

# TESIS DOCTORAL

## INMUNIDAD CELULAR Y HUMORAL PRETRASPLANTE ESPECÍFICA DE CITOMEGALOVIRUS EN RECEPTORES DE TRASPLANTE DE ÓRGANO SÓLIDO DE RIESGO INTERMEDIO DE INFECCIÓN POR CITOMEGALOVIRUS

**Alejandro Molina Ortega**

Licenciado en Biotecnología



**Directores de Tesis**

Dra. M<sup>a</sup> Elisa Cordero Matía, Dra. M<sup>a</sup> Pilar Pérez Romero

**Tutor de Tesis**

Prof. Jerónimo Pachón Díaz

Departamento de Medicina

Universidad de Sevilla



La Dra. Doña M<sup>a</sup> Elisa Cordero Matía, Facultativo Especialista de Área de la Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva de los Hospitales Universitarios Virgen del Rocío y Virgen Macarena, la Dra. Doña M<sup>a</sup> Pilar Pérez Romero, Científico Titular del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III, y el Prof. Don Jerónimo Pachón Díaz, Catedrático de Medicina de la Universidad de Sevilla,

### CERTIFICAN

Que el trabajo de investigación que lleva por título **“Inmunidad celular y humoral pretrasplante específica de citomegalovirus en receptores de trasplante de órgano sólido de riesgo intermedio de infección por citomegalovirus”** ha sido realizado bajo su dirección por el Licenciado Don Alejandro Molina Ortega, y reúne las condiciones necesarias para ser leído y defendido como Tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Para que conste a los efectos oportunos, expiden la presente certificación en Sevilla, a 19 de Septiembre de 2018.

  
M<sup>a</sup> Elisa Cordero Matía  
Co-Directora

PEREZ ROMERO  
MARIA DEL  
PILAR -  
27315077R  
Firmado digitalmente  
por PEREZ ROMERO  
MARIA DEL PILAR -  
27315077R  
Fecha: 2018.09.18  
12:42:31 +02'00'

M<sup>a</sup> Pilar Pérez Romero

Co-Directora

  
Jerónimo Pachón Díaz

Tutor

## **FINANCIACIÓN DE LA TESIS**

Subprograma de proyectos de Investigación en Salud, correspondiente a la convocatoria 2014 de concesión de ayudas de la acción estratégica de salud (número de expediente PI14/00165), Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad.

# PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DE LA TESIS

## **Artículos:**

**Impact of pre-transplant CMV-specific T-cell immune response in the control of CMV infection after solid organ transplantation: a prospective cohort study.** Molina-Ortega, Alejandro; Martín-Gandul, Cecilia; Mena-Romo, Juan; Rodríguez-Hernández, María J; Suñer, Marta; Bernal, Carmen; Sánchez, Magdalena; Sánchez-Céspedes, Javier; Pérez-Romero, Pilar; Cordero Elisa.

Manuscrito en segunda revisión, remitido a la revista *Clinical Microbiology and Infection*.

**Impact of pre-transplant antibodies neutralizing epithelial cell infection in solid organ transplant recipients at intermediate risk for CMV infection.** Alejandro Molina-Ortega, Cecilia Martín-Gandul, Marta Suñer, Belén Gutiérrez-Gutiérrez, Juan Damián Mena-Romo, Pilar Blanco-Lobo, María Jesús Rodríguez-Hernández, Carmen Bernal, Magdalena Sánchez, Javier Sánchez-Céspedes, Pilar Pérez Romero, Elisa Cordero.

Manuscrito enviado a *Clinical Infectious Diseases*.

**Kinetic of the CMV-specific T-Cell Immune Response and CMV infection in CMV-seropositive kidney transplant recipients receiving anti-thymocyte globulin induction therapy: A pilot study.** Martín-Gandul C, Perez-Romero P, Mena-Romo D, Molina-Ortega A, González-Roncero FM, Suñer M, Bernal G, Cordero E.

Manuscrito publicado en la revista *Transplant Infectious Disease*.

**Presentaciones en congresos:**

**“Impact of pre-transplantation CMV-specific T-cell immune response in the control of CMV infection after solid organ transplantation”**

*28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Madrid, 2018.* Presentación oral.

**“Characterization and impact of the CMV-specific humoral immune response on controlling CMV infection in solid organ transplant recipients at low risk for CMV infection”**

*27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Viena, 2017.* e-Poster con sesión oral.



# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1. Características de citomegalovirus humano.....	2
1.1. Estructura y ciclo de vida de CMV.....	2
2. Infección causada por CMV.....	7
2.1. Epidemiología .....	7
2.1.1. Vías de transmisión .....	7
2.2. Patogénesis .....	9
3. Infección por CMV en pacientes trasplantados de órgano sólido (TOS) .....	12
3.1. Diagnóstico de la infección por CMV.....	13
3.1.1. Serología .....	13
3.1.2. Cultivo celular.....	14
3.1.3. Antigenemia.....	14
3.1.4. ADNemia .....	15
3.1.5. Histopatología .....	16
3.2. Factores de riesgo de la infección y enfermedad por CMV.....	16
3.2.1. Situación serológica del donante y receptor.....	17
3.2.2. Tipo de órgano trasplantado.....	18
3.2.3. Inmunosupresión basal.....	19
3.2.4. Estrategias de prevención de la infección por CMV .....	20
3.2.4.1. Profilaxis universal.....	21
3.2.4.2. Tratamiento anticipado.....	21
3.2.4.3. Recomendaciones en el empleo de estrategias de tratamiento frente a CMV.....	23
3.3. Fármacos antivirales .....	24
4. Respuesta inmune frente a citomegalovirus en receptores de TOS.....	25
4.1. Inmunidad innata.....	25
4.2. Inmunidad adaptativa.....	26
4.2.1. Inmunidad celular.....	26
4.2.2. Inmunidad humoral.....	29
5. Monitorización inmunológica en receptores de TOS.....	31



<b>II. JUSTIFICACIÓN</b> .....	37
<b>III. HIPÓTESIS</b> .....	42
<b>IV. OBJETIVOS</b> .....	45
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	48
<b>VI. RESULTADOS</b> .....	57
<i>Análisis de la respuesta inmune celular específica frente a CMV y su papel como factor independiente en el control espontáneo de la infección por CMV</i> .....	58
<i>Cinética de la respuesta inmune celular y humoral en receptores de trasplante de órgano sólido de riesgo intermedio de infección y enfermedad por CMV</i> .....	68
<i>Definición de un punto de corte de respuesta inmune pretrasplante celular y humoral específica de CMV con efecto terapéutico a partir del cual el paciente puede controlar espontáneamente la viremia por CMV</i> .....	73
<b>VII. DISCUSIÓN</b> .....	80
<b>VIII. CONCLUSIONES</b> .....	96
<b>IX. ANEXO I</b> .....	100
<b>X. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	174

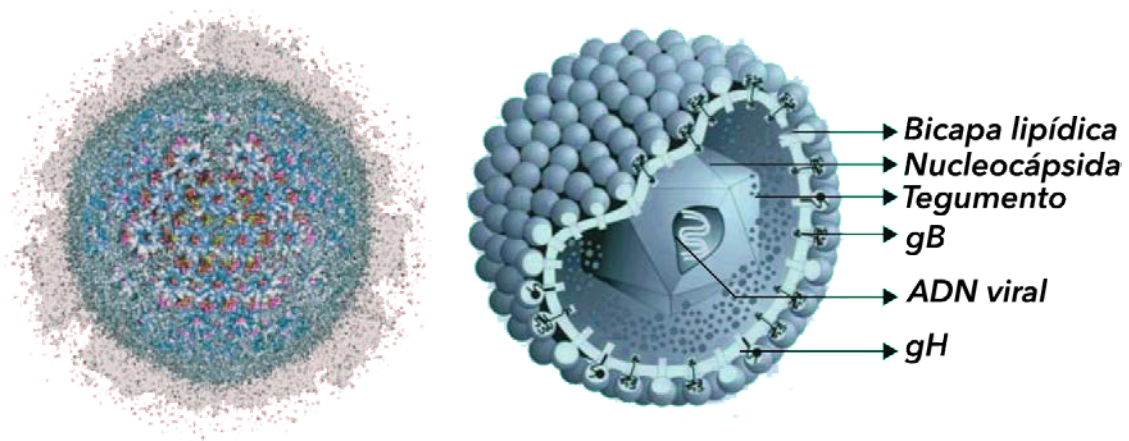


# I. INTRODUCCIÓN

## 1. Características de citomegalovirus humano

### 1.1. Estructura y ciclo de vida de CMV

Citomegalovirus (CMV), género de la subfamilia *Betaherpesvirinae*, perteneciente a la familia *Herpesviridae*, es uno de los virus de mayor tamaño capaz de infectar al ser humano. En los virus de esta familia se diferencian tres regiones características: 1) una nucleocápsida icosaédrica que contiene el genoma viral, formado por ADN lineal de doble cadena, 2) un tegumento proteico que rodea a la nucleocápsida y 3) una bicapa lipídica externa que engloba tanto a la nucleocápsida como al tegumento proteico (Figura 1) (1).



**Figura 1.** Estructura del CMV humano (Adaptado de Gandhi MK et al., 2004).

Concretamente, en el caso de citomegalovirus humano, el genoma está formado por ADN lineal de doble cadena de unos 230 kb y con aproximadamente 200 pautas abiertas de lectura (ORFs; del inglés *Open Reading Frames*) (2-5) que codifican unas 230 proteínas diferentes (6) a partir de un único origen de replicación. Su genoma se ha estructurado en secuencias en función de su tamaño: una secuencia larga (UL) y otra corta (US), y además presenta dos secuencias internas repetidas (IRS) y otras dos terminales

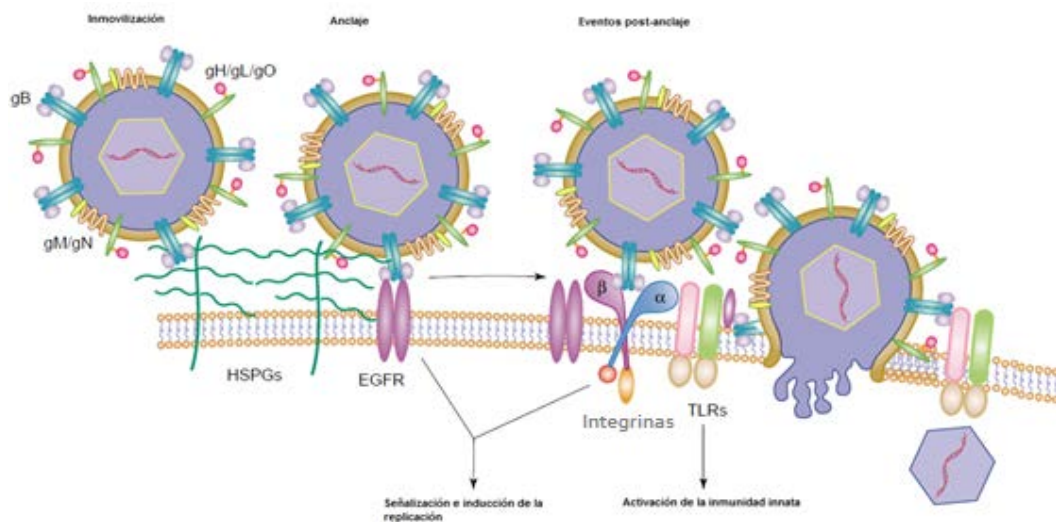
(TRS) que, junto con las glicoproteínas de membrana de CMV, median la infección en la célula hospedadora.

La nucleocápsida, por su parte, de estructura icosaédrica compuesta por 162 capsómeros y con aproximadamente 130 nm de diámetro, está formada exclusivamente de proteínas virales (pUL86, pUL85, pUL46 y pUL48-49) (7) y se encuentra rodeada por una matriz proteica amorfa o tegumento, compuesta de 14 proteínas diferentes (8). Las proteínas del tegumento tienen funciones muy distintas, desde participar en la entrada del virus en la célula hospedadora hasta la evasión del sistema inmune o el ensamblaje y salida de las nuevas partículas víricas (7). En este contexto, la proteína más abundante del tegumento es la fosfoproteína 65 (pp65) (9, 10), también conocida como pUL83, altamente antigénica, que junto con pp150, pp28 o pp52 (11) es utilizada para la determinación del estatus serológico frente a CMV (12). La proteína pp65 además de ser la principal diana tanto de la respuesta inmune celular mediada por linfocitos T citotóxicos como de la respuesta humoral de células B mediada por anticuerpos (13, 14). Esta proteína, además, participa en numerosas cascadas de señalización, donde junto con pUL26, al ser liberadas en el citoplasma celular, son capaces de interactuar con proteínas celulares para modular la respuesta inmune y genes de expresión virales, con especial mención a su papel en la evasión del sistema inmune (15-20).

Por último, la bicapa lipídica externa, es una envuelta que procede de la célula hospedadora infectada. Formada por unas 19 glicoproteínas, incluyendo las glicoproteínas B (gB), la gH, gL, gM, gN y la gO (8), éstas ejercen funciones que median: 1) la entrada del virus mediante uniones glicoproteicas con los receptores de la célula hospedadora que desencadenan la fusión de membranas o endocitosis del virión (21-23), produciéndose así la infección de la célula diana y 2) la diseminación del virus célula a célula o la maduración de viriones (24).

