDA biomarker (Fig. 3) had sufficient predictive ability to discriminate between patients who did or did not subsequently develop CMV DNAemia [AUC=0.69, 95 % confidence interval (CI): 0.51–0.85; $P=0.05$]. However, this discriminatory power was rather modest: a threshold set at the upper 95 % CI value for patients who developed CMV DNAemia (AUC ≤ 5.1) yielded negative and positive predictive values of 78.9 and 45.8 %, respectively.

Interestingly, the AUCs of both markers were lower in episodes of CMV DNAemia with faster CMV replicative kinetics [CMV DNA doubling time (dt) <2 days] and in those reaching higher peak CMV DNA levels (≥ 1500 IU ml⁻¹) which thus required antiviral therapy according to our locally

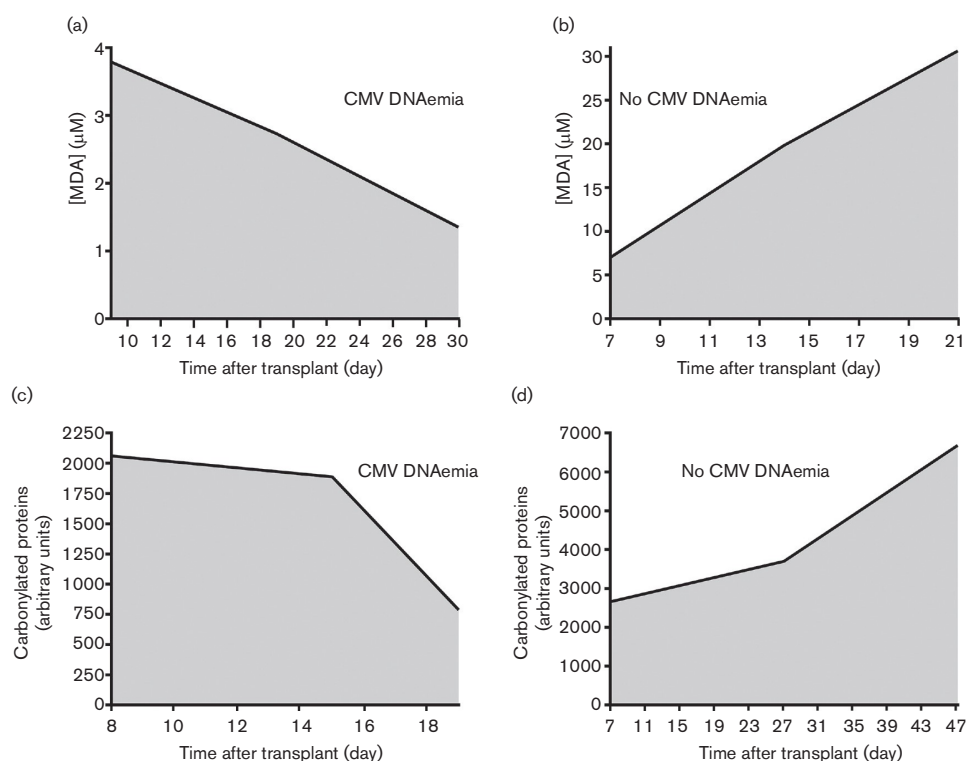


Fig. 1. Representative profiles of the AUC for MDA and CPs in allo-SCT recipients with no documented CMV DNAemia (a, b) or in those who subsequently developed CMV DNAemia (c, d).

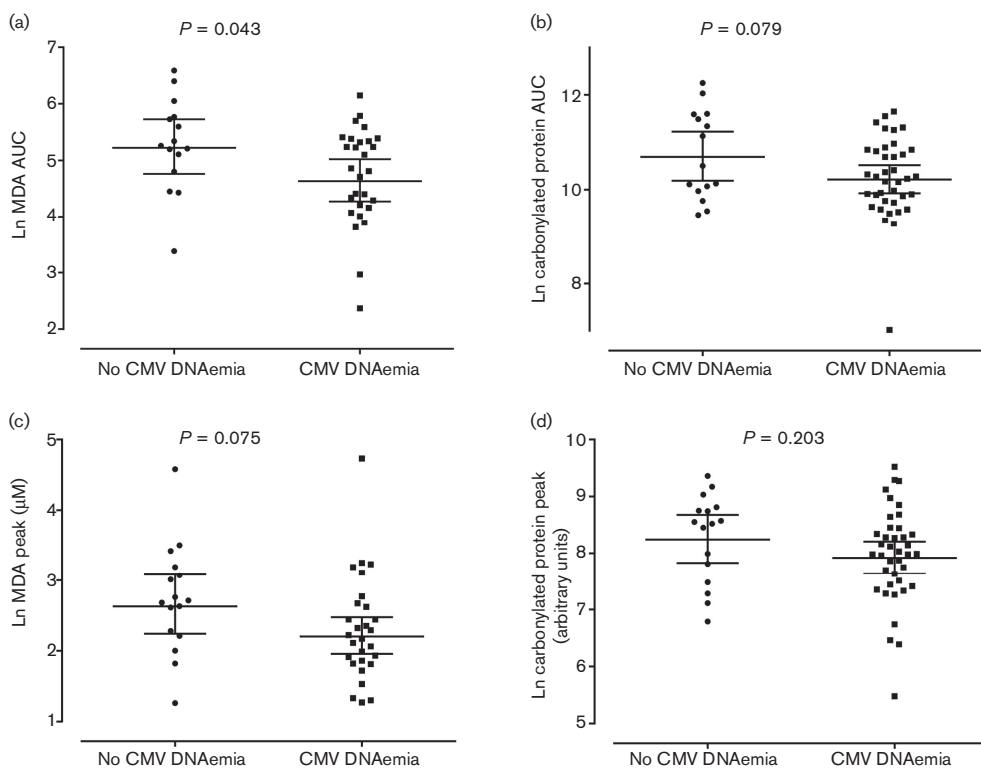


Fig. 2. AUC (a, b, respectively) and peak values (c, d, respectively) in allo-SCT recipients who did or did not subsequently develop CMV DNAemia for MDA and CPs, respectively; two-sided exact *P*-values are reported and *P*-values<0.05 were considered to be statistically significant.

validated guidelines (Table 2), although the differences did not reach statistical significance.

Baseline transplant parameters and oxidative-stress markers present in plasma

Two pre-transplant parameters were associated with significantly lower AUCs (Table 2) or peak MDA levels (Table 3): receipt of a haploidentical (and overall HLA-mismatched) allograft and the use of cyclosporin A and mycophenolate mofetil in regimens containing cyclophosphamide for GvHD prophylaxis. No significant associations were found between these transplant parameters and the AUCs or peak levels of CPs (Tables 2 and 3).

DISCUSSION

In a previous study we showed that the levels of antioxidant taurine and GSH present in plasma early after allo-SCT were elevated in patients who subsequently developed CMV DNAemia [8]. Based on this finding, we hypothesized that the net level of oxidative-stress markers in plasma may also be simultaneously decreased, and that their quantitation could be useful for predicting the occurrence of CMV DNAemia. To

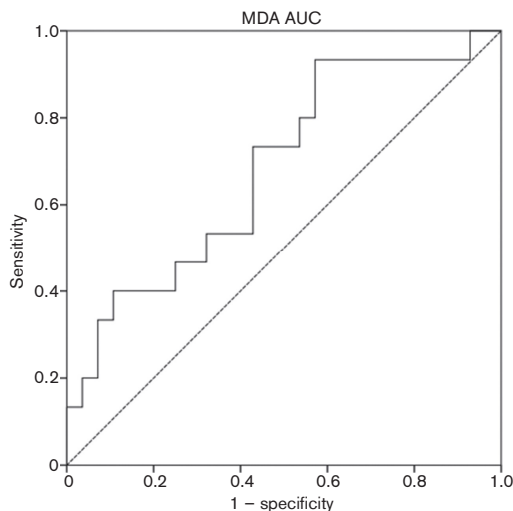


Fig. 3. ROC curves built on the AUC for MDA.

Table 2. AUC of oxidative-stress markers in plasma according to baseline transplant and CMV DNAemia kinetic parameters

Parameter	Mean AUC MDA (95 % CI)	P-value	Mean AUC, carbonylated proteins (95 % CI)	P-value*
HLA-matching				
Haploidentical	4.2 (3.8–4.6)	<0.001	10.3 (9.6–10.9)	0.766
Matched	5.3 (5.1–5.6)		10.5 (10.1–10.7)	
Mismatched	4.9 (4.2–6.9)		10.3 (9.5–11.5)	
Donor type				
Related	4.8 (4.5–5.2)	0.312	10.5 (10.2–10.8)	0.310
Unrelated	5.1 (4.7–5.5)		10.2 (9.8–10.5)	
Stem cell source				
Peripheral blood	4.9 (4.6–5.2)	0.948	10.4 (10.1–10.6)	0.445
Bone marrow	4.9 (–)		11.4 (–)	
Umbilical cord blood	–		9.9 (–)	
Conditioning regimen				
Myeloablative	5.2 (4.5–5.9)	0.320	10.2 (9.7–10.6)	0.387
Non-myeloablative	4.9 (4.6–5.2)		10.4 (10.2–10.7)	
Graft vs host disease prophylaxis				
Cyclosporin A/mycophenolate mofetil (including patients treated with cyclophosphamide)	4.2 (3.8–4.6)	<0.001	10.3 (9.8–10.9)	0.305
Other combinations	5.3 (4.7–5.9)		10.5 (9.8–11.3)	
CMV serostatus				
D+/R+	5.4 (5.1–5.6)	0.07	10.4 (10.1–10.7)	0.845
D–/R+	4.8 (4.5–5.1)		10.4 (10.0–10.9)	
CMV DNAemia				
Yes	4.7 (4.4–5.1)	0.043	10.3 (10.0–10.5)	0.079
No	5.3 (4.8–5.7)		10.7 (10.2–11.3)	
Peak CMV DNAemia				
<1000 IU ml ⁻¹	4.9 (4.3–5.6)	0.326	10.1 (9.6–10.5)	0.211
≥1000 IU ml ⁻¹	4.6 (4.2–5.0)		10.4 (10.1–10.8)	
CMV DNA doubling time				
<2 days	4.1 (2.9–5.3)	0.142	9.9 (8.9–11.0)	0.208
≥2 days	5.0 (4.8–5.3)		10.4 (10.0–10.7)	

AUC, area under the curve; CMV, cytomegalovirus; D, donor; HLA, human leukocyte antigen; MDA, malondialdehyde; R, recipient.

*Differences between means were compared using the *t*-test (to compare two groups) and the ANOVA test (to compare more than two groups).

test this idea in our patient cohort, we serially measured the plasma levels of MDA, an organic compound that results from lipid peroxidation of polyunsaturated fatty acids [11], and CPs, carbonyl derivatives formed by direct metal-catalysed oxidative attack of the amino acid side chains of proline, arginine, lysine and threonine [12]. The clinical utility of measuring MDA and CPs in order to infer the magnitude of ROS-mediated lipid and protein oxidation, respectively, has been previously shown [10].

The data obtained seemed to support our hypothesis. Specifically, we observed that the MDA AUCs and peak MDA levels were lower in patients who later developed CMV DNAemia when compared to those measured in study participants with no subsequently documented CMV DNAemia. In fact, ROC curves built on AUC data for MDA indicated that this biomarker could discriminate, although rather modestly, between patients who did or did not later develop CMV DNAemia. However, this was not the case

for CP AUC or peak CP values. Furthermore, large-series studies have shown that receipt of haploidentical allografts (in conjunction with cyclophosphamide GvHD prophylaxis) or other HLA-mismatched allograft modalities increase the risk of CMV DNAemia (reviewed in [6, 7, 13]). In this context, we found that lower MDA AUCs and peak MDA levels were also associated with these graft types.

It is of relevance to highlight that both study groups (patients with or without CMV DNAemia) were well balanced in terms of age, sex, chemotherapy conditioning and immunosuppressive regimens used for the prevention of acute GvHD, as all these parameters have been shown to modulate the level of oxidative-stress markers in tissues and blood [14–18].

It is well known that inflammation triggers CMV reactivation [3–5] and that oxidative stress and inflammation are closely related pathophysiological processes [19]; thus, in

Table 3. Peak plasma levels of oxidative-stress markers according to baseline transplant and CMV DNAemia kinetic parameters

Parameter	Peak of MDA (mean)	95 % CI	P-value	Peak of protein carbonylation (mean)	95 % CI	P-value*
HLA-matching						
Haploidentical	1.9 (1.7–2.1)		<0.001	8.0 (7.5–8.5)		0.684
Matched	2.7 (2.4–3.0)			8.0 (7.6–8.3)		
Mismatched	3.7 (1.4–6.0)			8.4 (6.4–10.7)		
Donor type						
Related	2.3 (2.1–2.6)		0.160	8.1 (7.9–8.4)		0.222
Unrelated	2.7 (2.2–3.2)			7.8 (7.6–8.4)		
Stem cell source						
Peripheral blood	2.5 (2.2–2.7)		0.658	8.0 (7.9–8.3)		0.774
Bone marrow	2.1 (–)			8.6 (–)		
Umbilical cord blood	–			8.1 (–)		
Conditioning regimen						
Myeloablative	2.8 (2.0–3.6)		0.198	7.9 (7.4–8.4)		0.487
Non-myeloablative	2.4 (2.1–2.6)			8.1 (8.0–8.4)		
Graft vs host disease prophylaxis						
Cyclophosphamide/cyclosporin A/ mycophenolate mofetil	1.9 (1.7–2.1)		<0.001	8.0 (7.5–8.5)		0.698
Other combinations	2.8 (2.1–3.3)			8.1 (7.2–8.7)		
CMV serostatus						
D+/R+	2.4 (n=36)	2.1–2.7	0.322	8.1 (n=44)	7.9–8.4	0.984
D–/R+	2.7 (n=8)	2.3–3.1		8.1 (n=11)	7.7–8.5	
Peak CMV DNAemia						
Yes	2.3 (2.0–2.6)		0.075	8.0 (7.8–8.3)		0.203
No	2.7 (2.3–3.2)			8.3 (8.0–8.8)		
CMV DNA peak load						
<1500 IU ml ⁻¹	2.5 (2.2–2.9)		0.205	7.9 (7.6–8.2)		0.579
≥1500 IU ml ⁻¹	2.1 (1.7–2.6)			8.0 (7.8–8.6)		
CMV DNA doubling time						
<2 days	2.3 (1.2–3.3)		0.715	7.9 (7.4–9.0)		0.767
≥2 days	2.4 (2.1–2.7)			8.0 (7.7–8.3)		

AUC, area under the curve; CMV, cytomegalovirus; D, donor; HLA, human leukocyte antigen; MDA, malondialdehyde; R, recipient.

*Differences between means were compared using the *t*-test (to compare two groups) and the ANOVA test (to compare more than two groups).

this context, our observations may seem counterintuitive. Nevertheless, they can be explained if we assume that CMV reactivates primarily in tissue and organ sites prior to accessing the blood compartment. This has been previously demonstrated in the mCMV murine model [20] and has also been shown to occur in certain clinical settings, such as in intensive care unit patients [21]. In our working pathogenetic model (depicted in Fig. 4), CMV reactivation is triggered in tissues in a local and systemic environment of inflammation and oxidative stress likely promoted by high-dose chemotherapy used in conditioning and immunosuppressive agents employed for the prevention of acute GVHD [16, 18]. In this sense, both TNF- α [3] and high ROS levels activate NF- κ B, which in turn triggers transactivation of the viral immediate-early promoter [3, 4, 22], a critical step in the completion of the CMV lytic cycle. CMV replication causes cellular stress, leading to the generation of ROS as the by-products of different cellular processes [23]. In response to CMV-induced lytic injury, cells overproduce

certain antioxidant enzymes and molecules that remove ROS. Specifically, the level of GSH is notably higher in CMV-infected cells [24, 25] than in their non-infected counterparts. Thus, we speculate that hyperproduction of antioxidants during active CMV replication in tissues may result in a net decrease in oxidative-stress markers, such as MDA and CPs, both locally and later on in the vascular compartment, and that the magnitude of this reduction likely directly correlates with that of CMV replication. Indeed, our data seem to support this idea; we measured lower MDA AUCs and MDA peak levels in active CMV infection episodes with apparently faster virus replication rates (dt <2 days) consequently leading to higher plasma CMV DNA levels.