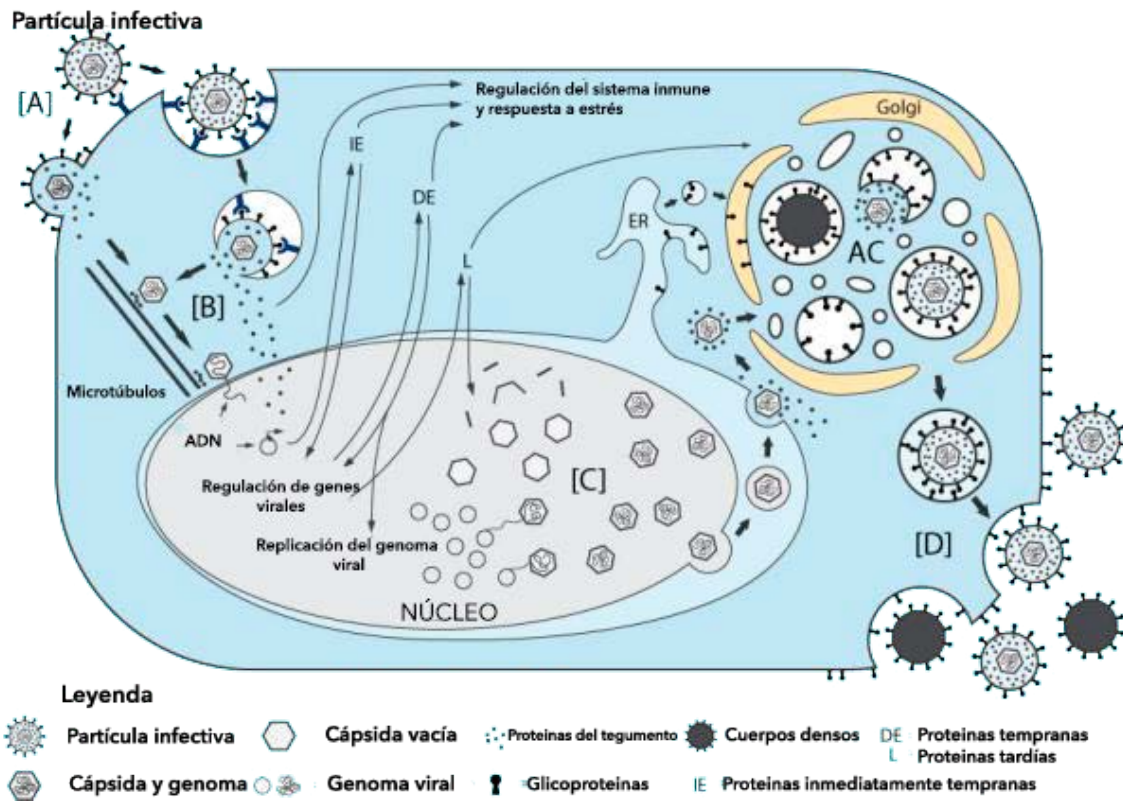
CMV es capaz de infectar a multitud de tipos celulares de distintos órganos y tejidos, entre los que se encuentran fibroblastos, macrófagos, neutrófilos, granulocitos, neuronas o células del músculo liso, entre otros (25-28), sin embargo la principal diana de infección son las células epiteliales y endoteliales (29, 30).

El mecanismo general de entrada del CMV en la célula huésped comienza con el reconocimiento inicial entre las glicoproteínas gM y gB de la envuelta viral y los proteoglicanos heparán-sulfato de la membrana plasmática (Figura 2) (23, 31), estabilizándose el complejo de glicoproteínas virales – receptor celular mediante integrinas (32, 33) y produciéndose finalmente la fusión de las membranas viral y celular en la que participa el complejo de glicoproteínas virales gH/gL y gB (34-36) que conduce a la liberación en el citoplasma celular de la partícula viral no envuelta compuesta por el tegumento y la nucleocápsida, que posteriormente es transportada al núcleo donde la maquinaria celular (37, 38) lleva a cabo la replicación viral.



**Figura 2.** Modelo de entrada de CMV en la célula hospedadora (Adaptado de Compton T., 2004).

Tras la infección primaria CMV pueden establecer infección 1) latente, pudiendo infectar distintos tipos celulares dentro del organismo humano como las células mononucleadas, progenitores de macrófagos y granulocitos de la médula ósea o en monocitos periféricos (39, 40), aunque los mecanismos a través de los cuales se produce la infección latente no están bien definidos y pese a la existencia de distintos estudios que sugieren un posible papel relevante de algunas proteínas y micro-ARNs durante la fase de latencia (41-43) y 2) infección lítica, en la cual la replicación viral da lugar a la lisis de la célula hospedadora. Durante la infección lítica, el ciclo de replicación se divide en tres etapas (Figura 3) (44): la fase inmediatamente temprana (IE), en la que se transcriben genes apenas una hora después de la infección (45) implicados en el control celular además de regular la expresión de otros genes virales implicados en la activación de los genes de la fase temprana (E) y tardía (L) (46-48). Cuando se produce una disminución en la expresión de los genes de la fase IE, el virus puede entrar en estado de latencia (49) mientras que la expresión de los genes IE está asociada con su reactivación (50), que puede producirse por diversos estímulos como la inflamación, infección, estrés o, de manera más relevante, en individuos inmunocomprometidos como los receptores de trasplante de órgano sólido (TOS) debido a su estado de inmunosupresión (51). Actualmente, se conoce que las citoquinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$  inducen la diferenciación de los monocitos a macrófagos o a células dendríticas, activándose por tanto la transcripción de los genes IE del CMV en estado latente (52) y dado que estas proteínas de expresión precoz son las primeras que se expresan tras la reactivación, sirven de diana para la respuesta inmune celular mediada por linfocitos T citotóxicos (53).



**Figura 3.** Ciclo de vida y regulación de genes de CMV (Adaptado de Jean Beltran PM et al., 2014).

Durante la fase temprana (ocurre inmediatamente después de la fase IE) se transcriben los genes implicados en la replicación del ADN viral (54) y proteínas estructurales y posteriormente, en la fase tardía (24 horas posteriores a la infección, aproximadamente), se sintetizan proteínas relacionadas con el ensamblaje de la envoltura viral (55-58). Una vez que se ensambla la cápsida en el núcleo, ésta sale al citoplasma donde, gracias a la maquinaria de la célula (retículo endoplásmico y aparato de Golgi, principalmente) (44) se producirá la formación de los viriones maduros que serán liberados al exterior llevándose consigo parte de la membrana celular y podrán producir nuevamente la infección de nuevas células.



## **2. Infección causada por CMV**

### **2.1. Epidemiología**

Citomegalovirus humano es un microorganismo muy bien adaptado por lo que la prevalencia de infección por CMV es muy elevada en la población general. La prevalencia de infección por CMV en la población depende de factores socio-económicos y localización geográfica, de modo que, mientras que en países desarrollados la prevalencia de infección se encuentra en torno al 60%, en países en vías de desarrollo llega a alcanzar más del 90%, donde el hacinamiento y la falta de higiene favorecen la transmisión de CMV (59). Además, en países desarrollados, aproximadamente el 40% de los adolescentes son seropositivos.

La infección o replicación por CMV puede detectarse a través de la presencia de proteínas o ácidos nucleicos virales, en cualquier fluido corporal o muestra de tejido. La infección primaria causada por CMV, en individuos inmunocompetentes, suele ser asintomática, leve o puede llegar a causar síntomas similares a la mononucleosis y tras la infección permanece de manera latente de por vida en monocitos y probablemente también en órganos y tejidos. La infección se produce comúnmente por contacto directo con distintos fluidos tales como saliva, orina, leche materna, semen o secreciones vaginales de una persona infectada. Por otra parte, también se pueden producir infecciones recurrentes, ya sea por reinfección con otra cepa o por reactivación del virus latente.

#### **2.1.1. Vías de transmisión**

La transmisión de CMV puede ser horizontal, en el periodo perinatal o posnatal, y vertical, de la madre al hijo en el embarazo o parto (60, 61). En adultos inmunocompetentes, CMV se excreta de manera intermitente e indefinida, mientras que

en individuos inmunodeprimidos e infecciones congénita, perinatal o posnatal temprana es prolongada y constante (59, 62).

En el trasplante de órgano sólido se pueden presentar tanto la primoinfección (en receptores seronegativos) como infecciones recurrentes (en receptores seropositivos), bien sea por reinfección con otra cepa del donante o de otra persona infectada o bien por reactivación de la cepa latente del receptor. En el contexto del trasplante de órgano sólido, la primoinfección en receptores seronegativos suele estar asociada a un mayor riesgo debido a que el paciente no ha desarrollado aún inmunidad específica frente a CMV (63), a diferencia del receptor seropositivo en el trasplante de precursores hematopoyéticos donde existe un menor riesgo de infección por CMV debido a que se transfiere cierta inmunidad al receptor de médula ósea con depleción de células T.

La infección congénita suele darse mediante transmisión intrauterina o transplacentaria, en torno al 33% de las embarazadas con primoinfección. Las gestantes seropositivas pueden desarrollar reinfecciones y reactivaciones, con un alto riesgo de transmisión de la infección al feto (60). En zonas de alta prevalencia, como ocurre en zonas con un estatus socio-económico bajo, la probabilidad de que un feto se infecte por infección recurrente es mayor que por infección primaria. Sin embargo, en los casos de infección recurrente, el riesgo para el feto es mucho menor (llegando a reducirse casi al 1%) en comparación con la infección primaria, debido probablemente a la inmunidad desarrollada previamente frente a CMV por la madre (50, 64, 65).

La infección perinatal ocurre a través de la lactancia materna o por contacto con secreciones genitales de la madre durante el parto, a diferencia de la infección posnatal que suele ocurrir mediante transmisión por saliva o a través de transfusiones sanguíneas

que suelen ser vehículos de transmisión, ya que CMV puede permanecer en estado latente en monocitos, pudiendo reactivarse en el receptor de la transfusión.

## **2.2. Patogénesis**

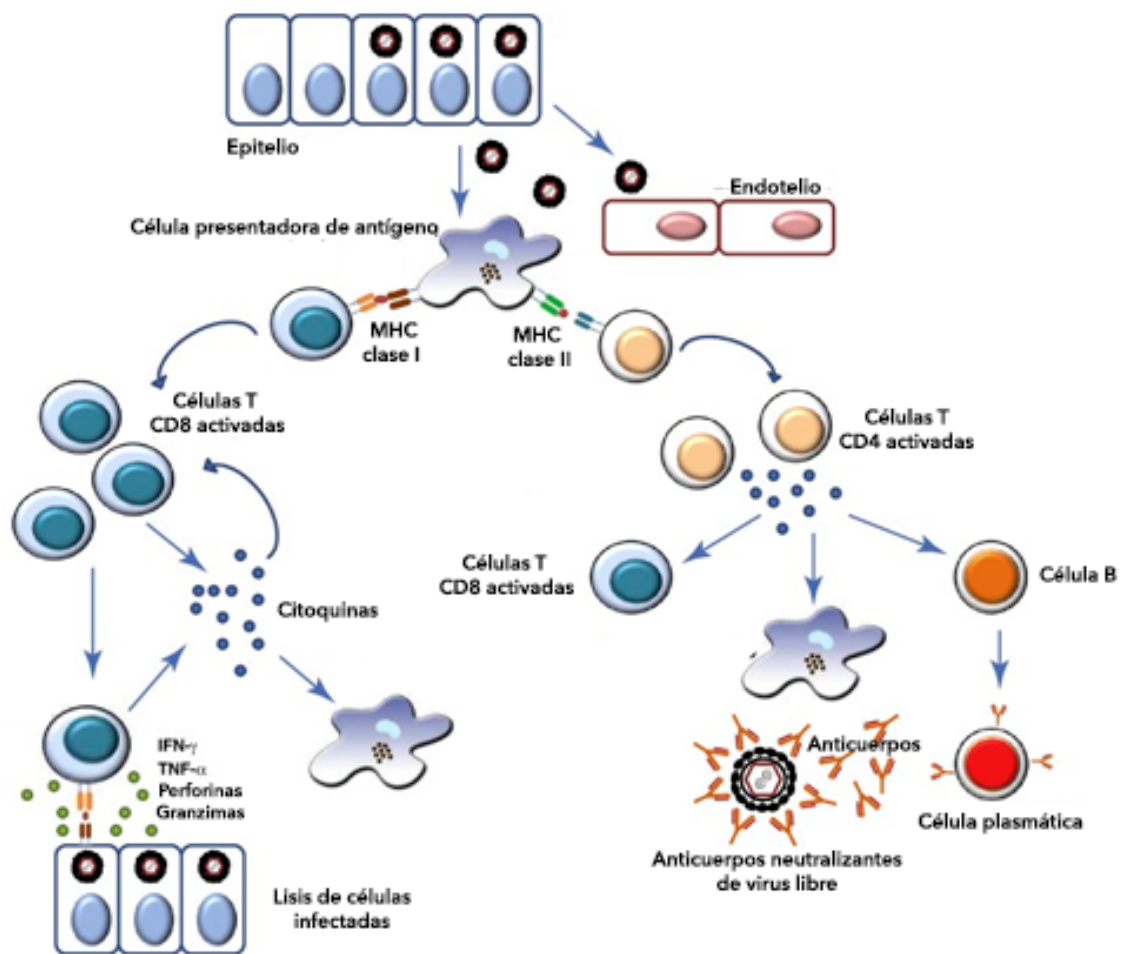
Debido al amplio tropismo celular que caracteriza al citomegalovirus, el número de patologías asociadas a la infección por este virus es muy diversa. Salvo en el caso de la transmisión por transfusión sanguínea o trasplante, la primera barrera de contacto durante la infección por CMV es la epitelial, bien sea a través del tracto digestivo superior, tracto respiratorio o a través del tracto genitourinario, aunque en el feto el virus entra por vía hematológica (27). Tras esta infección de la barrera epitelial suele producirse una diseminación de CMV, donde leucocitos y el endotelio vascular juegan un papel importante.

La enfermedad por CMV se define como el desarrollo de síntomas o signos asociados a la aparición del virus, y puede categorizarse de dos formas, como síndrome viral o como enfermedad invasiva de tejido. Aunque la detección de cargas virales elevadas se relaciona con un mayor riesgo de desarrollo de enfermedad por CMV, la infección primaria es también un factor de riesgo de enfermedad por CMV, tanto durante la gestación como en el paciente con trasplante de órgano sólido, debido a que no ha habido contacto previo con el virus y por tanto activación de una respuesta inmune. Aunque este tipo de infecciones suele ser asintomáticas en personas inmunocompetentes, se pueden desarrollar síntomas leves similares a los desarrollados durante la mononucleosis, generalmente acompañado de fiebre, elevación de transaminasas o linfocitosis (66). Asimismo, CMV es la causa más frecuente de infección congénita, con una prevalencia <1% en países desarrollados (67). En fetos infectados congénitamente, solo un 10%, aproximadamente, acabará presentando una infección sintomática grave

(68), como retrasos en el crecimiento intrauterino, encefalitis o microcefalia, hepatoesplenomegalia, coriorretinitis o trombocitopenia, pudiendo causar la muerte durante la infancia. Los casos con microcefalia suelen tener un mayor riesgo de presentar secuelas graves relacionadas con el desarrollo de enfermedades neurológicas, déficits cognitivos y motores, además de una afectación auditiva y visual (67). Sin embargo, en recién nacidos con infección asintomática, la mortalidad es prácticamente nula, si bien en torno a un 13% tendrá afectaciones de tipo auditivo.

La inmunidad específica frente a CMV juega un papel importante en el control de la infección. Durante la infección primaria el CMV infecta las células epiteliales y se disemina a otros tipos celulares. Las células presentadoras de antígenos (APC) procesan y muestran los antígenos del CMV en su superficie asociados a los complejos de histocompatibilidad (MHC). Las APC pueden estimular células T CD8<sup>+</sup> en el contexto de los MHC de clase I y una vez activadas pueden lisar directamente a las células infectadas por virus mediante citólisis mediada a través de la secreción de granzimas y perforinas o induciendo la supresión de la replicación del virus a través de la secreción de IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$ . Las APC también pueden promover la inmunidad adaptativa a través de la presentación de los antígenos en el contexto de los MHC de clase II que son reconocidas por las células T CD4<sup>+</sup>. La activación de células B dará como resultado la producción de anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes específicos de CMV. Los anticuerpos neutralizantes frente a las glicoproteínas de la superficie viral (como la glicoproteína B (gB) y la gH involucrada en la unión y penetración de las células) bloqueará el virus extracelular mediante la neutralización mediada por anticuerpos al bloquear la infección de nuevas células. Evidencias recientes también han resaltado el papel protector de los anticuerpos dirigidos al complejo pentámero viral gH/gL/pUL128-131A. La presencia en el suero de algunos de los anticuerpos no neutralizantes frente a las proteínas de CMV

producidas durante la infección, como pp65, pp150, pp28 o pp52 entre otras, son utilizadas para determinar el estado serológico de los pacientes. Además, las citoquinas, como la interleucina 2 (IL-2), secretadas por las células T CD4<sup>+</sup> también pueden conducir a la proliferación de células T y macrófagos CD8<sup>+</sup>. Las células T CD4<sup>+</sup> activadas también pueden participar en el bloqueo del virus intracelular al inducir la supresión de la replicación del virus a través de la secreción de INF- $\gamma$  (Figura 4) (69).



**Figura 4.** Respuesta inmune de CMV (Adaptado de Blanco-Lobo et al., 2016).

### **3. Infección por CMV en pacientes trasplantados de órgano sólido (TOS)**

Durante la última década, a pesar de los avances en la monitorización y tratamiento de la infección por citomegalovirus, el CMV sigue siendo causa de una elevada tasa de morbi-mortalidad en el receptor de TOS (70, 71).

Al contrario que en los individuos inmunocompetentes, durante los seis primeros meses postrasplante, período de máxima inmunosupresión de los pacientes y en el que se alcanza la máxima incidencia de infección por CMV puede llegar a causar importantes complicaciones directas si se desarrolla enfermedad por CMV. La enfermedad por CMV puede manifestarse en estos pacientes como síndrome viral, consistente en un cuadro febril inespecífico durante al menos 2 días, acompañado con frecuencia de leucopenia, elevación de transaminasas o trombocitopenia, o bien como enfermedad invasiva, que es cuando la enfermedad produce una afectación de órgano en forma de neumonitis, enfermedad digestiva, hepatitis, encefalitis, retinitis, cistitis, miocarditis o pancreatitis, entre otras (72). Además de estos efectos directos por invasión del virus, en los pacientes trasplantados de órgano sólido se han descrito varios factores patogénicos para explicar la relación entre el virus y la aparición de efectos indirectos. Uno de estos factores hace referencia a la capacidad del CMV para producir una actividad inmunosupresora sobre el huésped, que se produce como consecuencia de los mecanismos empleados por el virus para evadir la respuesta inmune (propiedades inmunomoduladoras) y facilitar su permanencia en estado latente (70, 73-75), bien mediante la inhibición de la expresión de moléculas HLA de clase I y clase II sobre las células T y las APC por las células infectadas y, por tanto, eludiendo su reconocimiento por los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, bien mediante la codificación de varias proteínas que inhiben la presentación de péptidos específicos por las APC, limitando la activación de la respuesta inmune específica de células T frente a CMV (76, 77) o bien desarrollando mecanismos de escape frente a la acción de células

NK (78, 79). Los principales efectos indirectos asociados a la infección por CMV son: la nefropatía crónica de injerto (80) o el rechazo agudo (81-84) para los receptores renales, la recurrencia acelerada del virus de la hepatitis C (VHC), la trombosis de la arteria hepática o el rechazo crónico para los receptores hepáticos (84-87), la vasculopatía postrasplante en los receptores cardíacos (88, 89) y otros efectos generales como aumento del riesgo de infecciones bacterianas o fúngicas (90-93), la inmunosenescencia (94) y la diabetes mellitus (95).

### **3.1. Diagnóstico de la infección por CMV**

En el paciente trasplantado de órgano sólido, la replicación activa por CMV no siempre se traduce en manifestaciones clínicas (enfermedad por CMV), lo que complica el diagnóstico y la selección del método de detección más apropiado. Si a esto le sumamos que los cuadros clínicos son extremadamente variados y con manifestaciones muy inespecíficas, el interés de las pruebas diagnósticas cobra especial relevancia. Las técnicas diagnósticas para la determinación de la infección por CMV utilizadas son: la serología CMV IgG, el cultivo celular, la detección de antigenemia y de ADNemia, mientras que para el diagnóstico de la enfermedad es necesario, además, demostrar invasión tisular mediante histopatología.

#### **3.1.1. Serología**

La serología es una técnica utilizada previa al trasplante para determinar el estado serológico respecto a CMV que indica si el individuo ha tenido o no una infección previa por CMV. La técnica consiste en la identificación en el suero de los pacientes de anticuerpos frente a CMV IgG e IgM en el donante y el receptor de TOS. La combinación serológica donante/receptor constituye la base para estratificar el riesgo postrasplante de

infección y/o enfermedad por CMV (apartado 3.2.1) y por tanto determinar una estrategia de prevención (66).

En la actualidad existen numerosas pruebas que identifican anticuerpos tanto IgG como IgM, aunque son los métodos inmunoenzimáticos (ELISA) o los de inmunofluorescencia (IF) los más utilizados ya que permiten trabajar con un gran volumen de muestras, y requieren un tiempo de procesamiento corto.

### **3.1.2. Cultivo celular**

El cultivo celular permite aislar CMV a partir de muestras clínicas de distinto origen, como sangre, orina, biopsias de tejidos o lavados bronquiales, entre otros. Para ello las muestras son utilizadas para infectar células en cultivo de fibroblastos humanos. Dependiendo de los casos, el crecimiento en medio de cultivo llega a ser prolongado y se requieren al menos 3-4 semanas para obtener un resultado (96).

Aunque, el cultivo celular ha sido el *gold-standard* para detectar la infección por CMV, actualmente sólo se utiliza en algunos casos en los que se requiere el aislamiento del virus en ciertos tejidos (97).

### **3.1.3. Antigenemia**

Es una técnica semi-cuantitativa que consiste en el empleo de anticuerpos monoclonales para detectar la proteína viral del tegumento de CMV, la fosfoproteína 65 (pp65), que es el antígeno viral mayoritario presente en leucocitos de sangre periférica tras la infección por CMV (13, 98). Para ello se separa la fase leucocitaria de la sangre y con la ayuda del citómetro de flujo y la tinción con anticuerpos monoclonales se consigue la detección del antígeno pp65 en leucocitos. En pacientes seropositivos, para la sospecha de enfermedad por CMV se suele tomar un recuento de 10 células/100.000 leucocitos,



mientras que, en pacientes seronegativos, el riesgo de enfermedad por CMV puede ser considerado a partir de 1 célula/100.000 (99). A pesar de ser una técnica sencilla, estandarizada y con una sensibilidad mayor al cultivo celular, la principal limitación de esta técnica es su utilización en pacientes con leucopenia o neutropenia. Además, la muestra de sangre debe ser procesada en pocas horas, lo que hace que otras técnicas moleculares, como la ADNemia, hayan sustituido en la mayoría de los centros a la detección de CMV por antigenemia.

#### **3.1.4. ADNemia**

Es una técnica basada en la detección de ácidos nucleicos y suele realizarse mediante PCR convencional o PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). Este tipo de técnicas son rápidas y objetivas, aunque tiene un coste más elevado (100-104). La muestra utilizada puede ser de sangre total o plasma, siendo este último es más recomendado debido a la mayor correlación con la replicación activa del virus, ya que la detección de ADN de CMV en sangre total podría reflejar solamente la presencia del virus latente en linfocitos (105, 106). A pesar de las mejoras de especificidad y sensibilidad introducidas con la utilización de esta técnica frente a las demás, existe una dificultad de definir la negatividad de la PCR y debido a la falta de estandarización para establecer un punto de corte de carga viral, ya que existe una gran variabilidad de resultados entre técnicas y/o laboratorios (107-110). Sin embargo, en 2010 la Organización Mundial de la Salud (OMS) desarrolló un estándar internacional para la cuantificación de ácidos nucleicos de CMV que permitió la calibración y estandarización entre los distintos laboratorios gracias a la conversión de copias por mililitros (copias/ml) a Unidades Internacionales por mililitro (UI/ml), facilitando así la extrapolación de datos entre los distintos centros (111). Esta técnica es más sensible que la antigenemia, y se ha convertido en la técnica de elección en el diagnóstico de la infección por CMV.

### **3.1.5. Histopatología**

Es una técnica en la que se utiliza tejidos procedentes de biopsias en pacientes con sospecha de infección por CMV para su análisis por histología. Las tinciones convencionales como hematoxilina-eosina, pueden aplicarse al diagnóstico de CMV en muestras procedentes tanto de tejidos (tubo digestivo, cerebro, hígado, etc.) como de lavados bronco-alveolares. En estos casos, la infección por CMV se detecta mediante inmunohistoquímica y es reconocida por la presencia de células citomegálicas con inclusiones intranucleares basófilas de cromatina vírica rodeadas de un halo que engloba a la cromatina celular en las proximidades de la membrana nuclear, estructura morfológicamente conocida como “ojo de búho” (112). Este tipo de estructuras son reconocidas gracias a que muestran una tinción intracelular marrón que le confiere el compuesto 3,3'-diaminobenzidina.

Excepto para retinitis o para enfermedad del sistema nervioso central, la inmunohistoquímica es necesaria para confirmar el diagnóstico de enfermedad de órgano por CMV. Dentro de las limitaciones más importantes de esta prueba se encuentra su naturaleza invasiva y la discordancia existente entre los resultados histopatológicos y otras técnicas de cuantificación de la carga viral (113).

### **3.2. Factores de riesgo de la infección y enfermedad por CMV**

A la hora de desarrollar estrategias preventivas eficientes es necesario conocer los factores de riesgo para el desarrollo de infección y enfermedad por CMV postrasplante. Así, la situación serológica del donante y receptor, el tipo de órgano trasplantado, el estado de inmunosupresión basal o la estrategia de prevención de la infección por CMV son los principales factores de riesgo para el desarrollo de infección y/o enfermedad por CMV tras el trasplante.

### 3.2.1. Situación serológica del donante y receptor

La evaluación del estado serológico frente a CMV del donante y del receptor antes del trasplante se ha utilizado convenientemente como un marcador subrogado de infección latente (y por tanto de riesgo posterior de transmisión del donante) y de competencia inmune o capacidad de controlar la infección. La combinación del estado serológico del donante y del receptor en el pretrasplante se utiliza para definir distintas categorías de riesgo de enfermedad por CMV postrasplante. En el contexto del paciente TOS, los receptores seronegativos que reciben un órgano de un donante seropositivo (D+/R-) presentan un alto riesgo, los receptores seropositivos y donante seropositivos (D+/R+) y los receptores seropositivos y donantes seronegativos (D-/R+) presentan un riesgo intermedio y, por último los receptores seronegativos y donantes seronegativos (D-/R-) presentan un riesgo bajo de desarrollar infección por CMV tras el trasplante (114, 115).