The main limitations of this present study are its relatively limited sample size and its retrospective nature. It can also be argued that MDA and CP levels do not provide a complete picture of ongoing oxidative-stress processes;

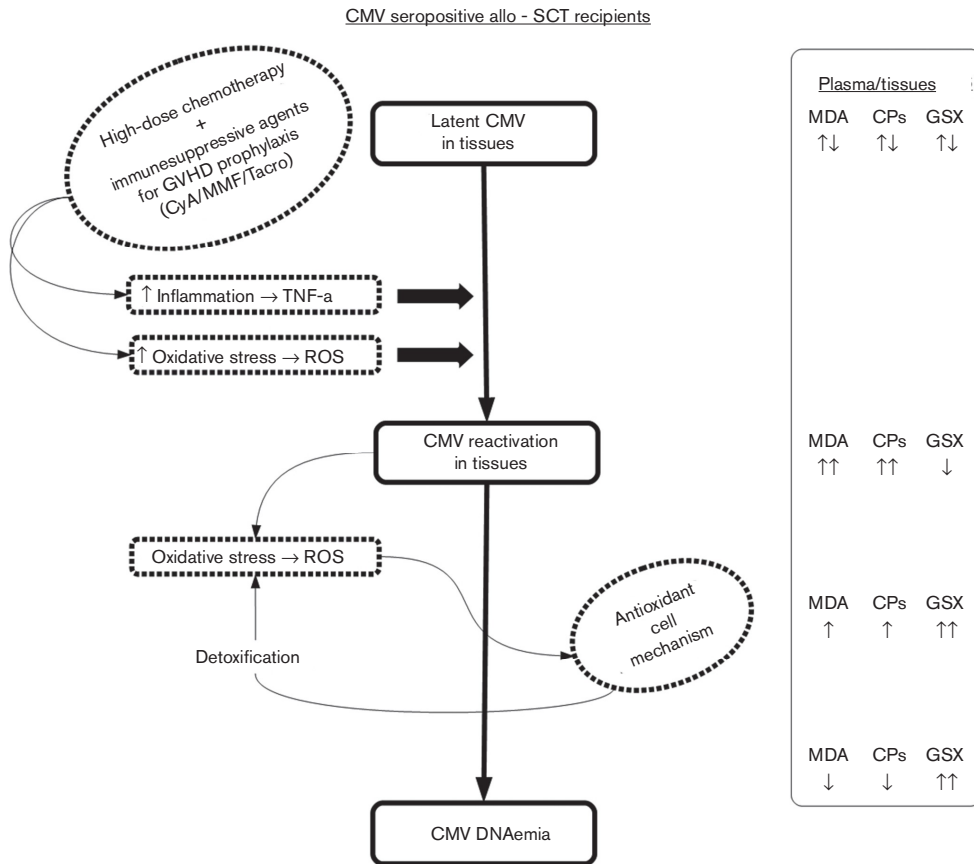


Fig. 4. Diagram of sequential events postulated to lead to a decrease in oxidative-stress markers in plasma prior to the detection of CMV DNAemia in allo-SCT recipients. High-dose chemotherapy used in conditioning and certain immunosuppressive agents employed for the prophylaxis of acute graft versus host disease (aGvHD) generate a pro-inflammatory and oxidative-stress environment that triggers CMV reactivation in tissues through the action of certain mediators capable of transactivating the CMV immediate-early 1 (IE-1) promoter, such as TNF- α or ROS. CMV replication causes cellular oxidative stress, leading to the overproduction of antioxidant molecules such as thiol-containing tripeptide GSH that remove ROS. MDA and CPs, markers of ROS-mediated lipid or protein oxidation, respectively, increase in tissues and plasma shortly following allo-SCT and further increase in patients in whom CMV reactivates at tissue and organ sites. Local hyperproduction of antioxidants such as GSH ensues as a cellular compensatory mechanisms in an effort to detoxify ROS and avoid further tissue damage. As a result, a net decrease in oxidative-stress markers, such as MDA and CPs, both locally and later on in the vascular compartment, can be evidenced prior to the time of CMV DNAemia detection. CyA, cyclosporin A; MMF, mycophenolate mofetil; Tacro, tacrolimus.

nevertheless, both have been extensively used for that purpose [26] and can directly measure the chemical impact of ROS in biological systems [10].

In summary, we show for the first time to our knowledge that the measurement of oxidative-stress markers in plasma may help to predict the occurrence of CMV DNAemia in allo-SCT recipients. In addition to providing further insight into the pathogenesis of CMV reactivation in allo-SCT patients, our findings are also potentially of clinical interest, in that serial quantitation of these biomarkers, MDA in particular, may be useful for individualizing antiviral prophylaxis

therapies (targeted prophylaxis) in the upcoming era of new antiviral drugs with improved safety profiles. Nonetheless, validation of our data will require further prospective and statistically robust studies both in allo-SCT recipients and in experimental settings, such as in the mCMV murine model.

METHODS

Patients

This retrospective observational study included 55 non-consecutive patients who underwent allo-SCT for haematological diseases at the Hospital Clínico Universitario in Valencia

between 2013 and 2015. The only criterion for patient exclusion was the lack of available consecutive specimens for the experiments described herein. The mean patient age was 50.9 years (range, 18–70 years). The study period comprised the first 100 days after allo-SCT and all the patients gave their written informed consent prior to participating in the study, which was approved by the local Review Board and Ethics Committee (Ethical Committee of Clinical Research of the University Hospital of Valencia).

CMV DNAemia surveillance

Detection of CMV DNAemia and plasma CMV DNA load monitoring in patients with an active CMV infection was performed using the new RealTime CMV PCR assay from Abbott Molecular, which has a detection limit of approximately 20 copies ml⁻¹ (31 IU ml⁻¹; [27]). The criteria for triggering the initiation of preemptive antiviral therapy or prompting its discontinuation are published elsewhere [28]. Patients treated with preemptive antiviral therapy were administered oral valganciclovir [900 mg (12 h)⁻¹] or i.v. ganciclovir [5 mg kg⁻¹ (12 h)⁻¹], and i.v. foscarnet [60 mg kg⁻¹ (8 h)⁻¹] was used as a second-line therapy. Plasma CMV DNA load monitoring was conducted at least once a week during the study period [28].

CMV DNA dt calculation

The dt of CMV was estimated based on the first two positive PCR results in the absence of antiviral treatment. The dt was calculated as $dt = (t_2 - t_1) \times \log(2) / \log(q_2/q_1)$, where q_1 and t_1 are the CMV DNA load (copies ml⁻¹) at the time of the first positive PCR result (in days), respectively, and q_2 and t_2 are the CMV DNA load at the time of the second positive PCR, respectively [29, 30].

Measurement of oxidative-stress markers

A total of 157 cryopreserved plasma specimens were retrieved for the analysis described herein. A median of three specimens (range, 2–3) were available from each patient. These specimens had been obtained at three consecutive time points: at a median of day +8 (range, 1–29), day +17 (range, 5–40) and day +28 (range, 16–61) after allo-SCT. Lipid hydroperoxide MDA was measured via a high-performance liquid chromatography–ultraviolet light (HPLC-UV) assay, as previously described [26]. Briefly, plasma samples (50 µl) were mixed with 0.44 M phosphoric acid and 42 mM thiobarbituric acid (TBA; Sigma-Aldrich, USA) and incubated in a water bath at 95 °C for 1 h to hydrolyse the lipoperoxides, liberating malondialdehyde. The samples were immediately cooled and diluted 1 : 1 with alkaline methanol; a process which allows MDA-TBA2 adduct formation. The samples were then centrifuged (13 000 g, for 5 min at 4 °C) and 200 µl of the supernatant was mixed 1 : 1 with 50 mM KH₂PO₄ at pH 3.5. The supernatant was separated by HPLC on RP C18 columns using an isocratic method: phase A consisted of 50 mM KH₂PO₄ at pH 6.8 and acetonitrile (ACN); KH₂PO₄:ACN, 83:17; and phase B consisted of a ACN : water (70 : 30) mixture.

The MDA-TBA2 adduct was detected by UV-visible light at 532 nm. To measure oxidized proteins in the plasma, the specimens were derivatized into 2,4-dinitrophenylhydrazones (DNP-hydrazone) by allowing them to react with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), according to the procedure outlined by [31]. Briefly, the protein content in plasma samples were quantified using the Lowry method; 10 µg of proteins from each sample was denatured with 5 µl of 12 % SDS. Then, 10 µl of 10 mM DNPH in 10 % (v/v) trifluoroacetic acid were added to the protein solution. The reaction mixture was neutralized and 10 µl samples were spotted onto a nitrocellulose membrane. The membrane was then blocked with 5 % BSA in Peripheral blood stem cell transplantation (PBST) for 1 h, and incubated with an anti-DNP antibody, as described by the manufacturer (OxyBlot Protein Oxidation Detection kit; Millipore). Images were captured using an ImageQuant LAS-4000 (GE Healthcare Life Sciences) and the signal density was analysed with ImageJ software (NIH Image); each oxidative-stress parameter was measured in triplicate.

Statistical analyses

The frequencies of categorical variables were compared using the χ^2 -test (Fisher exact test). AUCs were built on GraphPad Prism 6, version 6.01. The AUCs and peak MDA and CP values were then ln-transformed (Napierian logarithm) to make the data conform to normality (ln AUC MDA, $P=0.180$; ln AUC CPs, $P=0.200$; ln peak MDA, $P=0.200$; ln peak CPs, $P=0.200$ according to the Kolmogorov–Smirnov test). Differences between the means were compared using a *t*-test (comparing two groups) and an ANOVA test (comparing more than two groups). ROC curves were built and the data were analysed using the statistical package SPSS, version 20.0 (IBM SPSS Statistics). Two-sided exact *P*-values are reported and *P*-values <0.05 were considered to be statistically significant.

Funding information

This work was supported by a grant from the FIS (Healthcare Research Fund; Fondo de Investigaciones Sanitarias in its original Spanish) from the Spanish Ministry of Health (FIS 12/01992). E.G. holds a Río Hortega research contract from the ISCIII (Carlos III Health Institute; Instituto de Salud Carlos III in its original Spanish).

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Ethical statement

The study was approved by the local Review Board and Ethics Committee (Ethical Committee of Clinical Research of the University Hospital of Valencia). All patients gave their written informed consent prior to participating in the study.

References

- Görzer I, Guelly C, Trajanoski S, Puchhammer-Stöckl E. Deep sequencing reveals highly complex dynamics of human cytomegalovirus genotypes in transplant patients over time. *J Virol* 2010; 84:7195–7203.
- Reddehase MJ, Balthesen M, Rapp M, Jonjić S, Pavić I et al. The conditions of primary infection define the load of latent viral genome in organs and the risk of recurrent cytomegalovirus disease. *J Exp Med* 1994;179:185–193.

3. Cook CH, Trgovcich J, Zimmerman PD, Zhang Y, Sedmak DD. Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor alpha, or interleukin-1 β triggers reactivation of latent cytomegalovirus in immunocompetent mice. *J Virol* 2006;80:9151–9158.
4. Prösch S, Wendt CE, Reinke P, Priemer C, Oppert M et al. A novel link between stress and human cytomegalovirus (HCMV) infection: sympathetic hyperactivity stimulates HCMV activation. *Virology* 2000;272:357–365.
5. Navarro D. Expanding role of cytomegalovirus as a human pathogen. *J Med Virol* 2016;88:1103–1112.
6. Boeckh M, Murphy WJ, Peggs KS. Reprint of: Recent advances in cytomegalovirus: an update on pharmacologic and cellular therapies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015;21:S19–S24.
7. Romero PP, Blanco P, Giménez E, Solano C, Navarro D. An update on the management and prevention of cytomegalovirus infection following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Future Virol* 2015;10:113–134.
8. Monleón D, Giménez E, Muñoz-Cobo B, Morales JM, Solano C et al. Plasma metabolomics profiling for the prediction of cytomegalovirus DNAemia and analysis of virus–host interaction in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Gen Virol* 2015;96:3373–3381.
9. Tabas I, Glass CK. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science* 2013;339:166–172.
10. Frijhoff J, Winyard PG, Zarkovic N, Davies SS, Stocker R et al. Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2015;23:1144–1170.
11. Moore K, Roberts LJ. Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic Res* 1998;28:659–671.
12. Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R et al. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med* 2006;10:389–406.
13. Slade M, Goldsmith S, Romee R, Dipersio JF, Dubberke ER et al. Epidemiology of infections following haploidentical peripheral blood hematopoietic cell transplantation. *Transpl Infect Dis* 2017; 19:e12629.
14. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacogn Rev* 2010;4:118–126.
15. Mikhed Y, Daiber A, Steven S. Mitochondrial oxidative stress, mitochondrial DNA damage and their role in age-related vascular dysfunction. *Int J Mol Sci* 2015;16:15918–15953.
16. Sari I, Cetin A, Kaynar L, Saraymen R, Hacioglu SK et al. Disturbance of pro-oxidative/antioxidative balance in allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Ann Clin Lab Sci* 2008;38: 120–125.
17. Soldin OP, Mattison DR. Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacokinet* 2009;48:143–157.
18. Sabuncuoğlu S, Kuşkonmaz B, Uckun Çetinkaya D, Özgüneş H. Evaluation of oxidative and antioxidative parameters in pediatric hematopoietic SCT patients. *Bone Marrow Transplant* 2012;47:651–656.
19. Biswas SK. Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox? *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:1–9.
20. Reddehase MJ, Podlech J, Grzimek NK. Mouse models of cytomegalovirus latency: overview. *J Clin Virol* 2002;25 Suppl 2:23–36.
21. Chilet M, Aguilar G, Benet I, Belda J, Tormo N et al. Virological and immunological features of active cytomegalovirus infection in nonimmunosuppressed patients in a surgical and trauma intensive care unit. *J Med Virol* 2010;82:1384–1391.
22. Speir E, Shibusani T, Yu ZX, Ferrans V, Epstein SE. Role of reactive oxygen intermediates in cytomegalovirus gene expression and in the response of human smooth muscle cells to viral infection. *Circ Res* 1996;79:1143–1152.
23. Munger J, Bajad SU, Collier HA, Shenk T, Rabinowitz JD. Dynamics of the cellular metabolome during human cytomegalovirus infection. *PLoS Pathog* 2006;2:e132–1175.
24. Chambers JW, Maguire TG, Alwine JC. Glutamine metabolism is essential for human cytomegalovirus infection. *J Virol* 2010;84: 1867–1873.
25. Tilton C, Clippinger AJ, Maguire T, Alwine JC. Human cytomegalovirus induces multiple means to combat reactive oxygen species. *J Virol* 2011;85:12585–12593.
26. Breusing N, Grune T, Andrisic L, Atalay M, Bartosz G et al. An inter-laboratory validation of methods of lipid peroxidation measurement in UVA-treated human plasma samples. *Free Radic Res* 2010;44:1203–1215.
27. Clari MÁ, Bravo D, Costa E, Muñoz-Cobo B, Solano C et al. 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* 2013;75:207–209.
28. Solano C, Giménez E, Piñana JL, Vinuesa V, Poujois S et al. Pre-emptive antiviral therapy for CMV infection in allogeneic stem cell transplant recipients guided by the viral doubling time in the blood. *Bone Marrow Transplant* 2016;51:718–721.
29. Emery VC, Cope AV, Bowen EF, Gor D, Griffiths PD. The dynamics of human cytomegalovirus replication in vivo. *J Exp Med* 1999;190: 177–182.
30. Muñoz-Cobo B, Solano C, Costa E, Bravo D, Clari MÁ et al. Dynamics of cytomegalovirus (CMV) plasma DNAemia in initial and recurrent episodes of active CMV infection in the allogeneic stem cell transplantation setting: implications for designing preemptive antiviral therapy strategies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17: 1602–1611.
31. Shacter E, Williams JA, Lim M, Levine RL. Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by Western blot immunoassay. *Free Radic Biol Med* 1994;17:429–437.

Five reasons to publish your next article with a Microbiology Society journal

1. The Microbiology Society is a not-for-profit organization.
2. We offer fast and rigorous peer review – average time to first decision is 4–6 weeks.
3. Our journals have a global readership with subscriptions held in research institutions around the world.
4. 80% of our authors rate our submission process as 'excellent' or 'very good'.
5. Your article will be published on an interactive journal platform with advanced metrics.

Find out more and submit your article at microbiologyresearch.org.

Validation of a plasma metabolomics model that allows anticipation of the occurrence of cytomegalovirus DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients

Daniel Monleón,¹† Alberto Talaya,²† Estela Giménez,² Víctor Vinuesa,² José Manuel Morales,¹ Juan Carlos Hernández-Boluda,³ Ariadna Pérez,³ José Luis Piñana,³ Carlos Solano^{3,4} and David Navarro^{2,5,*}

Abstract

A plasma metabolomic model obtained by means of untargeted ¹H nuclear magnetic resonance, to which taurine, choline, methylamine, total glutathione, trimethylamine N-oxide, lactate, lysine, isoleucine, total fatty acids and unsaturated fatty acids contributed, was validated for the prediction of first episodes of cytomegalovirus (CMV) DNAemia in a cohort of 79 allogeneic stem haematopoietic stem cell transplant (allo-HSCT) recipients. The predictive success rate was nearly 65 % for patients at both low and high risk of CMV-related complications according to their baseline characteristics. Plasma metabolomics profiling shortly after engraftment (day 21 after transplantation) allowed the anticipation of the occurrence of CMV DNAemia in 71 % of patients. Plasma metabolomics analyses may be ancillary for identifying allo-HSCT patients at the highest risk of CMV DNAemia who may benefit from early targeted antiviral prophylaxis.

o DNAemia occurs frequently in allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients and may lead to end-organ disease if preventative measures are not implemented in a timely manner (i.e. administration of preemptive antiviral therapy) [1]. Moreover, it has been suggested that even when it occurs at a low level, CMV DNAemia may have a deleterious impact on patient survival [2], although the extent of this remains controversial [3]. If the latter assumption holds true, prediction of the occurrence of viraemia, quickly followed by the inception of antiviral prophylaxis, would likely result in tangible benefits to patients. The advent of novel antivirals showing excellent efficacy against CMV and a good safety profile, such as letermovir [4], makes this targeted prophylaxis strategy an appealing approach. Unfortunately, baseline transplant factors are insufficiently precise to identify patients at the high-risk of CMV DNAemia [1].

Metabolomic analysis aims at identifying and quantifying small molecule metabolic products of a biological system

(cell, tissue, organ, biological fluid, or organism) at a given time point by means of targeted or untargeted nuclear magnetic resonance (NMR) or mass spectrometry methods [5]. This type of molecular analysis is increasingly being viewed as a potential tool for optimizing the management of infectious diseases caused by viruses [6–9]. In this context, we previously identified a plasma metabolomic signature by means of ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy, which may serve this purpose [10]. Up to 10 metabolites were found to contribute to this predictive chemometric model, including taurine, choline, methylamine, total glutathione (GsX), trimethylamine N-oxide (TMAO), lactate, and total and unsaturated fatty acids, which were upregulated in patients who eventually developed CMV DNAemia, and lysine and isoleucine, which were found to be downregulated in these patients. This metabolomic profile was interpreted as reflecting a systemic ‘hyperinflammatory’ state (increase in methylamines and lactate concentrations), coupled with ongoing compensatory mechanisms mediated by antioxidants such as total GsX and taurine [10], and was

Received 5 January 2018; Accepted 19 April 2018

Author affiliations: ¹Metabolomic and Molecular Image Laboratory, Fundación de Investigación INCLIVA, Department of Pathology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain; ²Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Fundación de Investigación INCLIVA, Valencia, Spain; ³Hematology and Medical Oncology Service, Hospital Clínico Universitario, Fundación de Investigación INCLIVA, Valencia, Spain; ⁴Department of Medicine, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain; ⁵Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain.

*Correspondence: David Navarro, david.navarro@uv.es

Keywords: Cytomegalovirus (CMV); allogeneic stem cell transplantation; metabolomics; plasma; DNAemia.

Abbreviations: Allo-HSCT, allogeneic haematopoietic stem cell transplantation; CMV, cytomegalovirus; GsX, total glutathione; IU, international units; NMR, nuclear magnetic resonance; PCR, polymerase chain reaction; PLS-DA, partial least squares projection to latent structures-discriminant analysis; TMAO, trimethylamine N-oxide; VIP, variable importance in projection.

†These authors contributed equally to this work.

Four supplementary tables are available with the online version of this article.

pathogenetically linked to the occurrence of CMV DNAemia by virtue of the well-known triggering effect of inflammation on CMV reactivation in organ and tissues [11]. For the present study we built a new independent validation cohort to test this plasma metabolomics model.

The current cohort consisted of 79 non-consecutive adult patients who underwent T-cell replete Allo-HSCT for haematological disorders at the Haematology Unit of the Hospital Clínico Universitario (HCU) of Valencia between June 2013 and August 2015. The median age of patients was 54 years (range, 20 to 70 years). The patients' relevant clinical and demographic data are shown in Table 1. No exclusion criteria other than a lack of available plasma specimens for metabolomics profiling was applied. The study period comprised the first 100 days after allo-HSCT and only initial (first) episodes of CMV DNAemia were considered for the analyses described herein.

Monitoring of plasma CMV DNAemia was performed by real-time PCR (Abbott RealTime CMV, Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA) as previously described [12]. The limit of detection and quantitation of this assay is approximately 31 IU ml⁻¹ (20 copies ml⁻¹) [13]. Surveillance for CMV DNA detection in plasma was conducted at least once a week within the study period.

Of the 79 patients, 50 (63.2%) had a first episode of CMV DNAemia at a median 39 days after allo-HSCT (range, 10 to 99 days). The median initial CMV DNA load was 102 IU ml⁻¹ (range, 30–177 086 IU ml⁻¹) and the median CMV DNA peak load within episodes was 1803 IU ml⁻¹ (range, 75–4 159 486 IU ml⁻¹). The remaining 29 patients had no documented CMV DNAemia within the study period. Pre-emptive antiviral treatment was given to 25 patients (50%). One patient developed CMV end-organ disease (gastrointestinal disease). The incidence of bacterial infections of any origin and severe acute graft-versus-host disease requiring the administration of corticosteroids at high doses within the study period was balanced between patients with and without CMV DNAemia (not shown). This is of relevance because of the potential effect of these two events on the composition of the plasma metabolome [14].

A total of 135 plasma samples (test specimens) were available from patients who developed CMV DNAemia (median, two specimens/patient; range, one to eight/patient). These specimens were collected at approximately 1-week intervals, and were drawn prior to the documentation of this event. Most specimens (~90%) were obtained through day 40 after transplantation. In turn, 92 samples drawn within a comparable time frame after allo-HSCT were available from patients who had no CMV DNAemia within the study period (control specimens).

Plasma processing for metabolomics profiling has previously been described in detail [10]. Briefly, samples that had been cryopreserved at -20 °C (and never thawed before) were retrieved immediately prior to processing. Fifty microlitres of D₂O were added to 500 µl of plasma and an aliquot of

Table 1. Clinical characteristics of study patients

or	No. (%)
Sex	
Male	51 (65)
Female	28 (35)
Underlying disease	
NHL/CLL	25 (32)
AML/MDS	27 (35)
ALL	6 (8)
CML	1 (1)
HD	10 (13)
MM	3 (4)
MF	2 (3)
Others	5 (6)
Stem cell source	
UCB	1 (1)
BM	2 (3)
PB	76 (96)
Donor type	
HLA non-identical	6 (8)
Haploidentical	25 (32)
MUD	23 (29)
MRD	25 (32)
CMV serostatus	
D+/R+	53 (67)
D-/R+	15 (19)
D+/R-	8 (10)
D-/R-	3 (4)
Myeloablative/reduced intensity conditioning	
aGvHD prophylaxis	20 (25)/59 (75)
CSA/MMF±CP	22 (28)
Tacrolimus/CP	4 (5)
Tacrolimus/sirolimus	22 (28)
CSA/MTX	30 (38)
CSA/PDN	1 (1)
aGvHD	
No	57 (72)
Yes	22 (28)
Grade I	4 (18)
Grade II	13 (59)
Grade III–IV	5 (23)

AML, acute myeloid leukaemia; ALL, acute lymphocytic leukaemia; aGvHD, acute graft versus host disease; BM, bone marrow; CLL, chronic lymphocytic leukaemia; CML, chronic myeloid leukaemia; CSA, cyclosporin A; Cy, cyclophosphamide; D, donor; HD, Hodgkin's disease; HLA, human leukocyte antigen; MDS, myelodysplastic syndrome; MF, myelofibrosis; MM, multiple myeloma; MMF, mycophenolate mofetil; MTX, methotrexate; MUD, matched unrelated donor; MRD, matched related donor; NHL, non-Hodgkin lymphoma; PB, peripheral blood; PDN, prednisone; R, receptor; UCB, umbilical cord blood.

500 µl was taken and placed in a 5 mm NMR tube. The ¹H-NMR spectra were recorded in a Bruker Avance DRX 600 spectrometer (Bruker GmbH, Rheinstetten, Germany). A

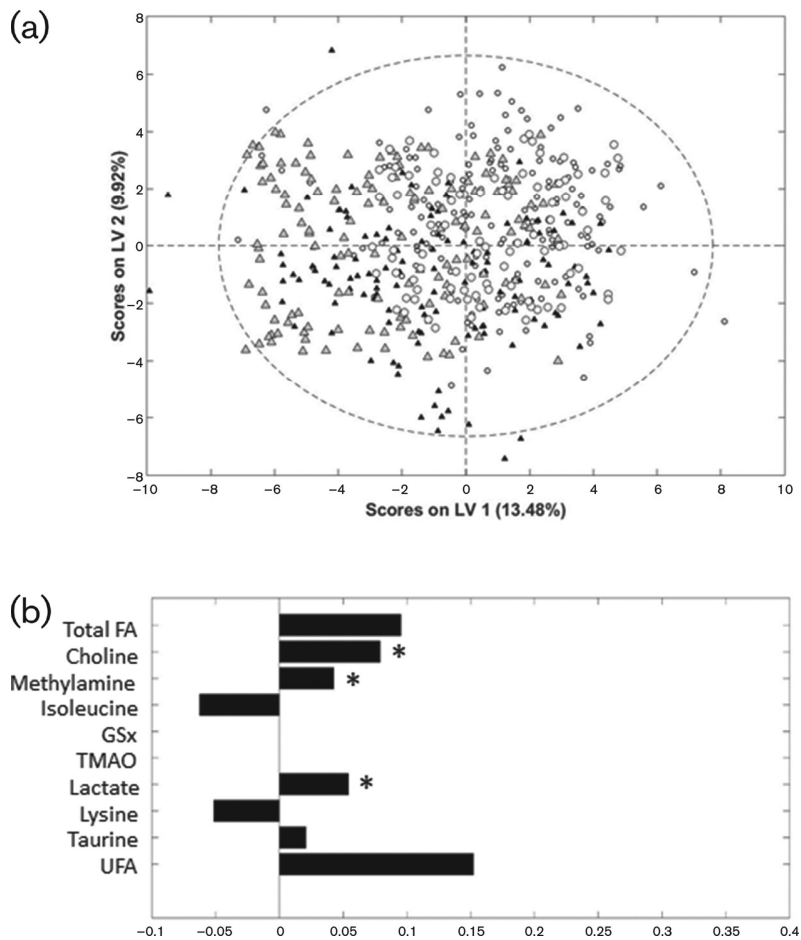


Fig. 1. (a) Projection of the validation cohort over the scores plot diagram of the metabolomics PLS-DA training model (these data were previously published in [10]). Small icons represent the data from the training cohort (black triangles for samples from patients subsequently developing CMV DNAemia and white circles for patients not doing so within a comparable time frame). Larger grey icons represent the data from the validation cohort (dark grey triangles for specimens from patients subsequently developing CMV DNAemia and light grey circles for patients not doing so within a comparable time frame). The dotted line represents the 95 % confidence range of the PLS-DA plasma metabolomics model. Outliers are included in the graph. (b) Relative changes in the concentration of metabolites with the PLS-DA plasma metabolomics model VIP scores ≥ 1 between samples from patients subsequently developing CMV DNAemia and specimens from patients with no documented CMV DNAemia within the study period. The changes were calculated as the differences between the average values for test specimens and control samples normalized to the average values for control specimens. Positive and negative values on the x-axis mean that the average concentration for a given metabolite in the test group is higher or lower, respectively, than in the control group. The represented numerical values $\times 100$ correspond to the percentage increase or decrease for each metabolite. The statistical significance of the differences at the 0.05 level was tested using the Anova two-tailed test with Bonferroni correction for multiple testing (* -value < 0.05 ; ** -value < 0.01). FA, fatty acids; GSx, total glutathione; TMAO, trimethylamine N-oxide; UFA, unsaturated fatty acids.

single-pulse presaturation experiment was performed for all samples. Spectral chemical shift referencing on the alanine CH_3 doublet signal at 1.475 p.p.m. was performed for all spectra. We normalized the binned data to the total spectral area and transferred them to MATLAB [The MathWorks, Inc, MA, USA (2006)] for model validation. The spectra

were preprocessed for compatibility and proper validation of the built model. More details about the chemometric modelling can be found elsewhere [5]. Signals belonging to the metabolites contributing the most to VIP scores in the models were integrated and quantified using semi-automated in-house MATLAB 7.4 (The Mathworks, Inc.) peak-fitting

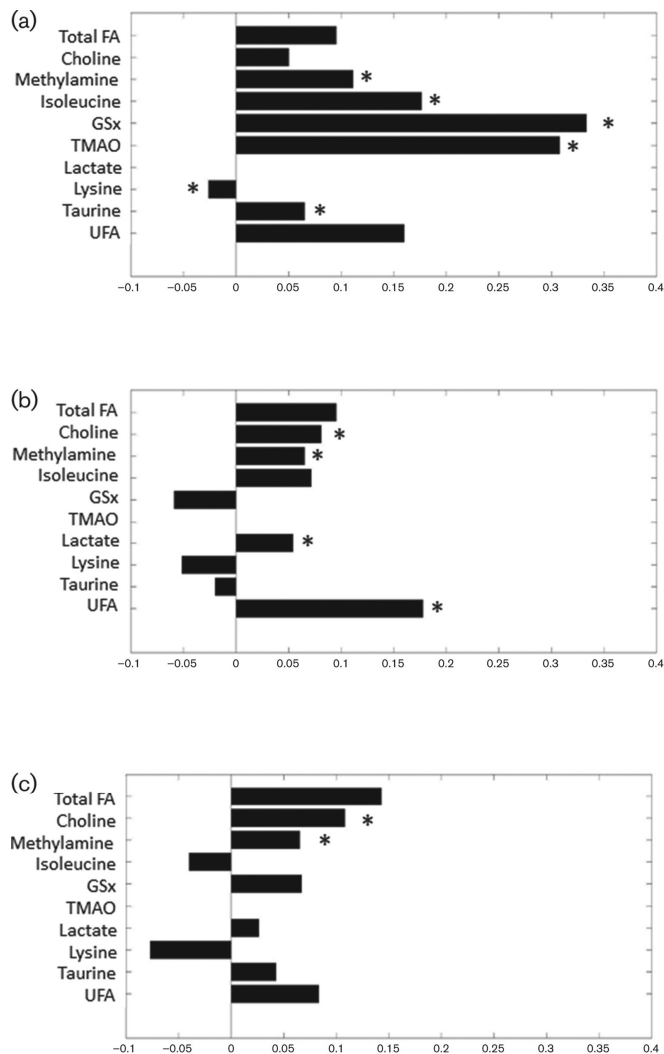


Fig. 2. Metabolic differences between samples from allogeneic haematopoietic stem cell transplant (allo-HSCT) patients subsequently developing CMV DNAemia and those from patients with no documented CMV DNAemia within the study period. (a) All specimens from high-risk patients; (b) all specimens from low-risk patients; (c) a single specimen obtained at a median of 21 days after allo-HSCT. Relative changes, numerical values and statistical significance were calculated as detailed in the Fig. 1(b) legend. FA, fatty acids; GsX, total glutathione; TMAO, trimethylamine N-oxide; UFA, unsaturated fatty acids.

routines. These fitting routines were based on Levenberg–Marquardt optimization procedures. The target function for optimization included experimental spectra measured for standard solutions of selected metabolites with complex multiplet patterns and theoretically generated Lorentzian-shape signals for metabolites with simpler spectral patterns. The metabolic levels were expressed as total relative metabolic content (calculated as the integral of the selected metabolite divided by the sum of all integrals in the spectra). The statistical significance of the differences at the 0.05 level was tested

using the Anova two-way test with Bonferroni correction for multiple testing.