En los receptores de alto riesgo D+/R-, debido a que CMV permanece en estado de latencia en monocitos y macrófagos presentes en el tejido trasplantado (49, 116), el receptor puede desarrollar una infección por CMV sin presentar inmunidad específica de CMV previa y desarrollar una infección primaria por CMV. El riesgo de desarrollo de enfermedad por CMV postrasplante en este tipo de pacientes puede ser superior al 50% si no se adoptan medidas preventivas (115).

Aunque la mayoría de los receptores de TOS son R+, esta es precisamente la población menos estudiada de los que se tienen menos datos en la literatura y los pocos informes publicados incluyen un tamaño de muestra insuficiente (117, 118). Los pacientes R+ tienen una incidencia significativa de ADNemia por CMV (alrededor del

50%) y la incidencia de enfermedad por CMV postrasplante no es despreciable, variando entre el 3% y el 19% (119, 120).

Por último, los receptores de bajo riesgo son los que tienen un menor riesgo de desarrollar infección por CMV (121), salvo en caso de recibir transfusiones sanguíneas de receptores seropositivos (122) o por desarrollar una infección primaria.

Aunque la serología es la principal factor utilizado para determinar el riesgo postrasplante de enfermedad por CMV, la susceptibilidad individual a la infección por CMV se modula además por otros factores como el tipo de trasplante, la inmunosupresión, agentes anti-timocíticos u otras coinfecciones.

### **3.2.2. Tipo de órgano trasplantado**

El riesgo de desarrollar infección y/o enfermedad por CMV es diferente en función del órgano trasplantado. Habitualmente, la incidencia de enfermedad es más frecuente, y generalmente más grave, en los pacientes con trasplante de pulmón, intestino y páncreas respecto de los de hígado, riñón y corazón (113, 123-125). Probablemente, el abundante tejido linfoide o macrófagos con carga elevada de CMV latente o en replicación podría ser el motivo por el cual exista una mayor incidencia de enfermedad por CMV en el trasplante intestinal (aproximadamente un 40% de los pacientes) y en el pancreático (hasta el 33% de los pacientes) (124, 126, 127). Sin embargo, en un estudio en receptores de trasplante de pulmón o combinado pulmón-corazón, la prevalencia de enfermedad por CMV osciló entre el 38% y el 75% de los casos (128). Los trasplantes de riñón, generalmente, son los que menor riesgo de enfermedad por CMV presentan, con valores entre el 10% y 30%, aproximadamente (129).

### 3.2.3. Inmunosupresión basal

Otro de los factores condicionantes en el desarrollo de infección y/o enfermedad por CMV es la inmunosupresión requerida para evitar el rechazo del injerto. Así, el nivel de inmunosupresión se ve influenciado, entre otros, por factores como el esquema inmunosupresor empleado, la dosis, la duración, o la edad, condicionando así el riesgo de presentar una infección sintomática por CMV (130). En este sentido, el tratamiento inmunosupresor postrasplante puede dividirse en: 1) terapia de inducción, con agentes como la globulina anti-timocítica (rATG; timoglobulina) o el basiliximab, entre otros y 2) terapia de mantenimiento, como el micofenolato de mofetilo (MMF), que actúa inhibiendo la síntesis de nucleótidos, el tacrolimus y la ciclosporina, inhibidores de la calcineurina, que actúan inhibiendo la transcripción de citoquinas o sirolimus y everolimus, ambos inhibidores de la vía mTOR (del inglés, *mammalian target of rapamycin*), que actúan inhibiendo la transducción de la señal de factores de crecimiento (131).

La terapia de inducción tiene como objetivo evitar el rechazo precoz del injerto debido posiblemente a la presencia en el receptor de una alta proporción de precursores de células T específicas del donante (132). La inducción con timoglobulina es un componente clave en el régimen inmunosupresor y gracias a su uso en la última década, el tiempo en lista de espera para recibir un trasplante de riñón de donantes en asistolia se ha visto reducido considerablemente (133). En un estudio realizado en pacientes receptores de trasplante renal procedente de donantes vivos, la timoglobulina administrada se asoció con una menor incidencia de rechazo o de complicaciones postrasplante (134). En otro estudio aleatorizado se comparó la seguridad del rATG frente al basiliximab en receptores de trasplante renal observado a una menor incidencia y gravedad de rechazo agudo (135). Sin embargo, a pesar de la mejoría en la evolución

clínica del injerto asociado al uso de timoglobulina, existen estudios que han asociado un riesgo incrementado de enfermedad por CMV en el postrasplante con el uso de timoglobulina (de un 15% a un 28%) (136). Otros encontraron una incidencia mayor de infección por CMV en pacientes tratados con rATG en comparación con aquellos sin inducción con rATG (137). Por tanto, aunque existen estudios que observan un mayor riesgo de infección y enfermedad por CMV, se necesitan realizar más estudios que profundicen en los diferentes factores que pueden estar implicados en la infección por CMV, ya que otros estudios publicados muestran resultados opuestos al no encontrar una asociación clara entre el uso de timoglobulina y un mayor riesgo de infección por CMV (138, 139).

Respecto de la terapia de mantenimiento, existen estudios que asocian una mayor incidencia de enfermedad por CMV con altas dosis de micofenolato mofetilo y otros donde su uso en trasplante renal disminuye la incidencia de rechazo (140-143). Además se ha asociado el uso de inhibidores del m-TOR con un menor riesgo de infección y enfermedad por CMV (129, 144, 145).

#### **3.2.4. Estrategias de prevención de la infección por CMV**

Con el objetivo de disminuir la incidencia de enfermedad, los efectos indirectos, así como la mortalidad asociada a la infección por CMV en el receptor de TOS, se recurre a dos estrategias terapéuticas principales: la profilaxis universal y el tratamiento anticipado. Ambas estrategias han demostrado ser eficaces en la prevención de la infección y enfermedad por CMV (99, 146). Sin embargo, como medidas preventivas de diferente aplicación clínica, ambas estrategias presentan ventajas y desventajas en función del parámetro de estudio y que detallaremos a continuación.

#### **3.2.4.1. Profilaxis universal**

La profilaxis universal consiste en la administración del tratamiento antiviral inmediatamente después del trasplante y, dependiendo del centro, se continúa hasta 3 o 6 meses tras la primera administración, con independencia de la evolución viral en el paciente trasplantado (147, 148). Generalmente, esta estrategia es recomendada en pacientes de alto riesgo de infección por CMV (D+/R-), sobre todo en los receptores TOS de pulmón, intestino y páncreas (149) y en pacientes con alto riesgo inmunológico, como aquellos que reciben terapia de inducción con timoglobulina (150).

La eficacia de la profilaxis universal en la reducción de la incidencia de enfermedad por CMV ha sido demostrada en numerosos estudios (151, 152). Una de las principales ventajas de la profilaxis es la reducción de la morbi-mortalidad de estos pacientes asociadas a la infección por CMV (71, 153, 154). Actualmente, el fármaco antiviral más empleado es el valganciclovir, debido a su eficacia y facilidad de administración (148, 155, 156). Otras de las ventajas de importancia son una menor dificultad a la hora de implementar este tipo de estrategia de tratamiento o un menor coste en pruebas diagnósticas para monitorizar al paciente (157). Sin embargo, el principal inconveniente del uso de la profilaxis universal es la alta incidencia de enfermedad tardía por CMV, hecho especialmente relevante ya que el desarrollo de la misma se asocia de forma independiente a un incremento en la pérdida del injerto y la mortalidad del paciente (148, 158, 159), así como la alta toxicidad asociada a la administración del fármaco en régimen profiláctico (158, 160).

#### **3.2.4.2. Tratamiento anticipado**

El tratamiento anticipado consiste en la administración del tratamiento antiviral cuando los pacientes presentan cargas virales por encima de un punto de corte

previamente establecido (161, 162), para evitar la enfermedad por CMV, hasta que la carga viral sea indetectable en plasma, generalmente medida mediante PCR cuantitativa en tiempo real (149). En base a esto, es fundamental que se lleve a cabo un seguimiento muy estrecho de la replicación viral postrasplante del paciente con el objeto de evitar la aparición de síntomas y la progresión de la enfermedad (99). Además, es común en la práctica clínica iniciar tratamiento anticipado sin carga viral detectable en casos en los que existe sospecha clínica o evidencia de síntomas de enfermedad por CMV.

El tratamiento anticipado es recomendado en pacientes de riesgo intermedio de infección y enfermedad por CMV (R+), principalmente en receptores de hígado, riñón y corazón (99, 149).

Las principales ventajas del tratamiento anticipado son: menor incidencia de enfermedad tardía por CMV, la activación de la inmunidad específica frente a CMV debido a la exposición controlada al virus y una menor toxicidad farmacológica (163). Sin embargo, debido a la falta de homogeneidad en las técnicas diagnósticas empleadas en los distintos centros, no existe un punto de corte universal para el inicio del tratamiento anticipado, por lo que las guías clínicas recomiendan que cada centro desarrolle su propio protocolo de acuerdo al riesgo del paciente y a la técnica disponible en el laboratorio (99, 149). Nuestro grupo estableció en una cohorte de derivación de receptores de TOS un punto de corte de carga viral de 3983 UI/ml para comenzar el tratamiento anticipado en receptores TOS de riesgo intermedio de enfermedad por CMV, con un alto valor predictivo negativo que fue confirmado en una cohorte de validación (164). Posteriormente se ha utilizado este punto de corte en una cohorte de pacientes R+ (51) y referenciado en el documento de consenso internacional para el control de la infección por CMV en receptores TOS (149).



Diversos estudios han comparado la efectividad de la profilaxis universal frente al tratamiento anticipado y viceversa (157, 165), sin embargo no existe aún un consenso universal para el empleo de cada estrategia según el tipo de trasplante y la clínica de los pacientes.

#### **3.2.4.3. Recomendaciones en el empleo de estrategias de tratamiento frente a CMV**

Debido a las implicaciones clínicas de cada estrategia, no existe un consenso universal para el uso de una u otra estrategia, aunque sí recomendaciones en su uso. Así pues, para los trasplantados de riñón e hígado D+/R-, se aconseja la profilaxis universal frente al tratamiento anticipado. En aquellos centros con ciertas dificultades a la hora de llevar a cabo una estrategia de tratamiento preventivo, la profilaxis universal puede ser adecuada siempre y cuando el objetivo sea exclusivamente prevenir la enfermedad por CMV. En el caso de los trasplantados de corazón o pulmón D+/R-, el uso de profilaxis universal es preferible al tratamiento anticipado debido a los datos disponibles que sugieren una mejor supervivencia de injerto y mejor clínica del paciente (149). En aquellos pacientes con terapia de depleción de linfocitos con timoglobulina también se recomienda la profilaxis como tratamiento para CMV.

Por otra parte, para los pacientes seropositivos (R+), bien sean trasplantados de hígado, riñón, o corazón, cualquier estrategia es aceptable, aunque el tratamiento anticipado es preferible frente a la profilaxis universal, siempre que los requerimientos logísticos del centro lo permitan (149). En caso que se decida usar la estrategia de profilaxis para la prevención de CMV en pacientes R+, es recomendable la administración del fármaco durante al menos 3 meses para los trasplantados de corazón,

hígado, páncreas y riñón, a diferencia de los receptores sometidos a un alto nivel inmunosupresión, donde se recomienda 6 meses de terapia (149).

### **3.3. Fármacos antivirales**

El desarrollo de agentes antivirales y estrategias preventivas durante las décadas pasadas han mejorado significativamente la evolución del paciente trasplantado de órgano sólido (166).

La generación de nuevos antivirales ha disminuido significativamente la morbi-mortalidad por CMV, así como la incidencia de efectos indirectos. El ganciclovir intravenoso o el valganciclovir oral han sido los antivirales recomendados por las guías clínicas para el tratamiento de la infección no grave de CMV, de similar eficacia entre ambos (99, 167, 168), además de ser los antivirales de elección para el tratamiento de la enfermedad por CMV (169). El tratamiento preventivo con valganciclovir oral administrado en receptores de TOS de alto riesgo es capaz de reducir la carga viral hasta el 98% durante 14 días de tratamiento (170). Además, ensayos clínicos realizados en pacientes con enfermedad moderada por CMV que comparan el tratamiento con ganciclovir o valganciclovir durante 3 semanas, demostraron una eficacia y seguridad similar entre ambos compuestos (167). Además, durante 1 año seguimiento de receptores de TOS, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las recurrencias clínicas y virológicas más allá de los 49 días postrasplante entre los brazos de tratamiento (171). Es importante recalcar que la administración del ganciclovir o valganciclovir debe ajustarse de acuerdo al filtrado glomerular, dado que una dosis inadecuada puede causar una falta de eficacia clínica o promover el desarrollo de resistencias, así como generar toxicidad con dosis supratrapéuticas (172, 173).

#### **4. Respuesta inmune frente a citomegalovirus en receptores de TOS**

El control inmunológico de la infección por CMV en receptores TOS engloba tanto los mecanismos adaptativos como los innatos, operando de manera coordinada. En pacientes sanos, el CMV se controla principalmente mediante la respuesta inmune adaptativa, mediada por linfocitos T y B (174). Es por esto que, en receptores de TOS y debido a la inmunosupresión, la respuesta mediada por células T y B puede verse comprometida. La respuesta innata tiene menos relevancia en el control de la infección por CMV, si bien es cierto que variaciones en ésta puede tener un impacto en el riesgo de infección de estos pacientes (69, 175).