As shown in Fig. 1(a), the projection of this validation cohort over the scores plot diagram of our previous metabolomics PLS-DA training model [10] showed good profile agreement, with only three samples being out of the 95% confidence range. The trends of 8 out of the 10 metabolites contributing to the training model (VIP scores ≥ 1), including taurine, choline, methylamine, lactate, and total and

unsaturated fatty acids, all of which upregulated in plasma specimens from patients subsequently developing CMV DNAemia, and lysine and isoleucine, which were found to be downregulated, were reproduced in the validation cohort (Fig. 1b and Table S1, available in the online version of this article), although only choline, methylamine and lactate were present in concentrations that differed significantly between the test and control specimens. In contrast to our previous findings, no differences were observed between test and control samples of the remaining two metabolites, GsX and TMAO. Despite these dissimilarities, the prediction success rate of the model for CMV DNAemia was 64 % for both samples (87 out of 135 plasma specimens from patients who eventually had DNAemia were correctly classified; a median of 2 specimens; range, 0–4/patient) and patients (32 out of 50 patients with 1 or more specimens fitting the metabolomics model were correctly categorized).

The overall classification accuracy of the PLS-DA model in cross-validation technical replicates was 73 % in the training cohort [10]. Differences in baseline and post-transplant patient characteristics, as well as subtle dissimilarities in sampling times between the training and validation cohorts, may account for the small decrease in the discriminative ability of the model.

We next assessed how effectively the model predicted the occurrence of CMV DNAemia in patients categorized as either high or low risk for this event (and for end-organ disease) according to their pre-transplant characteristics [1]. Patients meeting one or more of the following conditions were deemed to be high risk: receipt of umbilical cord blood or bone marrow allograft; HLA-mismatched donor (including haploidentical donor); D-/R+CMV serological constellation. Low-risk patients were those not meeting any of the above conditions.

A total of 59 high-risk patients were included in the validation cohort, of whom 39 had CMV DNAemia. A total of 173 blood samples were available from these patients, of which 106 belonged to patients who went on to develop CMV DNAemia. The model was able to correctly classify 65 % of plasma specimens from these patients (69 out of 106 samples; a median of 2 specimens; range, 0–4/patient) and precisely categorized 64 % of patients (12 out of 20). The trends and relative concentration of most metabolites contributing to the model in test and control samples for this subset of allo-HSCT recipients (Fig. 2a and Table S2) virtually overlapped with those in the training cohort [10]. Only isoleucine showed an opposite trend.

In all, the cohort included 20 low-risk patients, of whom 11 eventually developed CMV DNAemia. A total of 54 plasma samples were available from this subset of patients, of which 29 were obtained from those who had subsequently CMV DNAemia. The prediction success rate of the metabolomics model was 64 % (18 out of 29 samples correctly categorized; median of 2 specimens; range, 0–3/patient; 7 out of 11 patients correctly categorized). The relative concentration of

the metabolites contributing to the model in the test and control specimens was slightly different from that in the training cohort [10] (Fig. 2b and Table S3). In particular, GsX and taurine showed an opposite trend.

In our previous study [10] we observed that the maximal prediction rate of the model was achieved when analysing specimens drawn at around 3 weeks after allo-HSCT. Specimens obtained at a median of 21 days after allo-HSCT (range, 18 to 29 days) were available from 77 patients in this validation cohort, of whom 38 eventually developed CMV DNAemia. The metabolomics model correctly predicted the occurrence of CMV DNAemia in 27 out of 38 patients (71 %). The relative concentration of metabolites in the test and control samples (Fig. 2c and Table S4) mirrored those in the training cohort, but the differences in certain components, such as GsX, TMAO, lactate and lysine, lost (although they approached) statistical significance.

Overall, it could be inferred from the above data that subtle and even remarkable differences in the trends or concentration of certain metabolites contributing to the model between the training and validation cohorts had only a minimal impact on its predictive ability. This is because the strength of this chemometric approach lies in the metabolomics profile itself, which is based on a combination of small metabolome variations, rather than the concentrations of individual metabolites [10].

The current study confirms the utility of plasma metabolomics profiling for predicting first episodes of CMV DNAemia in allo-HSCT recipients, as anticipated in our earlier study [10]. Of particular clinical interest is the predictive ability of the model when using a single plasma specimen drawn shortly after engraftment (day 21), as the majority of first CMV DNAemia episodes occur at later times [1]. A novel observation made herein was the consistency of the discriminative ability of the model across subsets of patients at different risk of CMV-related complications, which minimizes the potential impact of cohort heterogeneity on the validity of the results.

The predictive ability of the model was nearly 70 % at best (single specimen obtained shortly after engraftment), meaning that the information provided by this biological approach would only be ancillary for the guidance of targeted antiviral prophylaxis. Perhaps a risk score could be developed to anticipate CMV DNAemia that would integrate data obtained by plasma metabolomics with data obtained using other complementary biological approaches, such as CMV-specific T-cell monitoring and host genome analyses [1], as well as information derived from baseline patient characteristics. Work to this end is currently underway.

Funding information

This work was supported by grants (FIS 12/1990, FIS 15/00090 and grant number PIE15/00013) from FIS (Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain) and FEDER, and a

grant (SAF2014-52875-R) from the Ministry of Economy and Competitiveness of Spain.

Acknowledgements

E. G. holds a Río Hortega research contract from the Carlos III Health Institute (ISCIII).

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Ethical statement

The study was approved by the Hospital Clínico Universitario (HCU)-Fundación INCLIVA Ethics Committee (121990 January 2012). All patients gave their informed consent to participate in the study.

References

- Romero PP, Blanco P, Giménez E, Solano C, Navarro D. An update on the management and prevention of cytomegalovirus infection following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *ol* 2015;10:113–134.
- Green ML, Leisenring W, Xie H, Mast TC, Cui Y *et al.* Cytomegalovirus viral load and mortality after haemopoietic stem cell transplantation in the era of pre-emptive therapy: a retrospective cohort study. *Lancet Haematol* 2016;3:e119–e127.
- Solano C, Giménez E, Piñana JL, Albert E, Vinuesa V *et al.* Impact of cytomegalovirus DNAemia on overall and non-relapse mortality in allogeneic stem cell transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2017;19:e12717.
- Marty FM, Ljungman P, Chemaly RF, Maertens J, Dadwal SS *et al.* Letermovir prophylaxis for cytomegalovirus in hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* 2017;377:2433–2444.
- Beattie GA. Metabolic coupling on roots. *Nat Microbiol* 2018;3:396–397.
- Pacchiarotta T, Deelder AM, Mayboroda OA. Metabolomic investigations of human infections. *Bioanalysis* 2012;4:919–925.
- Locci E, Noto A, Lanari M, Lazzarotto T, Fanos V *et al.* Metabolomics: a new tool for the investigation of metabolic changes induced by cytomegalovirus. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2013;26:17–19.
- Kuhn M, Sühs KW, Akmatov MK, Klawonn F, Wang J *et al.* Mass-spectrometric profiling of cerebrospinal fluid reveals metabolite biomarkers for CNS involvement in varicella zoster virus reactivation. *J Neuroinflammation* 2018;15:20.
- Manchester M, Anand A. Metabolomics: strategies to define the role of metabolism in virus infection and pathogenesis. *Adv Virus Res* 2017;98:57–58.
- Monleón D, Giménez E, Muñoz-Cobo B, Morales JM, Solano C *et al.* Plasma metabolomics profiling for the prediction of cytomegalovirus DNAemia and analysis of virus–host interaction in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Gen Virol* 2015;96:3373–3381.
- 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.
- Giménez E, Muñoz-Cobo B, Solano C, Amat P, Navarro D *et al.* Early kinetics of plasma cytomegalovirus DNA load in allogeneic stem cell transplant recipients in the era of highly sensitive real-time PCR assays: does it have any clinical value? *J Clin Microbiol* 2014;52:654–656.
- Clari MÁ, Bravo D, Costa E, Muñoz-Cobo B, Solano C *et al.* 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* 2013;75:207–209.
- Mickiewicz B, Duggan GE, Winston BW, Doig C, Kubek P *et al.* Metabolic profiling of serum samples by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy as a potential diagnostic approach for septic shock. *Crit Care Med* 2014;42:1140–1149.

Five reasons to publish your next article with a Microbiology Society journal

- The Microbiology Society is a not-for-profit organization.
- We offer fast and rigorous peer review – average time to first decision is 4–6 weeks.
- Our journals have a global readership with subscriptions held in research institutions around the world.
- 80% of our authors rate our submission process as 'excellent' or 'very good'.
- Your article will be published on an interactive journal platform with advanced metrics.

Find out more and submit your article at microbiologyresearch.org.



Kinetics of inflammatory biomarkers in plasma predict the occurrence and features of cytomegalovirus DNAemia episodes in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients

Alberto Talaya¹ · Estela Giménez¹ · Víctor Vinuesa¹ · Ariadna Pérez² · Paula Amat² · José Luis Piñana² · Eliseo Albert¹ · Juan Carlos Hernández-Boluda² · Carlos Solano^{2,3} · David Navarro^{1,4}

Received: 20 February 2019 / Accepted: 9 March 2019 / Published online: 25 March 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Cytomegalovirus (CMV) DNAemia occurs frequently in CMV-seropositive allogeneic hematopoietic stem cell transplant (allo-HSCT) recipients, and usually results from reactivation of latent infection established in the recipient. Predicting the occurrence of CMV DNAemia may be helpful in managing CMV infection in allo-HSCT recipients. Here, the kinetics of several inflammatory biomarkers in plasma were characterized and assessed for their potential value in anticipating the development and features of active CMV infection in allo-HSCT recipients, as documented using real-time PCR assays. The cohort consisted of 46 non-consecutive adult patients who underwent T-cell replete allo-HSCT at our center. Plasma levels of C-reactive protein (CRP), soluble tumor necrosis factor receptor type 2 (sTNF-R2), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), and interferon-inducible protein 10 (IP-10/CXCL10) were measured in consecutive specimens obtained from conditioning either by nephelometry (CRP) or by specific immunoassays (the rest). Of the 46 patients, 22 had a first episode of CMV DNAemia at a median of 34 days after allo-HSCT (range, day 19–day 50). We found that both the TGF- β 1 area under a curve (AUC) and peak levels were significantly lower in patients who subsequently developed CMV DNAemia than in patients with no CMV DNAemia. Interestingly, CRP but not TGF- β 1 AUC and peak levels predicted the occurrence of CMV DNAemia episodes requiring preemptive antiviral therapy. The data presented herein suggest that kinetics of inflammatory biomarkers in plasma might be useful to anticipate post-engraftment CMV DNAemia episodes and predict the need for preemptive antiviral therapy in allo-HSCT recipients.

Keywords Cytomegalovirus (CMV) · Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) · C-reactive protein (CRP) · CMV DNAemia · Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT)

Edited by: Sebastian Voigt.

This article is part of the Special Issue on Immunological Imprinting during Chronic Viral Infection.

✉ David Navarro
david.navarro@uv.es

¹ Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, INCLIVA Research Institute, Av. Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia, Spain

² Hematology Service, Hospital Clínico Universitario, INCLIVA Research Institute, Valencia, Spain

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

⁴ Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Av. Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia, Spain

Introduction

Active cytomegalovirus (CMV) infection develops frequently in the allogeneic hematopoietic stem cell transplantation setting (allo-HSCT) and may lead to end-organ disease if effective antiviral therapy is not initiated in a timely fashion [1]. Precise identification of allo-HSCT recipients particularly prone to developing active CMV infection may become the cornerstone for optimal use of antiviral prophylaxis strategies with new anti-CMV agents [2, 3], whereby only patients at highest risk would be targeted. CMV reactivation may occur through allogeneic stimulation of peripheral blood mononuclear cells [4]. In addition, pro-inflammatory cytokines, most notably tumor necrosis factor- α (TNF- α), are known to trigger CMV reactivation from its latent state [5, 6]. Increased post-transplantation

TNF- α levels have been shown to be associated with the development of active CMV infection in the allo-HSCT setting [7, 8]. In these studies, the CMV pp65 antigenemia assay was used for active CMV infection surveillance; in this respect we previously showed that a commercially available plasma real-time PCR assay (CMV Real-Time PCR Kit; Qiagen GmbH, Hilde, Germany) was more sensitive than the antigenemia assay (98.9% versus 47.2%) for detection of CMV in blood [9]. Here, we investigated the kinetics of several inflammatory biomarkers in plasma and assessed their potential value in anticipating the occurrence and features of active CMV infection, as diagnosed by means of a highly sensitive real-time PCR assay, in allo-HSCT recipients. Cytokines chosen for the analyses included a general downstream inflammatory marker (C-reactive protein [CRP]), two markers of upstream inflammatory pathways (soluble tumor necrosis factor receptor type 2 [sTNF-R2] and transforming growth factor- β 1 [TGF- β 1]), and a pro-inflammatory chemokine (interferon-inducible protein 10 [IP-10/CXCL10]). These soluble proteins circulate at much higher levels than conventional inflammatory markers such as TNF- α and IL-6, and may thus provide more reliable information on the net state of inflammation at a given time point [10, 11].

Materials and methods

Patients

This cohort consisted of 46 non-consecutive adult patients who underwent T-cell replete allo-HSCT at the Hematology Service of the Hospital Clínico Universitario de Valencia between May 2011 and June 2014. The only criterion for patient exclusion was lack of available consecutive specimens, arbitrarily defined as less than three, for the analyses described below. The cohort was representative of the entire patient population undergoing allo-HSCT at our center within the study period (not shown). The median age of patients at the time of allo-HSCT was 51 years (range 18–66 years). Patients' demographic, baseline, and post-transplant clinical data are summarized in Table 1. The study period comprised the first 100 days after allo-HSCT. This study was approved by the Hospital Clínico Fundación INCLIVA Ethics Committee. Informed consent was signed by all participants.

Management of active CMV infection

Plasma CMV DNA load was monitored using the Artus CMV Real-Time PCR Kit (produced by Qiagen GmbH, Hilde, Germany for Abbott Molecular Diagnostics Abbott) until May 2012 and the CMV RealTime CMV PCR (Abbott

Table 1 Patient demographic and clinical characteristics

Parameter	No. of patients (%)
Sex	
Male	29 (63.0%)
Female	17 (37.0%)
Underlying disease	
Acute leukemia	15 (32.6%)
Chronic leukemia	8 (17.4%)
Lymphoma	18 (39.1%)
Myelodysplastic syndrome/myelofibrosis	3 (6.5%)
Multiple myeloma	2 (4.3%)
HLA-matching	
Matched	32 (69.6%)
Mismatched	14 (30.4%)
Donor type	
Related	28 (60.9%)
Unrelated	18 (39.1%)
Stem cell source	
Peripheral blood	37 (80.4%)
Umbilical cord blood	6 (13.0%)
Bone marrow	3 (6.5%)
Conditioning regimen	
Reduced intensity	30 (65.2%)
Standard intensity	16 (34.8%)
Graft-vs-host disease prophylaxis	
Regimen with cyclophosphamide	8 (17.4%)
Regimen with cyclosporin A	25 (54.3%)
Regimen with sirolimus	13 (28.3%)
ATG prophylaxis	
Yes	8 (17.4%)
No	38 (82.6%)
CMV serostatus	
D+/R+	24 (52.2%)
D+/R-	8 (17.4%)
D-/R+	11 (23.9%)
D-/R-	3 (6.5%)
Acute graft-vs-host disease	
Grades 0–I	34 (73.9%)
Grades II–IV	12 (6.1%)

ATG anti-thymocyte globulin, CMV cytomegalovirus, HLA human leukocyte antigen, D donor, R recipient

Molecular, Des Plaines, IL, USA) thereafter. The limit of detection and quantitation of both assays is approximately 20 copies/ml–31 IU/ml–(95% CI) [12]. CMV DNA monitoring was scheduled to be conducted on a weekly basis through day + 100, and twice a week in patients with CMV DNAemia, as per our center protocol. Antiviral therapy with (val)ganciclovir or foscarnet at conventional doses was initiated when the plasma CMV DNA load reached levels of > 500 (until May 2012) or 1000 copies/ml (thereafter)

[13]. Approximately, 500 copies/ml measured by the Artus CMV Real-Time PCR Kit and 1000 copies/ml quantitated by the CMV real-time CMV PCR assay correspond to around 1500 IU/ml [12].

Quantitation of inflammatory biomarkers in plasma

Leftover plasma specimens primarily used for CMV DNA load monitoring obtained from the time of conditioning to day + 50 after allo-HSCT were retrieved (thawed for the first time) for measurements. All plasma specimens from a given patient were analyzed in triplicate (mean values are used throughout the study) in the same run. Analyses were performed in several batches within 2015. CRP was quantitated by nephelometry using the high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) assay manufactured by Siemens Healthineers (Erlangen, Germany). The sensitivity of the assay is 0.10 mg/l, the assay range 0.10–50 mg/l, and the reproducibility 6.8% at 1.16 mg/l. sTNF-R2, TGF- β 1, and IP-10 were quantitated by a multiplex antibody- and magnetic bead-based system using the Luminex instrument platform (ProcartaPlex immunoassays; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), following the manufacturer's recommendations. The sensitivity of the sTNF-R2 assay is 0.1 pg/ml, the assay range 1.27–5200 pg/ml and the inter- and intra-assay coefficients of variation less than 10%. The TGF- β 1 assay displays a sensitivity of 0.1 pg/ml, the assay range is 1.1–4500 pg/ml and the inter- and intra-assay coefficients of variation less than 10%. Finally, the IP-10 assay has limit of detection of 0.3 pg/ml, the range of quantitation is 1.95–8000 pg/ml and the inter- and intra-assay coefficients of variation 5.5% and 6.6%, respectively.

Blood cell counts

Enumeration of absolute leukocyte and lymphocyte was performed by hemocytometry and flow cytometry using the BD FACSCanto II Flow Cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), respectively. Values for both cell populations determined at the time points selected for plasma biomarkers measurements were taken into consideration for the analyses described below.

Definitions

Active CMV infection and CMV DNAemia are used interchangeably throughout the text. CMV DNAemia was defined as detection of CMV DNA at any level in one or more plasma specimens. The overall duration of a given episode of viral DNAemia was the time elapsed between the day of first detection of viral DNA in plasma and the day of first negative (undetectable) PCR result. Acute

graft-versus-host disease (aGvHD) was diagnosed and graded as previously reported [14].

Statistical analysis

Differences between medians were compared using the Mann–Whitney *U* test (for two independent variables). The Spearman rank test was used to assess the correlation between continuous variables. Qualitative variables were compared using the Chi-square test. Two-sided exact *P* values are reported. A *P* value ≤ 0.05 was considered statistically significant. Univariate and multivariate logistic regression models were built to assess the impact of several clinical and biological factors on the risk of CMV DNAemia. These statistical analyses were performed using SPSS version 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). The area under the plasma concentration–time curve (AUC) \log_{10} for each cytokine (in mg [CRP] or pg [sTNF-R2, TGF- β 1, IP-10] \times days/l [CPR] or /ml [sTNF-R2, TGF- β 1 and IP-10]) and for absolute leukocytes and lymphocytes (10^6 cells \times days/ml) was calculated applying the curve trapezoid rule, using the GraphPad Prism Software (La Jolla, CA, USA), as previously reported [15]. All plasma and blood counts measurements were taken into consideration for AUCs calculations. Receiver operating characteristic (ROC) curve analyses were performed using the same statistical package.

Results

CMV DNAemia episodes in the study population

Of the 46 patients included in the study, 22 had a first episode of CMV DNAemia at a median of 34 days after allo-HSCT (range, day 19–day 50). The initial and peak median CMV DNA loads were 80.5 IU/ml (range 30.5 IU/ml–398 IU/ml) and 3141 IU/ml (range 80.5–123,393 IU/ml), respectively. CMV DNAemia episodes lasted a median of 42 days (range 18–142 days). Fourteen of the 22 patients received preemptive antiviral therapy with (val)ganciclovir. There were no significant differences between patients with or without CMV DNAemia regarding most baseline and post-transplant patient characteristics including sex, underlying disease, type of allograft, source of hematopoietic stem cells, conditioning regimen, acute GvHD prophylaxis regimen, CMV serostatus of donors and cumulative incidence of aGvHD (Table 2). Only recipient CMV serostatus was significantly different ($P=0.003$) across comparison groups, CMV seropositive having a predictably higher prevalence among patients who went on to develop CMV DNAemia.

Table 2 Demographic and clinical characteristics of patients with or without CMV DNAemia

Parameter	No. of patients (%)		
	CMV DNAemia (<i>n</i> = 22)	No CMV DNAemia (<i>n</i> = 24)	<i>P</i> value
Sex			
Male	14 (48.3%)	15 (51.7%)	0.936
Female	8 (47.1%)	9 (52.9%)	
Underlying disease			
Acute leukemia	8 (53.3%)	7 (46.7%)	0.589
Chronic leukemia	3 (37.5%)	5 (62.5%)	
Lymphoma	9 (50.0%)	9 (50.0%)	
Myelodysplastic syndrome/myelofibrosis	2 (66.7%)	1 (33.3%)	
Multiple myeloma	0 (0.0%)	2 (100.0%)	
HLA-matching			
Matched	14 (43.8%)	18 (56.2%)	0.403
Mismatched	8 (57.1%)	6 (42.9%)	
Donor type			
Related	11 (39.3%)	17 (60.7%)	0.148
Unrelated	11 (61.1%)	7 (38.9%)	
Stem cell source			
Peripheral blood	17 (45.9%)	20 (54.1%)	0.605
Non-peripheral blood	5 (55.6%)	4 (44.4%)	
Conditioning regimen			
Reduced intensity	15 (50.0%)	15 (50.0%)	0.686
Standard intensity	7 (43.8%)	9 (56.3%)	
Graft-vs-host disease prophylaxis			
Regimen with cyclophosphamide	5 (62.5%)	3 (37.5%)	0.215
Regimen with cyclosporin A	9 (36.0%)	16 (64.0%)	
Regimen with sirolimus	8 (61.5%)	5 (38.5%)	
ATG prophylaxis			
Yes	5 (62.5%)	3 (37.5%)	0.361
No	17 (44.7%)	21 (55.3%)	
Donor CMV serostatus			
D+	14 (43.8%)	18 (56.3%)	0.403
D–	8 (57.1%)	6 (42.9%)	
Recipient CMV serostatus			
R+	21 (60.0%)	14 (40.0%)	0.003
R–	1 (9.1%)	10 (90.9%)	
Acute graft-vs-host disease			
Grades 0–I	15 (44.1%)	19 (55.9%)	0.397
Grades II–IV	7 (58.3%)	5 (41.7%)	

ATG anti-thymocyte globulin, CMV cytomegalovirus, HLA human leukocyte antigen, D donor, R recipient

Kinetics of inflammatory biomarkers in plasma and occurrence of CMV DNAemia

We investigated whether plasma levels of inflammatory biomarkers measured from the time of conditioning predicted the development of CMV DNAemia. A median of four specimens per patient were available for these analyses (range 3–4). The time points at which samples were drawn from patients who eventually developed CMV DNAemia are

shown in Fig. 1a and overlapped with those from patients with no documented CMV DNAemia throughout the study period—Fig. 1b—(range, day –7 through day 50 from patients with CMV DNAemia, and range, day –3 through day 50 from patients with no CMV DNAemia). Specifically, a total of 75 and 81 specimens from patients with or without CMV DNAemia were analyzed, respectively. We chose to consider two kinetics parameters, the AUC, which reflects the actual exposure to the selected biomarker, and the peak

A

Day rank	-7 – 0	1 – 10	11 – 20	21 – 30	31 – 40	41 – 50
Patient 1		x		x	x ↑	
Patient 2	x		x		x ↑	
Patient 3		x		x	x	↑
Patient 4	x		x	x	↑	
Patient 5	x		x x		↑	
Patient 6	x	x	x x	↑		
Patient 7	x	x	x x	↑		
Patient 8	x	x	x x		↑	
Patient 9	x	x	x x ↑			
Patient 10		x	x	x ↑		
Patient 11		x	x		x	↑
Patient 12	x			x		↑
Patient 13		x	x		x ↑	
Patient 14	x	x	x	x ↑		
Patient 15	x			x x		↑
Patient 16	x	x	x	x	↑	
Patient 17	x	x	x	x	↑	
Patient 18		x	x	x	↑	
Patient 19	x	x	x	x	↑	
Patient 20	x	x	x	x	↑	
Patient 21	x	x	x	x ↑		
Patient 22			x	x	x	↑

B

Day rank	-7 – 0	1 – 10	11 – 20	21 – 30	31 – 40	41 – 50
Patient 23		x	x		x	
Patient 24		x		x	x	
Patient 25		x	x		x	
Patient 26		x		x	x	
Patient 27		x	x		x	
Patient 28		x		x		x
Patient 29	x	x		x		
Patient 30	x		x		x	
Patient 31	x	x	x x			
Patient 32	x	x	x x			
Patient 33		x	x		x	
Patient 34	x	x	x x			
Patient 35	x	x	x	x		
Patient 36		x x	x	x		
Patient 37	x	x	x x			
Patient 38	x	x	x x			
Patient 39			x	x	x	
Patient 40			x	x	x	
Patient 41			x	x	x	
Patient 42			x	x	x	
Patient 43		x x	x			
Patient 44		x x		x		
Patient 45		x	x	x x		
Patient 46		x x	x	x		

Fig. 1 Time points (x) at which plasma specimen were drawn for analyses in a patients subsequently developing active CMV infection (arrows) or not (b)

level. We found that both the TGF- β 1 AUC_s and peak levels were significantly lower ($P=0.020$ and $P=0.026$, respectively) in patients who subsequently developed CMV DNAemia than in patients with no CMV DNAemia (Tables 3, 4, respectively). Overall, peak levels of this biomarker were reached at a median of 14.5 days (range –6 to 39 days) after allo-HSCT (median of 14; range –6 to 35 days in patients with subsequent CMV DNAemia; median of 16 days; range, –3 to 39 days in patients with no CMV DNAemia; $P=0.890$). Neither AUCs nor peak concentrations of the remaining biomarkers differed significantly across comparison groups. ROC curve analyses were next performed to determine optimal cutoff values for the TGF- β 1 AUC and peak levels that best discriminated between patients who did, or did not go on to develop CMV DNAemia (Fig. 2); optimal thresholds were found to be 3.75 pg \times days/ml⁻¹ (AUC) and 437 pg/ml (peak level), both displaying a sensitivity of 83.3% (95% CI 68.4–98.2%) and an specificity of 50% (95% CI 20.4–79.5%). TGF- β 1 AUC and TGF- β 1 peak levels below the aforementioned optimal thresholds were found to be independently associated with the occurrence of CMV DNAemia (OR 7.21; 95% CI 1.31–42.7) in multivariate logistic regression models adjusted for sex, donor type, source of hematopoietic stem cells, HLA-matching,

conditioning regimen, prophylaxis for aGvHD and donor/recipient CMV serostatus (not shown).

Nevertheless, we found no correlation between either the TGF- β 1 AUC or the TGF- β 1 peak levels and the duration of CMV DNAemia ($\rho=-0.093$; $P=0.681$, and $\rho=-0.211$; $P=0.345$).

Interestingly, CRP but not TGF- β 1 AUC and peak levels predicted the occurrence of CMV DNAemia episodes requiring inception of PET (8 out of 14 episodes). ROC curve analyses (Fig. 2) indicated that the optimal cutoff values for CRP AUC and peak levels best discriminating between patients who did or did not subsequently develop CMV DNAemia were 2.5 mg \times days/l and 16.7 mg/l, respectively, with a sensitivity of 100% (95% CI 100%) and a specificity of 50% (95% CI 10–90%).

Of note, patients who developed CMV DNAemia and patients who did not were comparable regarding: (1) the incidence of bacterial infections of any origin (occurring in 10 out of 22 patients with CMV DNAemia and in 12 out of 24 patients without CMV DNAemia; $P=0.40$); (2) the AUC log₁₀ values for absolute leukocytes and lymphocytes, whose calculation took into consideration blood cell counts measured at the same time points than those selected for plasma biomarker measurements (Fig. 3); (3) the incidence

Table 3 Area under a curve (AUC) of pro-inflammatory cytokines in plasma in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients with or without subsequent CMV DNAemia

Biomarker/outcome	Median AUC ^a	AUC log ₁₀ range ^a	<i>P</i> value
CRP			
CMV DNAemia	2.72	2.25–3.39	0.317
No CMV DNAemia	2.87	2.25–3.41	
CMV DNAemia preemptively treated with antivirals	2.92	2.51–3.39	0.002
Self-resolving CMV DNAemia	2.54	2.25–2.74	
IP-10			
CMV DNAemia	2.99	1.43–3.91	0.291
No CMV DNAemia	3.11	2.01–4.12	
CMV DNAemia preemptively treated with antivirals	3.35	1.43–3.76	0.525
Self-resolving CMV DNAemia	2.85	3.39–3.91	
sTNF-R2			
CMV DNAemia	4.03	2.72–4.36	0.226
No CMV DNAemia	4.06	3.36–4.41	
CMV DNAemia preemptively treated with antivirals	4.09	2.72–4.36	0.526
Self-resolving CMV DNAemia	3.78	3.38–4.26	
TGF-β1			
CMV DNAemia	3.81	1.32–4.64	0.020
No CMV DNAemia	4.17	1.64–4.92	
CMV DNAemia preemptively treated with antivirals	3.95	1.32–4.64	0.764
Self-resolving CMV DNAemia	3.25	1.32–4.46	

Bold indicates a statistically significant difference with a *p*-value less than 0.05

CMV cytomegalovirus, CRP C-reactive protein, IP-10 interferon-inducible protein 10, sTNF-R2 soluble tumor necrosis factor receptor type 2, TGF- β 1 transforming growth factor- β 1

^amg (CRP) or pg (sTNF-R2, TGF- β 1, IP-10) \times days/l⁻¹ (CPR) or /ml⁻¹ (sTNF-R2, TGF- β 1 and IP-10)

Table 4 Peak levels of pro-inflammatory cytokines in plasma in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients with or without subsequent CMV DNAemia

Biomarker (units)/outcome	Median peak levels	Peak levels range	<i>P</i> value
CRP (mg/l)			
CMV DNAemia	45.85	8.70–294.70	0.636
No CMV DNAemia	42.90	9.40–186.70	
CMV DNAemia preemptively treated with antivirals	76.65	17.50–294.70	0.005
Self-resolving CMV DNAemia	21.70	8.70–68.00	
IP-10 (pg/ml)			
CMV DNAemia	66.29	2.52–828.29	0.262
No CMV DNAemia	99.14	8.49–2363.45	
CMV DNAemia preemptively treated with antivirals	119.38	2.52–828.29	
Self-resolving CMV DNAemia	38.46	14.46–527.13	
sTNF-R2 (pg/ml)			
CMV DNAemia	521.84	29.53–1123.91	0.301
No CMV DNAemia	619.49	148.56–1682.93	
CMV DNAemia preemptively treated with antivirals	630.35	29.53–1123.91	0.267
Self-resolving CMV DNAemia	291.26	126.52–781.20	
TGF-β1 (pg/ml)			
CMV DNAemia	438.94	1.00–2852.25	0.026
No CMV DNAemia	1423.58	5.57–4965.15	
CMV DNAemia preemptively treated with antivirals	798.89	1.00–2852.25	0.330
Self-resolving CMV DNAemia	107.05	1.00–1630.10	

Bold indicates a statistically significant difference with a *p*-value less than 0.05

CMV cytomegalovirus, CRP C-reactive protein, IP-10 interferon-γ inducible protein 10, sTNF-R2 soluble tumor necrosis factor receptor type 2, TGF-β1 transforming growth factor-β1

of aGvHD (Table 2); (4) the immunosuppression regimen used for the prevention of aGvHD (Table 2).