##### **4.1. Inmunidad innata**

La respuesta inmune innata representa la primera barrera de defensa natural frente a la infección por CMV. La deficiencia o alteración en algunos receptores de la inmunidad innata ha sido relacionada con el riesgo de desarrollo de enfermedad por CMV en el postrasplante. En este sentido, la lectina fijadora de manosa (MBL, del inglés *mannose-binding lectin*) circula en sangre y tiene afinidad para fijarse a los carbohidratos presentes en gran variedad de bacterias, hongos y virus (176). Una vez reconocidos, se produce la opsonofagocitosis directa de dichos patógenos (177). Se han descrito casos en los que la identificación de polimorfismos en el gen *MBL2*, gen que codifica la proteína MBL, condicionan los valores plasmáticos de la proteína (178), relacionándose con un mayor riesgo de enfermedad por CMV en el postrasplante (175). Por otro lado, los receptores tipo *Toll* (TLR, del inglés *Toll-like receptors*) son proteínas transmembrana que reconocen estructuras repetitivas en la superficie de patógenos y son los encargados de generar una serie de respuestas inmunes necesarias para la activación de la respuesta adaptativa (179). Polimorfismos en el gen *TLR2* se han asociado a un incremento en el

riesgo de enfermedad por CMV debido a una mala transducción de las señales intracelulares (180).

Otro de los componentes del sistema inmune innato, las células *natural killer*, ejercen una función citotóxica y son necesarias para la activación del sistema inmune adaptativo a través de las células T (181, 182), de manera que si no ejercen su función de manera adecuada, la defensa frente a infecciones virales puede verse comprometida, como en el caso de infección por CMV (183). Las células NK, además, pueden controlar la infección por CMV en ausencia de células T y sin terapia antiviral (184).

## **4.2. Inmunidad adaptativa**

La inmunidad adaptativa constituye la línea de defensa por excelencia frente a la infección viral y específicamente frente a CMV y está mediada tanto por linfocitos T (respuesta celular) como por linfocitos B (respuesta humoral).

### **4.2.1. Inmunidad celular**

La respuesta inmune celular específica frente a CMV ha sido ampliamente descrita como el mecanismo principal para el control de la replicación del virus, de hecho los casos de enfermedad o infecciones recurrentes suelen darse en pacientes con leucopenia o con una deficiencia en la respuesta celular (11). Son numerosos los estudios que muestran un mayor riesgo de replicación de CMV ante la presencia de un número reducido de células T CD8<sup>+</sup> específicas de CMV y una falta en la capacidad de producción de IFN $\gamma$  (51, 185).

La presencia de células T específicas frente a CMV fue comprobada por primera vez en un estudio de trasplante de progenitores hematopoyéticos, en el que se observó que la mayoría de pacientes sin inmunidad celular específica desarrollaron enfermedad por

CMV (186). En individuos sanos hasta el 10% de todas las células T circulantes son específicas frente a CMV, pudiendo llegar al 40% en personas mayores lo que demuestra la importancia de la inmunidad celular frente a CMV (187).

La inmunidad mediada por células constituye una respuesta adaptativa fundamental y representa el mecanismo de defensa más importante frente a la infección viral (122, 188, 189). La calidad de la reconstitución inmune desempeña un importante papel en el desarrollo de infecciones postrasplante y la ausencia de reconstitución inmune específica de CMV es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad de órgano por CMV (189, 190). En individuos de mayor riesgo de replicación por CMV se ha descrito un número reducido de células T CD8<sup>+</sup> secretoras de citoquinas (191) y además la falta de control inmunológico se ha correlacionado con la reducción de la producción de IFN- $\gamma$  y no con un número de células T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> específicas de CMV (192). Sin embargo, en general existe menos literatura sobre la respuesta inmune específica frente a CMV en el receptor de trasplante de órgano sólido de bajo riesgo (R+), probablemente por considerarse precisamente con menor riesgo, y los pocos estudios disponibles incluyen un tamaño muestral insuficiente (117, 118). Alguno de estos estudios no encontraron relación entre la respuesta de células T específicas del CMV y la infección tras el trasplante (120, 193). Otros autores han tratado de relacionar la adquisición de la inmunidad positiva antes del trasplante en los receptores de bajo riesgo de infección por CMV para identificar aquellos pacientes que pudieran requerir menor administración de tratamiento o menor supervisión. Sin embargo, los resultados de estos estudios llegaron a conclusiones parciales ya que sólo se caracterizó los CD8 específicos, con cohortes pequeñas o sin estratificación basada en la serología pretrasplante, tratamiento de inducción o el uso de tratamiento anticipado, por lo que son resultados con poca utilidad clínica (190, 191).

En los últimos años en nuestro grupo hemos estudiado la cinética de infección por CMV y el desarrollo de *novo* de la respuesta inmune específica (celular y humoral) frente a CMV en receptores de trasplante de órgano sólido de alto riesgo para la infección por CMV (receptores seronegativos para CMV que reciben un injerto de un donante seropositivo, R-/D+; con tasas de infección tras el trasplante superior al 80%). Estos estudios han sido excepcionalmente útiles para conocer la evolución de la infección por CMV y la caracterización de la respuesta inmune específica de *novo*, ya que se establece el contacto con el virus por primera vez durante la primoinfección. Como resultados de estos estudios hemos sido capaces de caracterizar la cinética y magnitud de la adquisición de la respuesta inmune frente a CMV y establecer puntos de corte de inmunidad específica que se relacionan con la protección frente a la infección: linfocitos T con un fenotipo CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$ , y un conteo en sangre superior a 0.25% (regresión lineal  $r^2$  0.743, correlación de Pearson 0.862;  $p < 0.001$ ) y anticuerpos neutralizantes con títulos superiores a 480 capaces de bloquear la infección de células epiteliales (regresión lineal  $r^2$  0.951, correlación de Pearson - 0.975;  $P < 0.001$ ) (164, 192, 194). Con estos trabajos fuimos los primeros en demostrar en la práctica clínica que ambos parámetros de respuesta inmune específica tienen un efecto protector frente a la infección por CMV, ya que los episodios de replicación tras la adquisición de la inmunidad presentaron cargas virales significativamente más bajas, y fueron aclaradas sin necesidad de tratamiento. Además, los pacientes con ambos tipo de respuesta no desarrollaban eventos de enfermedad tardía (164, 194, 195).

Sin embargo, la población mayoritaria de pacientes de trasplante de órgano sólido son los receptores con serología positiva para CMV de riesgo intermedio de desarrollo de infección tras el trasplante, que tienen como se comentó anteriormente una incidencia considerable de enfermedad por CMV a lo largo de su evolución postrasplante (119, 120)

y es precisamente la población menos estudiada. Dado el impacto clínico de la infección por CMV tras el trasplante, es esencial caracterizar la adquisición de la respuesta celular específica, la respuesta inmune humoral funcional y los niveles de anticuerpos séricos capaces de prevenir la infección y relacionar estos resultados con la progresión clínica en estos pacientes. Esto supondría un importante avance en el conocimiento de un aspecto poco estudiado en el receptor de trasplante de órgano sólido bajo riesgo. Más recientemente en un estudio realizado en una cohorte de pacientes R+ describimos que una respuesta inmune de células T (con conteos de  $CD8^+CD69^+IFN-\gamma^+$  superior a 0.25%) a las 2 semanas y 4 semanas después del trasplante reducía de forma independiente el riesgo de requerir un tratamiento temprano y desarrollar viremia de alto nivel. En ese estudio, después de un análisis intermedio y en base al alto número de pacientes sin respuesta inmune de células T específica frente a CMV a las dos semanas después del trasplante, iniciamos el estudio de la respuesta inmune de células T previo al trasplante. Sin embargo, el número limitado de pacientes con muestra disponible impidió un estudio multivariado para confirmar si la inmunidad específica frente a CMV era un factor de protección independiente para la enfermedad por CMV o establecer puntos de corte para la respuesta inmune de células T específicas de CMV ajustado a las características de la población de SOT de riesgo intermedio que se relacione con la protección frente a la infección en el postrasplante (122).

#### **4.2.2. Inmunidad humoral**

Como consecuencia de su gran inmunogenicidad, la infección por CMV desencadena respuestas robustas de casi todos los compartimentos del sistema inmune, incluyendo las células B. Así, los anticuerpos anti-CMV son detectables de forma temprana durante la fase virémica de la infección. La respuesta humoral frente a CMV se dirige principalmente contra las glicoproteínas de la superficie viral, aunque no

restringidas, tales como la glicoproteína B (gB) y gH o proteínas de tegumento tales como pp65.

El papel de la respuesta mediada por linfocitos B específicos de CMV, específicamente el papel de los anticuerpos neutralizantes en el control de la infección y la enfermedad por CMV, aún no está claro. Sin embargo, estudios previos han subrayado la importancia de la respuesta humoral en el control de la infección por CMV. De hecho, la administración de CMV hiperinmunoglobulina mejoró la supervivencia total, redujo la enfermedad por CMV y las muertes asociadas a la infección por CMV (196). En trabajos realizados en modelos murinos de infección por CMV, se relacionó los anticuerpos neutralizantes con la protección frente a la infección primaria y la reactivación disminuyendo la diseminación de la infección viral (197-199). Además, se ha sugerido que la diseminación de CMV puede prevenirse con anticuerpos neutralizantes presentes en sueros de donantes sanos seropositivos para CMV (200). Diferentes estudios han mostrado que niveles altos de títulos de anticuerpos neutralizantes específicos de CMV se asocian con un pronóstico favorable de la infección por CMV en pacientes infectados por VIH, receptores de trasplante de células madre hematopoyéticas y mujeres embarazadas (201-205). Además, los receptores de trasplantes D+/R- con respuesta inmune de células T específicas frente a CMV y títulos de anticuerpos neutralizantes de células epiteliales >480 estaban 14,2 veces más protegidos frente al desarrollo de infección por CMV que los pacientes sin respuesta inmune (194). Otros estudios han mostrado resultados discordantes en este sentido sin embargo, la mayoría de ellos fueron retrospectivos, incluyeron un tamaño de muestra pequeño y el diagnóstico de infección por CMV se realizó en muchos casos con métodos menos sensibles y no estandarizados y no mostraron datos de la actividad de anticuerpos neutralizantes (206-208).



Por otra parte, la mayoría de los datos disponibles sobre la actividad de anticuerpos neutralizantes frente a CMV han sido realizados en modelos in vitro de infección por CMV utilizando fibroblastos humanos. Sin embargo, datos publicados recientemente demuestran que los niveles de anticuerpos neutralizantes capaces de bloquear la infección de fibroblastos no tienen utilidad clínica como indicador de protección frente a la infección por CMV, mientras que la actividad de anticuerpos neutralizantes de células epiteliales (AbNEI) fue 128 veces mayor frente a CMV en comparación con la actividad neutralizante en fibroblastos (209). Por otra parte, un trabajo publicado en nuestro grupo demostró que los títulos de AbNEI > 480 se asociaron con una disminución de la infección por CMV después del trasplante en receptores TOS de alto riesgo (D+/R-) (194). Esta función de AbNEI estaría además en concordancia con el papel de las células epiteliales como primera barrera durante la infección natural por CMV. Sin embargo, existen pocos datos sobre el papel de los anticuerpos neutralizantes y los niveles de títulos necesarios para la protección frente a la infección por CMV en el contexto del receptor de TOS de riesgo intermedio.

## **5. Monitorización inmunológica en receptores de TOS**

En base a las evidencias publicadas respecto al papel de la respuesta inmune específica en el control de la replicación del virus, el seguimiento de la respuesta inmune específica frente CMV podría ser de mucha utilidad a la hora de predecir el riesgo de desarrollo de infección por CMV en el postrasplante inmediato, sobre todo en los individuos seropositivos (R+) (117, 210).

La mayoría de los datos de la monitorización inmunológica se están disponibles tras el trasplante. Respecto de la evaluación de la inmunidad celular específica de CMV antes del trasplante, existen pocos estudios que muestran que este tipo de inmunidad específica puede tener relación con el riesgo de desarrollo de complicaciones relacionadas con el CMV en el postrasplante (117, 118), aunque no se ha encontrado una asociación independiente entre la inmunidad celular pretrasplante y el desarrollo de viremias de alto grado o la indicación de tratamiento anticipado.

Existen distintos ensayos para la monitorización de la inmunidad celular específica frente a CMV. Los ensayos de ELISPOT (del inglés, *Enzyme-linked immunospot*) o QuantiFERON-CMV evalúan la detección de citoquinas producidas por linfocitos T tras la estimulación antigénica *ex vivo* con péptidos de CMV (211-213). Las principales diferencias entre ambos son: 1) la composición del mix de péptidos diseñados para estimular selectivamente la respuesta de células T CD8<sup>+</sup> (QuantiFERON-CMV) o células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> (ELISPOT); 2) QuantiFERON-CMV evalúa la producción de IFN- $\gamma$  en un volumen de 1ml de sangre completa mientras que ELISPOT considera la producción de IFN- $\gamma$  en un número dado por las células mononucleares de sangre periférica previamente aisladas; 3) QuantiFERON-CMV mide cuantitativamente IFN- $\gamma$  en unidades internacionales mientras que ELISPOT cuantifica las colonias formadoras de *spot* (SFC, del inglés *Spot Forming Colonies*) producidos por un número dado de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, del inglés *Peripheral Blood Mononuclear Cells*).