Discussion

A number of baseline and post-transplant clinical factors, as well as host genetic traits and immunological biomarkers have been recognized to impact on the risk of CMV DNAemia in allo-HSCT recipients [1, 16]. Here, we assessed the predictive value of plasma levels of CRP, sTNF-R2, TGF-β1, and IP-10 in anticipating the occurrence and features of CMV DNAemia in allo-HSCT recipients, which was monitored by means of a highly sensitive real-time PCR assay. The rationale for the selection of these biomarkers in our study was: (1) plasma levels of IP-10 and CRP were found to be independently associated with the presence of cytomegalovirus DNAemia and with tissue-invasive cytomegalovirus disease in the solid organ transplantation setting [11]; (2) the potential role of TGF-β1 in the pathogenesis of CMV-induced organ injury [17]; (3) the reliability of sTNF-R2 as a surrogate marker of inflammation mediated by TNF-α [18], as discussed below.

Here we show that the kinetics of TGF-β1 in plasma could be used as an ancillary parameter to anticipate the occurrence of CMV DNAemia. In effect, both TGF-β1 AUC and

peak levels were found to be significantly lower in patients who eventually developed first episodes of CMV DNAemia following engraftment and relatively early after transplantation (up to day 50 after allo-HSCT) in comparison with those who did not. In fact, TGF-β1 AUC and peak levels below optimal thresholds were independently associated with the development of CMV DNAemia. Note that patients with or without CMV DNAemia did not differ significantly in terms of demographics or baseline and post-transplant characteristics, including among the latter the immunosuppressive regimen used for the prevention of aGvHD, and the incidence of aGvHD and bacterial infections of any origin, which may conceivably impact on plasma levels of inflammatory biomarkers. In fact, the AUC log₁₀ values for absolute leukocytes and lymphocytes counts measured at the same time points than those selected for plasma biomarker measurements were comparable across comparison groups.

TGF-β1 is a multifunctional cytokine that participates in the control of cell growth and differentiation, induces fibrosis, suppresses NK and cytotoxic T-cell responses and may counteract the biological activity of certain inflammation mediators [19–21]. Regarding the latter effect, which may account for our finding, TGF-β1 can inhibit the secretion and activity of many cytokines, including TNF-α, and hamper the proliferation of macrophages and monocytes, thus preventing them from producing reactive

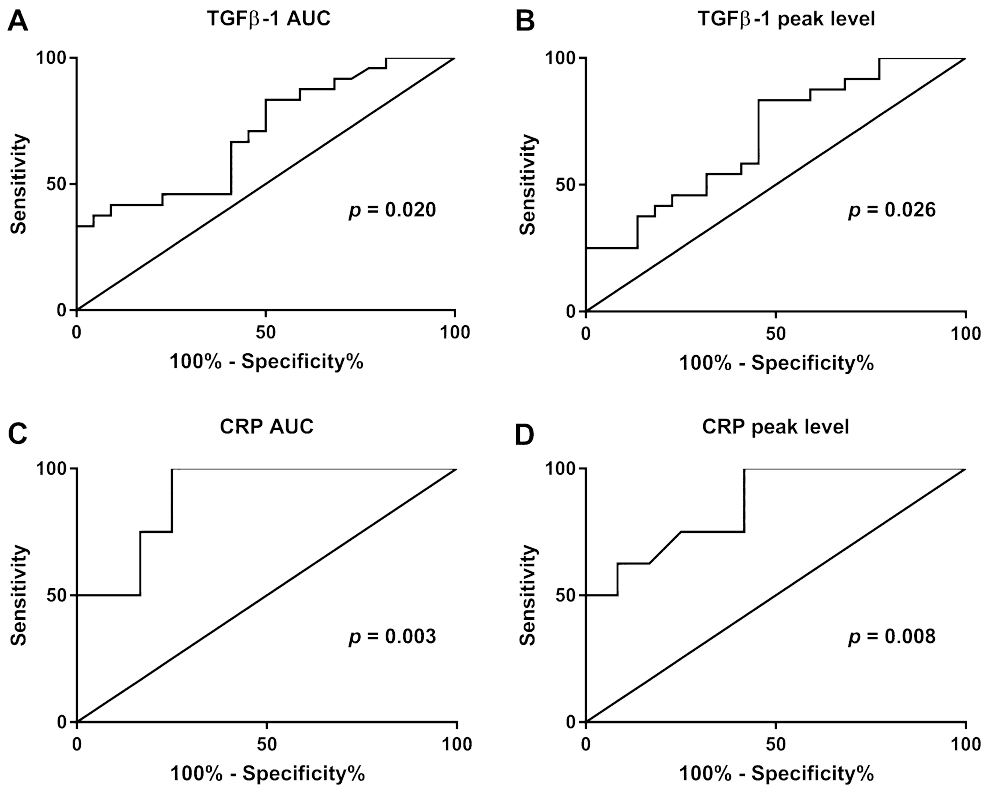


Fig. 2 Receiver operating characteristic (ROC) curves to establish the optimal cutoff of **a** TGF- β 1 area under a curve (AUC) and **b** TGF- β 1 peak level in plasma discriminating between patients subsequently developing CMV DNAemia from those who did not, and

of **c** CRP area under a curve (AUC) and **d** CRP peak level discriminating between patients who eventually developed CMV DNAemia that required preemptive antiviral therapy from those displaying self-resolving episodes

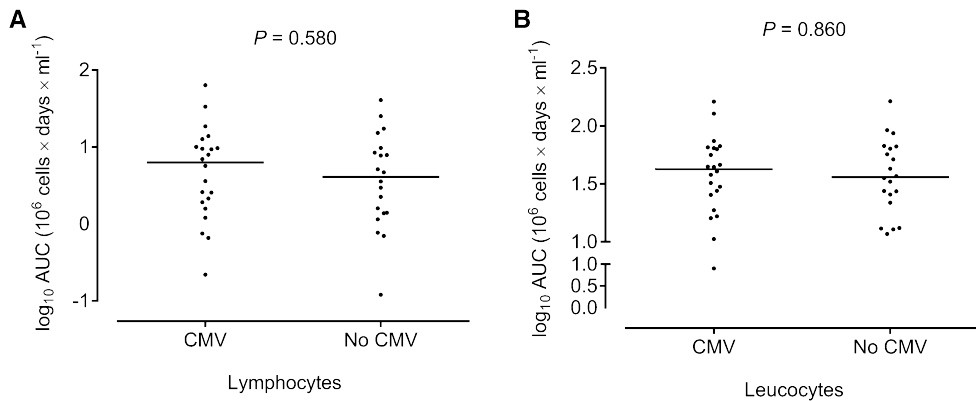


Fig. 3 Area under a curve (AUC) for \log_{10} absolute leukocyte and lymphocyte counts measured at the time points chosen for plasma biomarkers measurements. Comparative P values are shown

oxygen [e.g., superoxide (O₂⁻) and nitrogen [e.g., nitric oxide (NO)] intermediates [19–21]; in this context, both TNF- α and reactive oxygen species levels in plasma have been shown to directly correlate with risk of CMV DNAemia [8, 9, 23].

It was somewhat surprising that sTNF-R2 levels were not predictive of CMV DNAemia, given that concentrations of soluble circulating forms of TNF- α receptors (sTNFRs) are thought to reflect long-term exposure to this pro-inflammatory cytokine [18]. However, it has in fact been shown that assays measuring TNF- α are often of questionable reliability, resulting in inconsistent results. This is likely due to the presence of biological forms of TNF- α in plasma that remain undetectable because of complex formation with sTNFRs, whose dissociation rate constant appears to be assay-dependent, or monomeric conformation [24]. In line with this, failure to detect TNF- α is not uncommon in healthy subjects, whereas sTNF-R2 is systematically quantifiable [25].

CRP is an acute phase protein produced by hepatocytes and behaves as a reliable marker of systemic inflammation [26]. Increased levels of CRP in blood have been shown to occur in association with bacterial infections and aGVHD, and, ultimately, with transplant-related mortality in allo-HSCT recipients [27–29]. Nevertheless, to our knowledge, no previous link has been reported between CRP levels in plasma and active CMV infection in this clinical setting. Here, we found no association between CRP AUCs and peak levels and the occurrence of CMV DNAemia; nevertheless, both parameters appeared to be of higher magnitude in patients who developed first CMV DNAemia episodes that required PET using a relatively conservative threshold for antiviral initiation (1500 IU/ml). The low number of patients in the current cohort of CMV DNAemia requiring PET precludes drawing robust conclusions and invites further speculation as to the underlying pathophysiological mechanism on this issue. In this sense, the net state of inflammation, as inferred by plasma CRP levels, at CMV DNAemia onset may directly influence the viral rate of growth and hence the eventual need of PET.

In our view, the present study has several limitations that deserve comment. First, the low number of patients included precluded performing robust statistical analyses; second, the relative heterogeneity of patients in the cohort; third, cryopreserved rather than fresh specimens were used for analyses; nevertheless, this last is unlikely to have had an impact on our results given the stability of the measured biomarkers in frozen-stored specimens [25]; Fourth, several factors that may impact on the risk of CMV DNAemia (i.e., early CMV-specific T-cell response) [1] were not considered. In addition, the use of two different real-time PCR assays could be viewed as a limitation; however, in our experience both perform comparably in terms of sensitivity and linear range of quantitation [13].

Prospective measurement of biomarkers of inflammation and immune activation in blood have proven useful for predicting the occurrence of CMV end-organ disease in solid organ transplant recipients and guiding antiviral prophylaxis for the prevention of late-onset CMV disease in high-risk solid kidney and liver transplant recipients [10, 11, 30, 31]. In line with the previous studies [8, 9]; the data presented herein suggest that it may also find its spot in the management of CMV infection in the allo-HSCT setting. Precise risk stratification for CMV-related clinical events early after allo-HSCT may be of use in the near future for identification of patients tributary of antiviral prophylaxis with new agents (targeted prophylaxis) [3]. In this sense, peak levels of TGF- β 1 were found to be reached within this time frame. Nevertheless, it is unlikely that a single parameter, regardless of its nature may do so; on the contrary, we envision a weighted risk score incorporating immunological (including inflammatory biomarkers), genetic and clinical factors that may improve our capacity to predict CMV-related events and to individualize prevention strategies. Work addressing this issue is currently underway.

Acknowledgements Estela Giménez holds a RÍo Ortega research contract from the Carlos III Health Institute (Ref. CM16/00200). All authors declare no conflict of interest.

Funding This work was supported by a Grant from Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) from Carlos III Health Institute (15/0060).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Romero PP, 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* 10:113–134
2. Chemaly RF, Ullmann AJ, Stoelben S, Richard MP, Bornhäuser M, Groth C, Einsele H, Silverman M, Mullane KM, Brown J, Nowak H, Kölling K, Stoberneck HP, Lischka P, Zimmermann H, Rübsamen-Schaeff H, Champlin RE, Ehninger G (2014) Letermovir for cytomegalovirus prophylaxis in hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* 370:1781–1789
3. Marty FM, Ljungman P, Chemaly RF, Maertens J, Dadwal SS, Duarte RF, Haider S, Ullmann AJ, Katayama Y, Brown J, Mullane KM, Boeckh M, Blumberg EA, Einsele H, Snyderman DR, Kanda Y, DiNubile MJ, Teal VL, Wan H, Murata Y, Kartsonis NA, Leavitt RY, Badshah C (2017) Letermovir prophylaxis for cytomegalovirus in hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* 377:2433–2444
4. Söderberg-Nauclér C, Fish KN, Nelson JA (1997) Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell* 91:119–126

5. Docke WD, Prosch S, Fietze E, Kimel V, Zuckermann H, Klug C, Syrbe U, Krüger DH, von Baehr R, Volk HD (1994) Cytomegalovirus reactivation and tumor necrosis factor. *Lancet* 343:268–269
6. Fietze E, Prosch S, Reinke P, Stein J, Döcke WD, Staffa G, Löning S, Devaux S, Emmrich F, von Baehr R (1994) Cytomegalovirus infection in transplant recipients. The role of tumor necrosis factor. *Transplantation* 58:675–680
7. Reddy V, Meier-Kriesche HU, Greene S, Schold JD, Wingard JR (2005) Increased levels of tumor necrosis factor alpha are associated with an increased risk of cytomegalovirus infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transpl* 11:698–705
8. Humar A, St Louis P, Mazzulli T, McGeer A, Lipton J, Messner H, MacDonald KS (1999) Elevated serum cytokines are associated with cytomegalovirus infection and disease in bone marrow transplant recipients. *J Infect Dis* 179:484–488
9. Gimeno C, Solano C, Latorre JC, Hernández-Boluda JC, Clari MA, Remigia MJ, Furió S, Calabuig M, Tormo N, Navarro D (2008) Quantification of DNA in plasma by an automated real-time PCR assay (cytomegalovirus PCR kit) for surveillance of active cytomegalovirus infection and guidance of preemptive therapy for allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *J Clin Microbiol* 46:3311–3318
10. Rollag H, Asberg A, Ueland T, Hartmann A, Jardine AG, Humar A, Pescovitz MD, Bignamini AA, Aukrust P (2012) Treatment of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients: markers of inflammation as predictors of outcome. *Transplantation* 94:1060–1065
11. Rollag H, Ueland T, Asberg A, Hartmann A, Jardine AG, Humar A, Pescovitz MD, Bignamini AA, Aukrust P (2013) Characterization of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients by markers of inflammation in plasma. *PLoS One* 8:e60767
12. Clari MA, Bravo D, Costa E, Muñoz-Cobo B, Solano C, Remigia MJ, Gimenez E, Benmarzouk-Hidalgo OJ, Perez-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. *Diag Microbiol Infect Dis* 75:207–209
13. Solano C, Muñoz-Cobo B, Giménez E, Remigia MJ, Amat P, Clari MA, Bravo D, Benet I, Montoro J, Navarro D (2013) Pre-emptive antiviral therapy for active CMV infection in adult allo-SCT patients guided by plasma CMV DNAemia quantitation using a real-time PCR assay: clinical experience at a single center. *Bone Marrow Transpl* 48:1010–1012
14. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner C, Neiman P, Clift R, Lerner K, Thomas E (1974) Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* 18:295–304
15. Giménez E, Solano C, Vinuesa V, Hernández-Boluda JC, Albert E, Pérez A, Piñana JL, Navarro D (2018) Cytomegalovirus DNAemia burden and mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: an area under a curve-based investigational approach. *Clin Infect Dis* 67:805–807
16. Navarro D (2016) Expanding role of cytomegalovirus as a human pathogen. *J Med Virol* 88:1103–1112
17. Shimamura M, Murphy-Ullrich JE, Britt WJ (2010) Human cytomegalovirus induces TGF- β 1 activation in renal tubular epithelial cells after epithelial-to-mesenchymal transition. *PLoS Pathog* 6(11):e1001170
18. Gohda T, Niewczasz MA, Ficociello LH, Ficociello LH, Walker WH, Skupien J, Rosetti F, Cullere X, Johnson AC, Crabtree G, Smiles AM, Mayadas TN, Warram JH, Krolewski AS (2012) Circulating TNF receptors 1 and 2 predict stage 3 CKD in type 1 diabetes. *J Am Soc Nephrol* 23:516–524
19. Letterio JJ, Roberts AB (1998) Regulation of immune responses by TGF- β . *Annu Rev Immunol* 16:137–161
20. Blobe GC, Schieman WP, Lodish HF (2000) Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 342:1350–1358
21. Wahl SM (2007) Transforming growth factor- β : innately bipolar. *Curr Opin Immunol* 19:55–62
22. Prud'homme GJ (2007) Pathobiology of transforming growth factor beta in cancer, fibrosis and immunologic disease, and therapeutic considerations. *Lab Invest* 87:1077–1079
23. Talaya A, Solano C, Giménez E, García Giménez JL, Vinuesa V, Alberola J, Pallardó FV, Navarro D (2017) Assessing the risk of cytomegalovirus DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients by monitoring oxidative-stress markers in plasma. *J Gen Virol* 98:1855–1863
24. Corti A, Poiesi C, Merli S, Cassani G (1994) Tumor necrosis factor (TNF) alpha quantification by ELISA and bioassay: effects of TNF alpha-soluble TNF receptor (p55) complex dissociation during assay incubations. *J Immunol Methods* 177:191–198
25. Aziz N, Nishanian P, Mitsuyasu R, Detels R, Fahey JL (1999) Variables that affect assays for plasma cytokines and soluble activation markers. *Clin Diagn Lab Immunol* 6:89–95
26. Schultz DR, Arnold PI (1990) Properties of four acute phase proteins: C-reactive protein, serum amyloid A protein, alpha 1-acid glycoprotein and fibrinogen. *Sem Arthritis Rheum* 20:129–147
27. Schots R, Kaufman L, Van Riet I, Lacor P, Trullemans F, De Waele M, Van Camp B (1998) Monitoring of C-reactive protein after allogeneic bone marrow transplantation identifies patients at risk of severe transplant-related complications and mortality. *Bone Marrow Transpl* 22:79–85
28. Schots R, Van Riet I, Othman TB, Trullemans F, De Waele M, Van Camp B, Kaufman L (2002) An early increase in serum levels of C-reactive protein is an independent risk factor for the occurrence of major complications and 100-day transplant-related mortality after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transpl* 30:441–446
29. Schots R, Kaufman L, Van Riet I, Ben Othman T, De Waele M, Van Camp B, Demanet C (2003) Proinflammatory cytokines and their role in the development of major transplant-related complications in the early phase after allogeneic bone marrow transplantation. *Leukemia* 17:1150–1156
30. Weseslindtner L, Görzer I, Küng E, Roedl K, Kaksch P, Klepetko W, Puchhammer-Stöckl E (2014) High CXCL-16 levels correlate with symptomatic disease in lung transplant recipients with human cytomegalovirus replication in the allograft. *Am J Transpl* 14:2406–2411
31. Limaye AP, La Rosa C, Longmate J, Diamond DJ (2016) Plasma IL-10 levels to guide antiviral prophylaxis prevention of late-onset cytomegalovirus disease, in high risk solid kidney and liver transplant recipients. *Transplantation* 100:210–216

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



An investigation of the utility of plasma *Cytomegalovirus* (CMV) microRNA detection to predict CMV DNAemia in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients

Alberto Talaya¹ · Estela Giménez¹ · María Jesús Pascual² · Beatriz Gago² · José Luis Piñana³ · Juan Carlos Hernández-Boluda³ · Lourdes Vázquez⁴ · Magdalena García⁴ · David Serrano⁵ · Marta Hernández⁵ · Eliseo Albert¹ · Carlos Solano^{3,6} · David Navarro^{1,7}

Received: 4 May 2019 / Accepted: 26 August 2019 / Published online: 3 September 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Precise identification of patients at highest risk for developing *Cytomegalovirus* (CMV) DNAemia may improve CMV infection management in the allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) setting. Here, we studied the potential use of detecting free CMV micro(mi)RNAs circulating in plasma for predicting CMV DNAemia in this clinical scenario. A total of 62 adult allo-HSCT recipients were included in this prospective observational multicenter study. Plasma CMV DNA load was monitored using the CMV RealTime CMV PCR (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA). Detection of mature CMV miRNAs in plasma drawn by days + 7, + 14 and + 30 after allo-HSCT was performed using the miScript PCR System (Qiagen, Hilden, Germany). Assays could be optimized for five out of the seven targeted CMV miRNAs: UL36-5p, US33-5p, UL148D, UL22A-5p and UL112-3p. Of the 62 patients included in the study, 42 developed a first episode of CMV DNAemia at a median of 35 days after allo-HSCT. All targeted CMV miRNA were detected early after transplantation, with CMV miRNA US33-5p and UL112-3p the most commonly found species at any time point; nevertheless, neither the detection rate of CMV miRNAs nor their abundance allowed discrimination between patients with subsequent CMV DNAemia and those with no CMV DNAemia. The data presented herein do not support any predictive utility of these CMV miRNAs for first episodes of CMV DNAemia in a cohort consisting primarily of allo-HSCT patients receiving haploidentical allografts.

Keywords *Cytomegalovirus* (CMV) · CMV DNAemia · Plasma CMV miRNA · Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT)

Introduction

Cytomegalovirus (CMV) DNAemia develops frequently following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) [1]. Administration of antivirals with intrinsic anti-CMV activity upon detection of a predefined CMV DNA load in blood, known as preemptive antiviral

Edited by: Matthias J. Reddehase.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00430-019-00632-7>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ David Navarro
david.navarro@uv.es

¹ Microbiology Service, INCLIVA Research Institute, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain

² Hematology Service, Hospital Regional Universitario, Málaga, Spain

³ Hematology Service, INCLIVA Research Institute, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain

⁴ Hematology Service, Hospital Clínico Universitario, Salamanca, Spain

⁵ Hematology Service, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

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

⁷ Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Av. Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia, Spain

therapy, is currently the upfront strategy to prevent CMV end-organ disease in this clinical setting [1]. The advent of new antivirals with potent anti-CMV effect and good safety profiles has renewed interest in anti-CMV prophylaxis as a first-line strategy for minimizing the impact of CMV-related clinical events on allo-HSCT recipient survival [2, 3]. In this context, the availability of predictive biomarkers for CMV DNAemia may help personalize antiviral prophylaxis prescription, targeting only patients at highest risk.

MicroRNAs (miRNAs) are short (~22 nucleotide in length) non-coding RNAs incorporated within the multi-protein RNA-induced silencing complex (RISC), that direct the RISC complex to messenger RNAs (mRNAs) through partially complementary sequences usually located within the 3' untranslated region (3' UTR) and nucleotides 2–8 (the seed sequence) of the miRNAs [4, 5]. Interaction between the RISC complex and the target mRNA leads to translational repression through several mechanisms [4, 5]. CMV encodes at least 26 mature miRNAs (www.mirbase.org, release-21) [see 6 for review], which are expressed during the lytic virus cycle as well as in latently infected cells, and target both host and viral mRNA transcripts [6]. CMV miRNAs are thought to regulate viral gene expression and manipulate cellular signaling pathways, likely playing a critical role in modulating the latent and lytic viral cell cycles and promoting virus immune evasion [7–9].

Evidence has been provided that free circulating CMV miRNA levels may be associated with certain virologic and clinical outcomes in both solid organ transplant recipients and in the context of congenital CMV infection [10, 11]. To our knowledge, the potential clinical value of CMV miRNA detection for CMV infection management in allo-HSCT recipients has not been explored.

CMV viremia in immunosuppressed individuals is thought to follow virus replication in organ and tissue sites [1, 12, 13]. In turn, productively CMV-infected cells are known to generate and release viral miRNAs soon after infection, even before viral DNA synthesis occurs [14], which may gain access to the blood compartment. On the basis of this evidence, we hypothesized that the presence of CMV miRNA in plasma may anticipate viral DNA (CMV DNAemia) in allo-HSCT patients.

Materials and methods

Patients

A total of 62 consecutive adult allo-HSCT recipients were included in this prospective observational multicenter study. The patients underwent T-cell replete allo-HSCT at the Hematology Service of the Hospital Regional Universitario, Málaga ($n = 29$), Hospital Clínico Universitario,

Valencia ($n = 14$), Hospital General Universitario, Salamanca ($n = 11$) and Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid ($n = 8$), between December 2015 and May 2018. The cohort included mostly patients undergoing haploidentical allo-HSCT with post-transplant cyclophosphamide. The median age of patients at the time of allo-HSCT was 56 years (range, 24–73 years). Relevant patient demographic, baseline and post-transplant clinical data are shown in Table 1. The study period comprised the first 100 days after allo-HSCT. This study was approved by the Hospital Clínico Fundación INCLIVA Ethics Committee. Informed consent was signed by all participants.

Table 1 Demographic and clinical characteristics of study patients

Parameter	No. of patients (%)
Sex	
Male	39 (62.9)
Female	23 (37.1)
Underlying disease	
Acute leukemia	24 (38.7)
Chronic leukemia	4 (6.5)
Lymphoma	17 (27.4)
Myelodysplastic syndrome/myelofibrosis	17 (27.4)
HLA matching	
Matched	15 (24.2)
Mismatched	47 (75.8)
Haploidentical	44 (71)
Donor type	
Related	52 (83.9%)
Unrelated	10 (16.1%)
Stem cell source	
Peripheral blood	56 (90.3%)
Bone marrow	6 (9.7%)
Conditioning regimen	
Reduced intensity	43 (69.4%)
Standard intensity	19 (30.6%)
Graft vs. host disease prophylaxis	
Regimen with cyclophosphamide	53 (85.5%)
Regimen with cyclosporin A	5 (8.1%)
Regimen with sirolimus	4 (6.5%)
CMV serostatus	
D +/R +	33 (53.2%)
D +/R –	6 (9.7%)
D – /R +	23 (37.1%)
Acute graft vs host disease	
Grade 0–I	40 (64.5%)
Grade II–IV	22 (35.5%)

CMV Cytomegalovirus, HLA human leukocyte antigen, D donor, R recipient

Management of active CMV infection

Plasma CMV DNA load was monitored using the CMV RealTime CMV PCR (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA) at all participating centers. The limit of detection and quantitation of the assay was approximately 31.5 IU/ml (95% C.I.) [15]. CMV DNA monitoring was conducted on an approximately weekly basis through day + 100, as per participating center protocol.

Detection of CMV miRNA in plasma

Detection of mature CMV miRNAs in plasma was performed using the miScript PCR System (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions. Cryopreserved (−80 °C), never-thawed, leftover plasma specimens primarily used for CMV DNA quantitation at days + 7, + 14 and + 30, were used for the analyses. Briefly, total miRNA from plasma specimens (200 µl) was extracted using the miRNeasy Serum/Plasma Kit. Reverse transcription of mature CMV miRNA was performed using Hispec Buffer. CMV miRNA-specific primers (miScript primer Assay, from Qiagen) were designed using nucleotide sequences annotated on the v11.0 release from miR-Base (Supplementary Table 1). CMV miRNAs were then quantified by SYBR Green-based real-time PCR using the miScript SYBR Green PCR Kit on the ABI Prism 7500 real-time PCR system (Applied Biosciences). Each sample was spiked with 1.6×10^8 copies/µl of *C. elegans* smiR-39 prior to extraction for normalization across samples and to monitor RNA recovery and reverse transcription efficiency. MiRNA hsa-let-7i was used as endogenous miRNA for controlling miRNA yield across samples, as it can be detected in plasma from healthy patients. This endogenous control served as well for relative quantification of target miRNA. In addition, a reverse transcription control (miRTC) was included in each sample. We set the cutoff for “positivity” of each assay by determining background signals in consecutive plasma specimens from six CMV D-/R-patients (three specimens per patient), drawn within the same time window than that in study patients. Cycle threshold values (C_T s) ≥ 40 were deemed to represent nonspecific signals. In addition, melting curve analyses were performed for each miRNA in every run to prove the specificity of the amplifications.

Definitions

CMV DNAemia was defined as detection of CMV DNA at any level in one or more plasma specimens. Acute graft-versus-host disease (aGvHD) was diagnosed and graded as previously reported [16].

Statistical analysis

Differences between medians were compared using the Mann–Whitney *U* test (for two independent variables). Qualitative variables were compared using the Chi square test. Two-sided exact *P* values were reported. A *P* value < 0.05 was considered statistically significant. These statistical analyses were performed using SPSS version 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

Results

CMV DNAemia in the study population

Of the 62 patients included in the study, 42 developed a first episode of CMV DNAemia at a median of 35 days after allo-HSCT (range, 15–90 days). Median initial and peak CMV DNA loads were 152 IU/ml (range, 30.5–1707 IU/ml) and 1224 IU/ml (range, 46–82,864 IU/ml), respectively. In this cohort, patients with or without CMV DNAemia did not differ regarding sex, underlying disease, type of allograft, source of hematopoietic stem cells, conditioning regimen, acute GvHD prophylaxis regimen, paired donor/recipient CMV serostatus or cumulative incidence of aGvHD (Table 2).

Plasma CMV miRNAs in patients with or without subsequent CMV DNAemia

A total of 163 plasma specimens were available for CMV miRNA detection. These were obtained by day + 7 (58 patients), day + 14 (54 patients) and day + 30 (46 patients) following allo-HSCT. For patients who eventually developed CMV DNAemia, only specimens drawn before documentation of this event were considered. Assays could be optimized for five out of the seven targeted CMV miRNA (CMV miRNA UL36-5p, CMV miRNA US33-5p, CMV miRNA UL148D, CMV miRNA UL22A-5p and CMV miRNA UL112-3p). Assays targeting CMV US25-1-5p and CMV miRNA US4-5p failed to meet the predefined validation criterion (specificity) and were thus excluded from the study without further refinement.