Por otro lado, la tinción intracelular de citoquinas detectadas a través de citometría de flujo se basa en la detección inmunofenotípica de marcadores extracelulares y de citoquinas intracelulares secretadas tras estimulación antigénica *ex vivo* con una mezcla de péptidos de CMV (51, 194, 214). Una de las ventajas de este método frente a los

anteriores es que ofrece un análisis funcional y cuantitativo amplio de la respuesta inmune celular específica de CMV, sin embargo, presenta como inconveniente la falta de estandarización o el elevado coste en comparación con QuantiFERON-CMV o ELISPOT y un alto grado de especialización del personal que lo ejecuta (11, 215, 216).

En términos de utilidad clínica, el método ideal debería evaluar tanto de forma cuantitativa como funcional las respuestas de células CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>, como puede ofrecer la citometría de flujo. Además, debería ser sencillo, rápido, relativamente barato y reproducible (215). Un estudio reciente que evalúa la respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup> pretrasplante medida por ensayo de QuantiFERON-CMV mostró su asociación con el riesgo de replicación viral por CMV en trasplante renal y pulmonar (210). Otro estudio, llevado a cabo en nuestro grupo, mediante citometría de flujo, caracterizó la respuesta inmune celular pretrasplante y su relación con la infección en el postrasplante, aunque debido al insuficiente tamaño muestral, no se pudo conseguir establecer una asociación independiente de la inmunidad celular pretrasplante con *end-points* como viremias de alto grado o inicio de tratamiento anticipado (51). Otros, mediante ELISPOT, en el que valoran la respuesta de células T específicas del antígeno de CMV IE1 antes del trasplante, dan información sobre el riesgo de infección y enfermedad por CMV tras el trasplante renal (118).

El potencial de la monitorización inmune postrasplante, por su parte, ha sido estudiado por varios grupos de investigación (51, 139, 193, 195, 217, 218), la mayoría de ellos tratando de definir puntos de corte de inmunidad específica de CMV con el objetivo de prevenir infección y/o enfermedad por CMV. La monitorización inmunológica en pacientes de riesgo intermedio tratados con terapia anticipada puede ser de utilidad en guiar la evolución de la infección por CMV y los puntos de corte para iniciar tratamiento antiviral. A pesar de esto, no se han realizado aún ensayos clínicos que evalúen la eficacia

del uso de la respuesta inmune celular específica de CMV en la monitorización del riesgo de infección por CMV en receptores de TOS.

Aunque se ha investigado la utilidad potencial de monitorizar la respuesta de células T específicas de CMV en varios escenarios posteriores al trasplante, es de interés definir los valores de corte para los parámetros inmunes que pueden usarse para determinar el riesgo de infección. Desafortunadamente, estos estudios son escasos (195, 218). Además, el papel desempeñado por otros componentes de la respuesta inmune todavía no está claro (192, 219). Por ejemplo, los niveles de IgG específicos de CMV se usan para establecer el riesgo del receptor de desarrollar infección por CMV después del trasplante; sin embargo, no se ha caracterizado la relación entre los niveles de IgG y el riesgo de infección post-trasplante. En un trabajo reciente de nuestro grupo en el que estudiamos la seroconversión de una cohorte de pacientes receptores de alto riesgo D+/R-, encontramos un patrón heterogéneo de seroconversión en términos de niveles de IgG específicos frente a CMV después del trasplante (220), por lo que no pudimos concluir sobre la utilidad clínica de esta variable como indicador de protección frente a la infección por CMV tras el trasplante.

La presencia de anticuerpos neutralizantes específicos frente a CMV específicos, es difícil de determinar. Otras técnicas de más fácil elaboración como la fijación del complemento o ELISA no miden anticuerpos neutralizantes, y aunque algunos autores los han relacionado con el título de anticuerpos gB (205), pudiendo ser éste un marcador subrogado de la capacidad de neutralización. Además, la mayoría de los datos sobre la capacidad de neutralizar anticuerpos para controlar la infección por CMV provienen de estudios que describen la infección congénita (221). En el contexto del trasplante, se sabe poco sobre el papel y la cinética de los anticuerpos neutralizantes después de la infección primaria. Un meta-análisis que analizó 698 receptores de trasplantes de órganos sólidos

(SOTR) demostró que la administración de hiperinmunoglobulina mejoró la supervivencia total y redujo la enfermedad por CMV y las muertes asociadas al CMV (196).

En previos trabajos también investigamos la cinética de anticuerpos neutralizantes específicos frente a CMV en receptores TOS D+/R- de alto riesgo de infección por CMV que desarrollan de *novo* una amplia gama de anticuerpos neutralizantes con actividad diferencial en células epiteliales. Los niveles de anticuerpos neutralizantes de células epiteliales aumentaron significativamente después de cada episodio de replicación y pudimos definir un valor de corte de anticuerpos neutralizantes de células epiteliales de  $\geq 480$  que se correlaciona con infección por CMV disminuida, menos días de tratamiento y protección completa contra la enfermedad por CMV en pacientes con una respuesta de células T específica de CMV. Este resultado sugiere que los anticuerpos que neutralizan la infección de células epiteliales pueden tener un papel importante en la protección a largo plazo. Nuestros resultados también sugirieron que los anticuerpos neutralizantes de la infección de fibroblastos no tienen utilidad clínica como indicadores de protección frente a la infección por CMV después del trasplante (194).

Sin embargo, no conocemos si estos datos son extrapolables a la población de riesgo intermedio tanto respecto a la protección frente a la infección como los valores de punto de corte necesarios.



## **II. JUSTIFICACIÓN**

La infección por CMV continúa siendo una de las principales causas de morbilidad en receptores de trasplante de órgano sólido. A lo largo de muchos años, la experiencia en este ámbito ha permitido determinar factores de riesgo que permitan prevenir tanto la infección como la enfermedad. De igual modo, disponemos también de antivirales específicos contra el CMV, hecho que ha permitido delimitar las estrategias de tratamiento.

Debido a la alta prevalencia de CMV en la población, la mayoría de los receptores TOS presentan serología positiva (R+) y, por tanto, son considerados de riesgo intermedio de infección por CMV en el postrasplante. Por tanto, la evaluación pretrasplante del estado serológico frente a CMV del donante y receptor se usa como marcador de infección previa, además de estratificar el riesgo de desarrollo de infección tras el trasplante. Así, se asume que los pacientes con serología positiva pretrasplante adquieren inmunidad celular específica de CMV y la capacidad de controlar la infección. La respuesta inmune de células T específica de CMV constituye la principal defensa frente a la infección por CMV y ha sido asociada al aclaramiento espontáneo de la viremia por CMV en pacientes R+, sin embargo hasta ahora los estudios publicados no han demostrado que la presencia de ésta sea un factor independiente de control de la infección por CMV, probablemente en relación a su tamaño muestral.

Aunque la presencia de inmunidad celular específica es un factor importante en el control posterior de la infección por CMV, existen pacientes que a pesar de que ésta es positiva siguen desarrollando enfermedad por CMV o requieren tratamiento antiviral para el control de la infección por CMV. Es por ello, que la presente tesis plantea la necesidad de estudiar otros mecanismos inmunológicos que puedan contribuir al control de la misma. En este sentido, el papel de la respuesta específica de CMV mediada por células B, especialmente la capacidad de los anticuerpos neutralizantes de controlar el desarrollo



de infección y enfermedad por CMV, no está claramente definido en pacientes R+. Existen pocos estudios que evalúen la respuesta humoral en el paciente TOS seropositivos, mostrando resultados contradictorios. Todos los estudios que analizan la respuesta inmune humoral en receptores estos estudios de TOS R+ tienen el problema de haber incluido un pequeño tamaño muestral su carácter retrospectivo y los probables sesgos de información, ya que la variable principal, la infección por CMV, puede no estar bien medida dada la falta de sensibilidad de los métodos empleados y la ausencia de monitorización estrecha. Otro problema importante es la ausencia de métodos estandarizados. La neutralización mediada por anticuerpos frente a CMV en respuesta a la vacunación ha sido estudiada en modelos *in vitro* de fibroblastos sin embargo, ya que CMV es capaz de infectar utilizando diferentes vías, los resultados obtenidos en fibroblastos no serían extrapolables al efecto de los anticuerpos en las proteínas víricas que median la entrada celular específicamente en células epiteliales, que constituyen la primera línea de contacto en la infección por CMV. La presencia de anticuerpos neutralizantes específicos frente a CMV, es difícil de determinar. Otras técnicas de más fácil elaboración como la fijación del complemento o ELISA no miden anticuerpos neutralizantes, y aunque algunos autores los han relacionado con el título de anticuerpos gB, pudiendo ser éste un marcador subrogado de la capacidad de neutralización, estudios más recientes muestran que en la gammaglobulina hiperinmune, la mayoría de los anticuerpos neutralizantes de la entrada en células epiteliales se dirigen frente al complejo gH/gL/UL128/UL130/UL131, mientras que los anticuerpos frente al complejo gH/gL inhiben tan sólo la entrada *in vitro* en fibroblastos.

Dado el impacto clínico de la infección por CMV tras el trasplante, sería esencial caracterizar la respuesta humoral funcional y los niveles de anticuerpos séricos capaces de prevenir la infección de células epiteliales y relacionar estos resultados con la

adquisición de una respuesta celular específica y la progresión clínica en estos pacientes. Esto supondría un importante avance en el conocimiento de un aspecto poco estudiado en el receptor de TOS de riesgo intermedio, como es la inmunidad humoral. Los hallazgos de la presente tesis tendrían una transferencia a la práctica clínica directa, puesto que permitirían una definición más precisa del riesgo de enfermedad por CMV y por lo tanto avanzar en las actuales recomendaciones de tratamiento inmunoguiado y en el individualización de los esquemas diagnósticos y prevención de la infección por CMV en función del riesgo del receptor de TOS.



### **III. HIPÓTESIS**

Las hipótesis de esta tesis doctoral son:

1. La respuesta inmune celular pretrasplante específica de CMV es un factor de protector independiente para el control de la viremia por CMV en receptores de TOS de riesgo intermedio de infección por CMV.
2. Además de la respuesta inmune celular pretrasplante, la respuesta inmune humoral pretrasplante específica de CMV, mediada por anticuerpos neutralizantes de infección en células epiteliales, es relevante en el control de la infección por CMV en receptores de TOS de riesgo intermedio de infección por CMV.
3. Una monitorización guiada por los puntos de corte establecidos tanto de la respuesta inmune celular pretrasplante como de la humoral pretrasplante, junto con el umbral establecido de carga viral, en receptores de TOS de riesgo intermedio de infección por CMV bajo tratamiento anticipado, puede servir de ayuda a los clínicos en el manejo de la infección en estos pacientes.



## **IV. OBJETIVOS**

El **objetivo general** de esta tesis doctoral es caracterizar la respuesta inmune humoral, y su relación con la inmunidad celular específica y el control de la replicación viral en receptores de trasplante de órgano sólido de riesgo intermedio de enfermedad por CMV (R+).

Los **objetivos específicos** son:

1. Analizar la respuesta inmune celular específica frente a CMV y su papel como factor independiente en el control espontáneo de la infección por CMV.
2. Analizar los títulos de anticuerpos neutralizantes capaces de bloquear la infección por CMV en fibroblastos y en células epiteliales.
3. Describir la cinética de los anticuerpos neutralizantes en receptores de trasplante CMV seropositivos en relación a la de la inmunidad celular y su relación con el nivel de replicación viral en este grupo de pacientes.
4. Definir un punto de corte de respuesta inmune pretrasplante celular y humoral específica de CMV con efecto terapéutico a partir del cual el paciente puede controlar espontáneamente la viremia por CMV.





## **V. MATERIALES Y MÉTODOS**

## **1. Diseño, ámbito e inclusión de pacientes**

Se diseñó un estudio de cohortes prospectivo con inclusión consecutiva de pacientes trasplantados de órgano sólido (hepático, renal y hepato-renal) de riesgo intermedio de infección y enfermedad por CMV. El estudio multidisciplinar se llevó a cabo en el Hospital Universitario Virgen del Rocío (HUVR) en Sevilla, previa aprobación por el Comité Ético de Investigación Clínica del HUVR, con dos períodos de inclusión de pacientes, desde enero de 2012 y hasta mayo de 2013 y desde julio de 2015 a octubre de 2016. Todos los pacientes incluidos fueron mayores de 16 años, con serología pretrasplante positiva para CMV, trasplantados de riñón y/o hígado durante el período de inclusión y que tuvieran una supervivencia tras el trasplante superior a 14 días. Pacientes que no dieron su consentimiento informado por escrito para participar en el estudio o aquellos que recibieron tratamiento de inducción con timoglobulina (no aplicable para el estudio piloto, con una cohorte de 23 pacientes R+ TOS, incluido en esta tesis), fueron excluidos del estudio.

## **2. Definiciones**

El receptor de órgano sólido de riesgo intermedio de infección y enfermedad por CMV se define como aquel con serología pretrasplante positiva frente a CMV que recibe un órgano de un donante con serología frente a CMV bien sea positiva o negativa y, además, que no haya recibido tratamiento de inducción con timoglobulina.

Los siguientes términos fueron definidos según las recomendaciones de SET/GESITRA-SEIMC/REIPI para el manejo de la infección por citomegalovirus en receptores de TOS, basados en las definiciones publicadas por Ljungman *et al.* y las guías de consenso internacional (99, 222).

- Infección o replicación por CMV: aislamiento del virus o detección de proteínas virales (antigenemia) o ADN/ARN de CMV en líquido corporal o tejido.
- Viremia por CMV: Detección de CMV en sangre de un paciente
- Enfermedad por CMV: Evidencia de síntomas o signos (síndrome viral o enfermedad de órgano), la mayoría de veces acompañado con detección de infección por CMV en sangre. El síndrome viral se define como la presencia de fiebre ( $>38$  °C) asociado a leucopenia, trombocitopenia o incremento de transaminasas.
- Profilaxis universal: Administración de fármaco antiviral efectivo para prevenir el desarrollo de la infección o enfermedad por CMV en pacientes de riesgo.
- Tratamiento anticipado: administración de tratamiento antiviral en pacientes sin sintomatología clínica relacionada con la infección por CMV.

### **3. Monitorización y seguimiento de los pacientes**

Todos los pacientes incluidos se monitorizarán clínica e inmunovirologicamente hasta 12 meses postrasplante.

En lo que respecta al seguimiento inmunoviroológico, la monitorización de la replicación viral se realizó sobre un tubo EDTA, mediante PCR cuantitativa con la siguiente periodicidad: cada 2 semanas desde el día +14 hasta el día +100 postrasplante, mensualmente desde el día +101 hasta el día +365 postrasplante o en cualquier momento si existe sospecha clínica. Con respecto a la monitorización de la respuesta inmune celular, se realizó sobre un tubo de Heparina de litio, mediante citometría de flujo, previa tinción de marcadores extracelulares (CD3, CD4, CD8 y CD69) y citoquinas intracelulares (IFN- $\gamma$ ), con la siguiente periodicidad: en el momento anterior al trasplante,

cada 15 días hasta el tercer mes y mensualmente desde el mes 3 hasta el 12 y al diagnóstico de la enfermedad por CMV. Respecto de la monitorización de la respuesta inmune humoral, se realizó sobre un tubo EDTA, mediante ensayo de microneutralización para medir el título de anticuerpos neutralizantes en suero con la siguiente periodicidad: en el momento anterior al trasplante, tras cada episodio de replicación y al final de seguimiento. En los pacientes sin replicación viral, ésta se determinará en los meses 3, 6, 9 y 12 tras el trasplante.

Conforme al seguimiento clínico de los pacientes, se recogieron las siguientes variables: variables demográficas (edad y género), factores descriptivos (tipo y etiología del trasplante), factores de riesgo (rechazo de injerto, uso de anticuerpos antilinfocitario, uso de timoglobulina o tipo de inmunosupresión), administración de tratamiento anticipado (fecha de inicio y fin de tratamiento, efectos adversos), enfermedad por CMV (síndrome viral o enfermedad de órgano), duración de la viremia y supervivencia (tanto del injerto como del paciente).

#### **4. Determinación de la serología frente a CMV**

La serología pretrasplante frente a CMV, tanto del donante como del receptor de TOS, se realizó en el Servicio de Microbiología del HUVR mediante inmunoensayo de electro-quimioluminiscencia (ECLIA, Roche).

#### **5. Determinación de la carga viral de CMV**

Se consideró un episodio de replicación al periodo con viremia detectable por encima del límite de detección del ensayo hasta el primer resultado negativo. La

administración de tratamiento anticipado se hizo de acuerdo a: infección sintomática o cargas virales por encima del punto de corte de 3983 UI/ml descrito previamente por nuestro grupo (164).

La determinación de la carga viral de CMV en plasma se realizó en el Servicio de Microbiología del hospital, usando Quant CMV LightCycler® 2.0 PCR Kit (Roche Diagnostics) desde Enero a Abril de 2012, COBAS Ampliprep/COBAS Taqman CMV test (Roche Diagnostics) desde Abril de 2012 hasta Diciembre de 2015 y COBAS 6800 (Roche Diagnostics) desde Diciembre de 2015 hasta Octubre de 2017. Los resultados fueron estandarizados y expresados en unidades internacionales por mililitro (UI/ml) usando la “*WHO International Standard for Human CMV for Nucleic Acid Amplification Technique (National Institute for Biological Standards and Controls, NIBSC 09/162)*”.

## **6. Determinación de la inmunidad celular específica frente a CMV**

La inmunidad de células T específica de CMV fue caracterizada *in vitro* mediante tinción extracelular de receptores de membrana e intracelular de citoquinas, en respuesta a un estímulo antigénico, siguiendo el siguiente procedimiento: primero, se estimulan 500 µl de sangre completa (dentro de las 4h primeras tras la extracción) con 1 µg/ml de cada mezcla de péptidos de CMV procedente de las proteínas pp65 y IE1. Las muestras no estimuladas fueron usadas como control negativo, mientras que las muestras estimuladas con 1,5 µg/ml de ionomicina de Streptomyces y 25 ng/ml de PMA (del inglés, *4-alpha-phorbol 12-myristate 13-acetate*; Sigma Aldrich) fueron usadas como control positivo. Las muestras fueron coestimuladas con 1 µg/ml de CD28/CD49d (Becton Dickinson) y se añadió 10 µg/ml de Brefeldina A (Becton Dickinson) para evitar la secreción de citoquinas. Las muestras fueron incubadas 4 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, seguido de una

incubación de 10 minutos a temperatura ambiente con 5 ml una solución de lisis (*FACS Lysis* (Beckton Dickinson)) para lisar los eritrocitos presentes en la muestra de sangre. Las células fueron lavadas con PBS (del inglés, *Phosphate Buffered Saline* pH 7.2, Gibco Thermo Fisher Scientific) y se procedió a la tinción de receptores de superficie incubando durante 30 minutos en oscuridad con los siguientes anticuerpos antihumanos: PE anti-CD69 (0,04 mg/ml), Alexa Fluor® 700 anti-CD3, PerCP/Cy5.5 anti-CD4 (0,1 mg/ml) y APC/Cy7 anti-CD8 (0,1 mg/ml). Tras la fijación con 50 µl del reactivo IntraPrep 1 (Beckton Dickinson) durante 15 minutos, se lavaron las células con PBS y se permeabilizaron con 50 µl del reactivo IntraPrep 2 durante 1 minuto. Para la tinción intracelular, se usó el anticuerpo anti-humano FITC anti-IFN- $\gamma$  (0,05 mg/ml). Tras incubación durante 15 minutos, las células fueron de nuevo lavadas y resuspendidas en 300 µl de PBS. Treinta mil eventos de células CD3<sup>+</sup> sobre la población total de linfocitos fueron analizados en el citómetro de flujo LSR Fortessa. Los porcentajes de células activadas CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> fueron normalizados al control negativo. Las muestras fueron consideradas positivas cuando el %CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> fue  $\geq 0.25\%$  en dos muestras consecutivas.

## **7. Determinación de la inmunidad humoral específica frente a CMV mediada por anticuerpos neutralizantes**

El título de anticuerpos neutralizantes fue caracterizado por ensayo de microneutralización. Primero, se inactiva el suero y se realizan diluciones seriadas  $\frac{1}{2}$  en DMEM (del inglés, *Dulbecco's modified eagle's medium*) (desde  $\frac{1}{5}$  a  $\frac{1}{2560}$ ). Se incubaron 50 µl de cada dilución con 50 µl de DMEM con CMV (cepas BADUL131-Y4 o AD169) a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 durante 2 horas a 37 °C y 5% de

CO<sub>2</sub>. La mezcla de virus y suero se añade a una monocapa confluyente de células (30.000 células por pocillo, sembradas el día anterior a la infección) y se añaden los correspondientes controles positivos (células infectadas) y negativos (células sin infectar). Tras 48h de incubación, se lavan las células y se fijan con PBS:Acetona (1:4) para posteriormente comenzar con la tinción de células usando anticuerpos monoclonales anti-IE1 de CMV (MAB810R CMV, Clon 8B1.2, Millipore), diluido 1:2000 en 5% de leche en PBS e incubados durante 1h a 37 °C. Tras esto, añadimos el anticuerpo secundario (*HRP-conjugated horse anti-mouse IgG secondary antibody (Cell Signaling)*) diluido 1:1000 y dejamos incubar durante 1 hora. Una vez realizados los lavados correspondientes con PBS para eliminar los restos de anticuerpos secundarios en leche, se añade el sustrato de la peroxidasa HRP, durante 5-10 minutos, que produce una reacción colorimétrica de color azul hasta que se añaden 50 µl de ácido sulfúrico 1N para parar la reacción y poder medir la absorbancia a 450 nm. Definimos el título de anticuerpos neutralizantes como el título en suero que es capaz de reducir el 50% o más de la infectividad del virus comparado con el control de infección usando la siguiente ecuación:  $((DO \text{ media de células VC}) - (DO \text{ media de células CC})) / 2$ , donde DO es la absorbancia o densidad óptica, VC es el control vírico y CC es el control celular. Los experimentos fueron realizados por duplicado para cada paciente y muestra.

## **8. Análisis estadístico**

Se llevó a cabo un análisis descriptivo de las variables. Las variables categóricas fueron analizadas mediante el test de Chi-cuadrado o el test exacto de Fisher. Las variables continuas fueron analizadas mediante el test de la *t* de Student, test de Welch o test de Mann-Whitney-Wilcoxon. Las correlaciones bivariadas entre variables



cuantitativas fueron expresadas mediante el coeficiente de correlación de Pearson o Spearman, según aplique. La asociación fue expresada mediante odds ratio (OR)  $\pm$  un intervalo de confianza del 95% (95% IC). La asociación fue considerada estadísticamente significativa cuando los valores de  $P$  estuvieron por debajo de 0,05. Los puntos de corte para el título de anticuerpos neutralizantes y la respuesta inmune celular específicos de CMV potencialmente predictivos de evolución clínica fueron inicialmente explorados mediante un análisis en árbol de clasificación y regresión (CART, CART Software 8.0, Salford Systems). Para el análisis del impacto independiente de los títulos de anticuerpos neutralizantes específicos de CMV en la viremia por CMV  $<1000$  UI/ml, se realizó un análisis univariante de las variables asociadas. Los modelos de regresión logística multivariante fueron usados para: a) evaluar los posibles factores confusores del impacto de la inmunidad celular específica de CMV en la indicación de tratamiento anticipado o en la presencia de viremias por CMV  $>2000$  UI/ml y b) evaluar la asociación independiente entre los puntos de corte de la respuesta inmune celular y de anticuerpos neutralizantes específicos de CMV, otras variables seleccionadas en el análisis CART (género y trasplante de riñón) y el desarrollo de viremias  $>1000$  UI/ml. Las interacciones potenciales entre variables fueron estudiadas y sólo aquellas con un efecto significativo fueron introducidas en el modelo final. La capacidad predictiva del modelo de regresión logística fue calculada mediante curva ROC (del inglés, *Receiver-operator characteristic curve*). Los factores confusores potenciales y las interacciones fueron introducidas en el modelo si el valor de  $P$  en el univariante era  $<0,20$  o si el valor de  $P$  en el bivariante era  $<0,05$ . En todos los análisis estadísticos, las condiciones de aplicación fueron comprobadas para ser aplicadas en cada test. Para evitar la multicolinealidad, el valor del factor de inflación de la varianza (VIF) fue calculado. Todos los análisis fueron realizados usando SPSS 18.0 (SPSS, Chicago, IL).



## **VI. RESULTADOS**

**La publicación de una parte de esta tesis, concretamente, el contenido susceptible de publicación que afecta al apartado Resultados y a los Artículos 1 y 2 del Anexo I, se demorará debido a que se prevé su publicación en los próximos meses. Por tanto, se ha solicitado una demora de 12 meses mínima para su publicación desde su defensa y aprobación.**

## **Artículo 1**

**Impact of pre-transplant CMV-specific T-cell immune response in the control of CMV infection after solid organ transplantation: a prospective cohort study.** Molina-Ortega, Alejandro; Martín-Gandul, Cecilia; Mena-Romo, Juan; Rodríguez-Hernández, María J; Suñer, Marta; Bernal, Carmen; Sánchez, Magdalena; Sánchez-Céspedes, Javier; Pérez-Romero, Pilar; Cordero Elisa.

Manuscrito en segunda revisión, remitido a la revista *Clinical Microbiology and Infection*.

## **Artículo 2**

**Impact of pre-transplant antibodies neutralizing epithelial cell infection in solid organ transplant recipients at intermediate risk for CMV infection.** Alejandro Molina-Ortega, Cecilia Martín-Gandul, Marta Suñer, Belén Gutiérrez-Gutiérrez, Juan Damián Mena-Romo, Pilar Blanco-Lobo, María Jesús Rodríguez-Hernández, Carmen Bernal, Magdalena Sánchez, Javier Sánchez-Céspedes, Pilar Pérez Romero, Elisa Cordero.

Manuscrito enviado a *Clinical Infectious Diseases*.



## **VII. DISCUSIÓN**

La discusión de los resultados obtenidos en esta tesis doctoral se detalla a continuación:

### **Papel de la inmunidad celular específica de CMV en el control de la infección y enfermedad por CMV en receptores de TOS R+ que reciben tratamiento anticipado**

La combinación del estatus serológico frente a CMV del donante y del receptor utilizada en el pretrasplante para establecer el riesgo de desarrollar infección por CMV en el postrasplante podría no ser suficiente por los siguientes motivos. En primer lugar, existe una discordancia en los datos de serología e inmunidad celular pretrasplante ya que sólo un tercio de los pacientes R+ TOS con serología pretrasplante positiva frente a CMV presentan una respuesta celular específica frente a CMV antes del trasplante. La proporción de pacientes con inmunidad celular positiva en el pretrasplante varía en función del estudio, oscilando entre el 30% y el 70%, aproximadamente (51, 210, 218, 223-226). Esta oscilación podría ser debida a diferencias entre los métodos utilizados para determinar la inmunidad celular, así como de los puntos de corte establecidos como positivos para cada uno de los métodos utilizados.