US33-5p and UL112-3p were the most frequently detected CMV miRNAs species at any time point, both in patients with subsequent CMV DNAemia (in 66.6% and 69.0% of patients respectively) and without (in 75% and 65% of patients, respectively). As shown in Table 3, the overall detection rate of CMV miRNAs (any number of species at any time point) was not significantly different in patients who went on to develop CMV DNAemia throughout the study period compared to those who did not; interestingly, this was irrespective of donor/recipient paired

Table 2 Demographic and clinical characteristics of patients with or without CMV DNAemia

Parameter	CMV DNAemia (% of patients)		
	Yes (n=42)	No (n=20)	P value
Sex			
Male	25 (64.1)	14 (35.9)	0.425
Female	17 (73.9)	6 (26.1)	
Underlying disease			
Acute leukemia	15 (62.5)	9 (37.5)	0.147
Chronic leukemia	3 (75.0)	1 (25.0)	
Lymphoma	9 (52.9)	8 (47.1)	
Myelodysplastic syndrome/myelofibrosis	15 (88.2)	2 (11.8)	
HLA matching			
Matched	11 (73.3)	4 (26.7)	0.371
Haploidentical	28 (63.6)	16 (36.4)	
Mismatched	3 (100)	0 (0)	
Donor type			
Related	35 (67.3)	17 (32.7)	0.686
Unrelated	7 (70.0)	3 (30.0)	
Stem cell source			
Peripheral blood	36 (64.3)	20 (35.7)	0.075
Bone marrow	6 (100)	0 (0)	
Conditioning regimen			
Reduced intensity	29 (67.4)	14 (32.6)	0.939
Standard intensity	13 (68.4)	6 (31.6)	
Graft vs. host disease prophylaxis			
Regimen with cyclophosphamide	34 (64.2)	19 (35.8)	0.248
Regimen with cyclosporin A	5 (100)	0 (0)	
Regimen with sirolimus	3 (75.0)	1 (25.0)	
CMV serostatus			
D+/R+	24 (72.7)	9 (27.3)	0.160
D+/R-	2 (33.3)	4 (66.7)	
D-/R+	16 (69.6)	7 (30.4)	
Acute graft vs. host disease			
Grades 0–I	28 (70.0)	12 (30.0)	0.608
Grades II–IV	14 (63.6)	8 (36.4)	

CMV Cytomegalovirus, HLA human leukocyte antigen, D donor, R recipient

Table 3 Overall rate of detection of CMV miRNA species in patients with or without subsequent CMV DNAemia

Number of CMV miRNAs detected at one or more time points	CMV DNAemia (number of patients)		P value
	Yes (42)	No (20)	
≥ 1	37	19	0.390
≥ 2	28	12	0.608
≥ 3	17	8	0.971
≥ 4	6	4	0.567

CMV Cytomegalovirus, miRNA microRNA

CMV serostatus ($P=0.395$). Neither were there differences with respect to individual CMV miRNA species at different evaluable time points between patients with or without subsequent CMV DNAemia (Table 4).

CMV miRNA load, as inferred by the PCR C_T s, did not vary between patients with subsequent CMV DNAemia and those with no documented CMV DNAemia at any of the evaluable time points throughout the study period. Data for CMV miRNAs PCR C_T s at different time points across comparison groups (each group including at least five patients) are shown in Table 5.

Of interest, among patients who developed CMV DNAemia, detection of CMV miRNA US33-5p and UL112-3 at any time point was associated with higher initial CMV DNA loads (for US33-5p miRNA species, median 2.18 \log_{10} IU/

Table 4 Detection of individual CMV miRNA species at different time points in patients with or without subsequent CMV DNAemia

CMV miRNA species/day after allo-HSCT	CMV DNAemia (number of patients)		P value
	Yes (total number of patients evaluated)	No (total number of patients evaluated)	
UL36-5p			
+7	1 (41)	1 (17)	0.513
+14	3 (35)	3 (19)	0.420
+30	0 (28)	0 (18)	1.0
At any time point	4 (42)	3 (20)	0.624
US33-5p			
+7	14 (41)	8 (17)	0.356
+14	20 (35)	13 (19)	0.417
+30	1 (28)	1 (18)	0.747
At any time point	28 (42)	15 (20)	0.506
UL148D			
+7	13 (41)	9 (17)	0.129
+14	0 (35)	0 (35)	1.0
+30	0 (28)	1 (18)	0.207
At any time point	13 (42)	9 (20)	0.564
UL22A-5p			
+7	7 (41)	5 (17)	0.291
+14	6 (35)	3 (19)	0.899
+30	0 (28)	0 (18)	1.0
At any time point	12 (42)	5 (20)	0.629
UL112-3p			
+7	18 (41)	9 (17)	0.530
+14	20 (35)	9 (19)	0.492
+30	1 (28)	0 (18)	0.418
At any time point	29 (42)	13 (20)	0.750

CMV Cytomegalovirus, miRNA microRNA

Table 5 CMV miRNA load at different time points in patients with or without subsequent CMV DNAemia

CMV miRNA species/day after allo-HSCT	CMV miRNA PCR cycle threshold (C _T), median (range)		P value
	Patients with CMV DNAemia	Patients without CMV DNAemia	
US33-5p			
+7	35.2 (30.9–36.1)	35.2 (33.0–35.8)	0.631
+14	35.8 (32.8–37.4)	35.7 (33.0–37.0)	0.825
UL148D			
+7	36.3 (34.8–37.3)	36.2 (34.8–36.6)	0.825
UL22A-5p			
+7	36.9 (35.9–38.7)	36.2 (34.8–36.6)	0.227
UL112-3p			
+7	36.9 (35.9–38.7)	36.3 (35.4–37.2)	0.192
+14	36.4 (35.9–38.4)	35.9 (34.9–36.7)	0.291

CMV Cytomegalovirus, miRNA microRNA

ml vs. 1.98 log₁₀ IU/ml in patients with or without detectable miRNA; *P* = 0.019; for UL112-3, median 2.19 log₁₀ IU/ml and 1.97 log₁₀ IU/ml, respectively; *P* = 0.036).

Discussion

Accurate identification of allo-HSCT recipients at highest risk for developing CMV DNAemia may improve CMV infection management in this clinical scenario, in particular, it may help to rationalize the use of new prophylactic antivirals (targeted prophylaxis) [1–3]. We previously showed that host genetic and immunological traits, as well as several metabolomic, oxidative stress-related and cytokine biomarkers may permit risk stratification with variable predictive values [1, 17–19]. Here, we investigated whether qualitative detection and/or quantitation of free circulating CMV miRNAs in plasma could anticipate the occurrence of CMV DNAemia in the allo-HSCT setting.

Among the diverse range of CMV miRNAs characterized thus far [see for 6–9 for review], we selected a few known to be abundantly expressed in productively infected cells soon or very soon after infection [14, 20–25], including UL36-5p, US33-5p, UL148D, UL22A-5p, UL112-3p, US25-1-5p US4-5p. Among these, detection of CMV miRNA UL 22A-5p at baseline was shown to independently predict recurrence of CMV viremia in solid organ recipients with preceding symptomatic CMV disease upon discontinuation of antiviral therapy [10]. As assays targeting CMV miRNA US25-1-5p US4-5p could not be standardized in the current study, only data on the remaining miRNA species are presented and discussed here.

In our study, all targeted CMV miRNAs were detected soon after transplantation, irrespective of the donor/recipient paired CMV serostatus (not shown), although with variable frequency. CMV miRNA US33-5p and UL112-3p were the most commonly detected CMV miRNAs species at any time point, most notably by day + 15 after allo-HSCT (more than two-thirds of patients); nevertheless, neither the detection rate of CMV miRNAs nor their plasma load allowed us to discriminate between patients with subsequent CMV DNAemia and those with no CMV DNAemia. As most patients in our series were CMV seropositive at the time of transplantation, these data support the assumption that CMV reactivation in tissues or mucosal sites occurs frequently irrespective of whether or not viremia ensues.

Interestingly, detection of CMV miRNA US33-5p and UL112-3 predicted higher virus doubling times during CMV DNAemia episodes, as inferred by the magnitude of the CMV DNA load at the time of the first positive PCR test [26]. The limited number of spontaneously resolving episodes in this series (*n* = 9) and the use of different CMV DNA thresholds for initiation of antiviral therapy across

participating centers (not shown) precluded a meaningful analysis on whether detection or quantitation of CMV miRNAs could predict other features of CMV DNAemia episodes (i.e., CMV DNA peak levels within episodes or their duration).

In addition to its relatively small size, the current study has certain limitations which, as yet, preclude ruling out plasma CMV miRNA detection/quantitation as a useful tool for anticipating CMV DNAemia. First, we focused on detecting free circulating plasma CMV miRNAs, and thus no attempt was made to screen for ones potentially carried within extracellular vesicles [27, 28], which could also be released from productively infected cells early after virus penetration [6–9]. Second, frozen leftover specimens were used for the analyses, but although miRNA degradation in some specimens could not be ruled out, in our view, cryopreservation is unlikely to have had any impact on the results. Third, a number of CMV miRNA species, whose detection may be proven useful in the future, were not targeted in the current study. Fourth, the time elapsed between the last CMV miRNA analysis and CMV DNAemia diagnosis might have been too long in a number of patients (only samples obtained by days + 7, + 14 and + 30 after allo-HSCT were screened for presence of viral CMV miRNAs). Fifth, the sensitivity (limit of detection) of the different assays was not determined, so that miRNA species present at very low amounts could have been missed. Nevertheless, the commercially available miScript miRNA system has been optimized for the detection and quantification of trace amounts of mature miRNA in biological fluids.

To our knowledge, no previous study has investigated the potential clinical value of CMV miRNA detection/quantitation for predicting the occurrence of CMV DNAemia in any clinical setting. The data presented herein are inconsistent with the hypothesis that the targeted CMV miRNA species might help predict first episodes of CMV DNAemia in a cohort consisting primarily of allo-HSCT patients receiving haploidentical allografts. Further studies must be conducted to determine whether this can be extrapolated to recurrent episodes of CMV DNAemia and to all allo-HSCT modalities.

Acknowledgements Estela Giménez holds a Juan Rodés research contract from the Carlos III Health Institute. Eliseo Albert holds a Río Ortega research contract from the Carlos III Health Institute.

Funding This work was supported by a Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) grant from Carlos III Health Institute (15/0060).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Romero PP, 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* 10:113–134
- Chemaly RF, Ullmann AJ, Stoelben S, Richard MP, Bornhäuser M, Groth C, Einsele H, Silverman M, Mullane KM, Brown J, Nowak H, Kölling K, Stoberneck HP, Lischka P, Zimmermann H, Rübsamen-Schaeff H, Champlin RE, Ehninger G (2014) Letermovir for *Cytomegalovirus* prophylaxis in hematopoietic-cell transplantation. *New Engl J Med* 370:1781–1789
- Marty FM, Ljungman P, Chemaly RF, Maertens J, Dadwal SS, Duarte RF, Haider S, Ullmann AJ, Katayama Y, Brown J, Mullane KM, Boeckh M, Blumberg EA, Einsele H, Snyderman DR, Kanda Y, DiNubile MJ, Teal VL, Wan H, Murata Y, Kartsonis NA, Leavitt RY, Badshah C (2017) Letermovir prophylaxis for *Cytomegalovirus* in hematopoietic-cell transplantation. *New Engl J Med* 377:2433–2444
- Filipowicz W, Bhattacharyya S, Sonenberg N (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9:102–114
- Ha M, Kim VN (2014) Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:509–524
- Diggins NL, Hancock MH (2018) HCMV miRNA targets reveal important cellular pathways for viral replication, latency, and reactivation. *Noncoding RNA* 4(4):29
- Ng KR, Li JY, Gleadle JM (2015) Human *Cytomegalovirus* encoded microRNAs: hitting targets. *Expert Rev Anti Infect Ther* 13:1469–1479
- Hook L, Hancock M, Landais I, Grabski R, Britt W, Nelson JA (2014) *Cytomegalovirus* microRNAs. *Curr Opin Virol* 7:40–46
- Grey F (2015) Role of microRNAs in herpesvirus latency and persistence. *J Gen Virol* 96:739–751
- Lisboa LF, Egli A, O'Shea D, Åsberg A, Hartmann A, Rollag H, Pang XL, Tyrrell DL, Kumar D, Humar A (2015) Hcmv-miR-UL22A-5p: a biomarker in transplantation with broad impact on host gene expression and potential immunological implications. *Am J Transplant* 15:1893–1902
- Kawano Y, Kawada J, Kamiya Y, Suzuki M, Torii Y, Kimura H, Ito Y (2016) Analysis of circulating human and viral microRNAs in patients with congenital *Cytomegalovirus* infection. *J Perinatol* 36:1101–1105
- Reddehase MJ, Balthesen M, Rapp M, Jonjić S, Pavić I, Koszinowski UH (1994) The conditions of primary infection define the load of latent viral genome in organs and the risk of recurrent *Cytomegalovirus* disease. *J Exp Med* 179:185–193
- Sacher T, Andrassy J, Kalnins A, Dölken L, Jordan S, Podlech J, Ruzsics Z, Jauch K-W, Reddehase MJ, Koszinowski UH (2011) Shedding light on the elusive role of endothelial cells in *Cytomegalovirus* dissemination. *PLoS Pathog* 7:e1002366
- Grey F, Antoniewicz A, Allen E, Saugstad J, McShea A, Carington JC, Nelson J (2005) Identification and characterization of human *Cytomegalovirus*-encoded microRNAs. *J Virol* 79:12095–12099
- Clari MA, Bravo D, Costa E, Munoz-Cobo B, Solano C, Remigia MJ, Gimenez E, Benmarzouk-Hidalgo OJ, Perez-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
- Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner C, Neiman P, Clift R, Lerner K, Thomas E (1974) Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* 18:295–304

17. Talaya A, Solano C, Giménez E, García Giménez JL, Vinuesa V, Alberola J, Pallardó FV, Navarro D (2017) Assessing the risk of *Cytomegalovirus* DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients by monitoring oxidative-stress markers in plasma. *J Gen Virol* 98:1855–1863
18. Monleón D, Talaya A, Giménez E, Vinuesa V, Morales JM, Hernández-Boluda JC, Pérez A, Piñana JL, Solano C, Navarro D (2018) Validation of a plasma metabolomics model that allows anticipation of the occurrence of *Cytomegalovirus* DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Med Microbiol*. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000746>
19. Talaya A, Giménez E, Vinuesa V, Pérez A, Amat P, Piñana JL, Albert E, Hernández-Boluda JC, Solano C, Navarro D (2019) Kinetics of inflammatory biomarkers in plasma predict the occurrence and features of *Cytomegalovirus* DNAemia episodes in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Med Microbiol Immunol* 1:2. <https://doi.org/10.1007/s00430-019-00594-w>
20. Stark TJ, Arnold JD, Spector DH, Yeo GW (2012) High-resolution profiling and analysis of viral and host small RNAs during human *Cytomegalovirus* infection. *J Virol* 86:226–235
21. Dunn W, Chou C, Li H, Hai R, Patterson D, Stolz V, Zhu H, Liu F (2003) Functional profiling of a human *Cytomegalovirus* genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:14223–14228
22. Dunn W, Trang P, Zhong Q, Yang E, van Belle C, Liu F (2005) Human *Cytomegalovirus* expresses novel microRNAs during productive viral infection. *Cell Microbiol* 7:1684–1695
23. Stern-Ginossar N, Elefant N, Zimmermann A, Wolf DG, Saleh N, Biton M, Horwitz E, Prokocimer Z, Prichard M, Hahn G, Goldman-Wohl D, Greenfield C, Yagel S, Hengel H, Altuvia Y, Margalit H, Mandelboim O (2007) Host immune system gene targeting by a viral miRNA. *Science* 317:376–381
24. Stern-Ginossar N, Saleh N, Goldberg MD, Prichard M, Wolf DG, Mandelboim O (2009) Analysis of human *Cytomegalovirus*-encoded microRNA activity during infection. *J Virol* 83:10684–10693
25. Murphy E, Vanicek J, Robins H, Shenk T, Levine AJ (2008) Suppression of immediate-early viral gene expression by herpesvirus-coded microRNAs: implications for latency. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:5453–5458
26. Cromer D, Tey SK, Khanna R, Davenport MP (2013) Estimating *Cytomegalovirus* growth rates by using only a single point. *J Virol* 87:3376–3381
27. Huang X, Yuan T, Tschannen M, Sun Z, Jacob H, Du M, Liang M, Dittmar RL, Liu Y, Liang M, Kohli M, Thibodeau SN, Boardman L, Wang L (2013) Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics* 14:319
28. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO (2007) Exosome mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9:654–659

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.