En un estudio previo a la realización de esta tesis publicado por nuestro grupo, se demostró que la evolución de la respuesta inmune celular específica frente a CMV tras el trasplante tenía una clara relación con la inmunidad celular previa al trasplante (51). De hecho, todos los pacientes con inmunidad celular pretrasplante también tenían inmunidad celular detectable tras el trasplante. Estos hechos están en concordancia con los mostrados en esta tesis, ya que encontramos que en los pacientes con inmunidad celular pretrasplante específica frente a CMV, a pesar de detectarse un descenso en los niveles de células T  $CD8^+CD69^+INF\gamma^+$  durante los primeros días tras el trasplante, todos los pacientes desarrollaron inmunidad celular durante los dos primeros meses postrasplante. En

cambio, la evolución de la respuesta inmune celular en pacientes sin inmunidad celular pretrasplante es claramente diferente, recordando a la cinética observada en pacientes de alto riesgo de infección por CMV (R-/D+) (194, 195), ya que tan sólo el 46% de los pacientes sin inmunidad pretrasplante adquieren inmunidad celular en el postrasplante, y esta se detecta de manera más tardía, con una detección posterior a los 3 meses tras el trasplante.

Así pues, los receptores de TOS R+ con inmunidad celular pretrasplante negativa podrían considerarse como de alto riesgo y se beneficiarían de recibir tras el trasplante bien tratamiento frente a la infección por CMV consistente en profilaxis universal o bien tratamiento anticipado acompañado de una monitorización más estrecha a lo largo del trasplante, dado que se prevé que estos pacientes desarrollen inmunidad celular de forma más tardía en comparación con los pacientes con inmunidad celular pretrasplante y, por tanto, podrían estar más expuestos al desarrollo de infección por CMV. Sería necesario ampliar los resultados existentes a través de ensayos clínicos aleatorizados para confirmar esta hipótesis.

Del mismo modo, a pesar de que no pudimos estudiar y analizar en profundidad la relación entre la respuesta de células T específicas de CMV y el desarrollo de enfermedad, por la baja incidencia de ésta última en los receptores de TOS R+, todos los pacientes que presentaron enfermedad por CMV carecían de una respuesta inmune celular pretrasplante específica frente a CMV, resultados muy semejantes a los obtenidos por Mena-Romo *et al.* Como consecuencia de la baja incidencia de enfermedad en la cohorte estudiada, decidimos utilizar como marcador subrogado de enfermedad, el desarrollo de viremias de alto grado (>2000 UI/ml) y la indicación de tratamiento antiviral. Así pues, y en consonancia con estudios previos (51), encontramos una asociación estadísticamente significativa e independiente de otros factores confusores, entre la presencia de



inmunidad celular pretrasplante y el desarrollo de viremias >2000 UI/ml o la indicación de tratamiento antiviral.

Varios estudios han demostrado que existe una asociación de la respuesta inmune de células T específica de CMV con el aclaramiento espontáneo de la viremia por CMV en receptores TOS R+ (51, 185, 193, 195, 218, 227). Sin embargo, un porcentaje significativo de pacientes (que varía según los estudio entre el 3% y el 19%) con respuesta inmune celular desarrolla infección y enfermedad por CMV en el postrasplante (51, 119-122, 164, 228).

A pesar de que la inmunidad celular postrasplante, considerado como el porcentaje de células T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> productoras de IFN $\gamma$   $\geq$ 0,25%, se asoció de forma independiente con el control espontáneo de la infección por CMV, este factor por sí sólo no mostró ser un factor de predicción válido para delimitar qué pacientes controlarán o no la infección. El área bajo la curva (AUC; del inglés, *Area Under the Curve*) resultó ser bajo y el valor predictivo negativo (VPN) y el valor predictivo positivo (VPP) de esta determinación no fueron lo suficientemente altos para validar este factor. El aumento del punto de corte utilizado de inmunidad celular a valores de porcentaje de células T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> productoras de IFN $\gamma$  superiores a 0,25% no mejoró la capacidad de predicción de este valor ya que se obtuvieron valores de AUC, VPN y VPP muy bajos. El punto de corte empleado debería ser lo suficientemente restrictivo para asegurar que la inmunidad celular sea capaz de proporcionar protección frente a la infección y enfermedad por CMV y que no sea lo suficientemente alto como para inducir la administración de tratamiento anticipado en pacientes que pueden controlar por sí solos la infección.

Estos resultados sugieren que deben existir otros factores además de la inmunidad celular específica frente a CMV que podrían estar implicados en el control de la viremia por CMV.

### **Papel de la inmunidad humoral en el control de la infección y enfermedad por CMV**

El impacto de la respuesta humoral, mediada por anticuerpos neutralizantes, en el control de la infección por CMV apenas ha sido estudiado. La mayoría de datos disponibles en relación a la actividad de anticuerpos neutralizantes han sido llevados a cabo en modelos *in vitro* usando fibroblastos humanos, sin embargo CMV infecta también a un número variado de tipos celulares como son las células epiteliales, endoteliales, células del músculo liso y macrófagos, siendo de especial relevancia las células epiteliales ya que representa la primera barrera de infección por CMV a partir de la cual se disemina a otras células, tejidos u órganos (28). Una de las cepas de CMV, modificada para su uso en laboratorios de investigación, más usada en modelos de fibroblastos de infección por CMV para el estudio de anticuerpos neutralizantes es la cepa AD169 (4), la cual ha sido ampliamente utilizada en modelos de infección por CMV de fibroblastos. Sin embargo tiene la peculiaridad de no poder infectar células epiteliales ya que contiene una mutación que implica un cambio en la pauta abierta de lectura del locus UL128-131, haciendo que el complejo pentamérico gH/gL/pUL128-131a no sea funcional y, por tanto, le impide el reconocimiento del receptor en la célula epitelial y la formación del complejo de infección (229). Por tanto, la mayoría de los resultados descritos sobre anticuerpos neutralizantes específicos de CMV están realizados en fibroblastos. En este contexto, se han publicado resultados discordantes entre ellos el estudio de Chou *et al.* en el que no encontraron una asociación entre los niveles altos de anticuerpos neutralizantes capaces de bloquear la infección en fibroblastos y las viremias por CMV (206). Sin embargo, en otro estudio observaron que en pacientes D+/R- que

desarrollaban enfermedad por CMV carecían de respuesta de anticuerpos neutralizantes (207). En estudios previos además se demostró que los niveles de anticuerpos neutralizantes capaces de bloquear la infección de fibroblastos no tenían valor clínico en la predicción de control de la infección (209), por este motivo se descartó la determinación de los anticuerpos neutralizantes en el modelo de fibroblastos y se llevó a cabo sólo en células epiteliales.

En esta tesis presentamos un estudio en el que hemos determinado en muestras pretrasplantes los niveles de anticuerpos neutralizantes capaces de bloquear la infección en células epiteliales humanas (AbNEI) y demostramos que, en pacientes R+ TOS, el tener un título pretrasplante de AbNEI específicos de CMV >640 previene del desarrollo de viremias con cargas virales pico >1000 IU/ml en el 95% de los casos, punto de corte similar al ya obtenido por Blanco-Lobo *et al.* en receptores de TOS de alto riesgo de infección por CMV (194). De esta manera, hemos demostrado por primera vez una asociación directa entre el nivel de AbNEI pretrasplante y el riesgo de infección por CMV tras el trasplante en pacientes R+ TOS de riesgo intermedio de infección por CMV, revelando su posible utilidad clínica para estratificar el riesgo de infección por CMV postrasplante.

La mayoría de pacientes (81%) con un título de AbNEI >640 en el pretrasplante mantiene la inmunidad de anticuerpos en el postrasplante, que se asocia a protección frente a la enfermedad por CMV ya que ningún paciente con título de AbNEI >640 desarrolló enfermedad por CMV postrasplante. Estos resultados están en concordancia con los ya publicados por nuestro grupo en una cohorte de receptores de TOS de alto riesgo (194), donde ninguno de los pacientes con un título de AbNEI superior a 480 desarrolló enfermedad por CMV. Otro dato a destacar al comparar los resultados analizados esta tesis con los obtenidos anteriormente por nuestro grupo en receptores de

alto riesgo es la detección de la respuesta inmune postrasplante. En los receptores de TOS de alto riesgo, el 90% de los pacientes llegan a final de seguimiento con una respuesta inmune celular positiva, mientras este porcentaje fue menor en el 65% de los pacientes R+ TOS, que podría estar relacionado con el aumento del punto de corte para inmunidad celular (0,25% vs. 0,35%). Sin embargo, no ocurre lo mismo con la inmunidad humoral, donde observamos que, mientras que el 80% de los pacientes R+ posee un título de AbNEI >640 al séptimo mes postrasplante, tan solo el 35%, aproximadamente, de los pacientes de alto riesgo consigue tener una respuesta de AbNEI superior a 480, que podría estar relacionado con el contacto previo del virus en la población de pacientes R+ TOS.

### **Impacto de la respuesta inmune celular y humoral específica en el control espontáneo de la infección por CMV en el receptor de TOS**

Como mencionamos anteriormente, se ha sugerido la posibilidad de que además de la inmunidad celular específica frente a CMV otros componentes del sistema inmunológico puedan estar implicados en el control de la viremia, como la respuesta mediada por anticuerpos neutralizantes. Hasta la fecha, muy pocos son los estudios que han estudiado el efecto de estas dos variables en conjunto, inmunidad celular y anticuerpos neutralizantes específicos de CMV, en el control de la infección por CMV (194), y tampoco se han podido establecer asociaciones independientes entre dichas variables y el desarrollo de infección por CMV postrasplante. Durante el desarrollo de esta tesis hemos analizado y evaluado de forma conjunta la respuesta de anticuerpos neutralizantes y de células T específicas de CMV a través de un análisis de clasificación y regresión en árbol (CART). Mediante este análisis exploramos los siguientes puntos de corte en el pretrasplante potencialmente predictivos de evolución clínica en pacientes R+ TOS a) el título de anticuerpos neutralizantes y b) la respuesta de células T específicas de CMV. Del resultado de este análisis es importante destacar los siguientes aspectos. En

primer lugar que la primera variable seleccionada, y como tal la que mayor relevancia tiene en el control de la infección por CMV, fue el título de anticuerpos neutralizantes, independientemente de la respuesta inmune celular específica. En segundo lugar, se pudimos establecer puntos de corte tanto de anticuerpos neutralizantes como de inmunidad celular específicos de CMV que permitían identificar pacientes con mayor riesgo de presentar viremias superiores a 1000 UI/ml. Por último, también identificamos que el control espontáneo de la viremia tenía relación con el tipo de órgano trasplantado y con el género del paciente. De esta manera encontramos que, más del 90% de los pacientes que tienen un título pretrasplante de AbNEI  $>640$ , aquellos que tienen un título pretrasplante de AbNEI  $\leq 640$  y un  $\%CD8^+CD69^+IFN-\gamma^+ > 0,35$  (sin tener en cuenta el tipo de trasplante), o ser mujer trasplantada de riñón con una respuesta de anticuerpos neutralizantes  $\leq 640$  y un  $\%CD8^+CD69^+IFN-\gamma^+ \leq 0,35$  pretrasplante, controlan espontáneamente la infección por CMV en el postrasplante. Por el contrario, pacientes con una respuesta de anticuerpos neutralizantes  $\leq 640$  y un  $\%CD8^+CD69^+IFN-\gamma^+ \leq 0,35$ , los trasplantados hepáticos y los trasplantados varones (sólo en el caso del trasplante renal) desarrollan viremias en aproximadamente el 40% de los casos, con cargas virales pico  $\geq 1000$  UI/ml. Así pues, estos datos sugieren que en este grupo de pacientes, aun siendo clasificados como pacientes con riesgo intermedio en función de su estatus serológico pretrasplante, sería recomendable un seguimiento más cercano de la evolución de la viremia por CMV tras el trasplante.

Estos datos fueron confirmados a través de un análisis multivariante, donde aquellos pacientes con niveles de anticuerpos neutralizantes  $>640$  presentaban mayor ratio de oportunidad de desarrollar viremias  $<1000$  UI/ml (OR (IC95%) 29,59 (2,47-354,54)) respecto del resto. La capacidad predictiva del modelo de regresión logística también fue confirmada a través de una curva ROC, demostrando la validez de los resultados

obtenidos. El modelo desarrollado mejora significativamente el modelo en el que sólo se incluye la inmunidad celular específica de CMV sugiriendo la importancia de los anticuerpos neutralizantes en el control de la infección por CMV.

### **Género y riesgo de infección por CMV**

En los últimos años, se ha demostrado que la respuesta inmune puede verse influenciada en función del género de los pacientes estudiados (230). La relación entre el sexo y la enfermedad por CMV apenas ha sido estudiada puesto que, al igual que ocurría en nuestra serie, esta variable no suele relacionarse con la infección por CMV en el análisis bivariante y rara vez es introducida en modelos multivariantes (231). Existen pocos estudios en los que se esta variable haya sido analizada. Freeman *et al.* mostraron que las mujeres receptoras de TOS tenían una mayor predisposición a desarrollar infección o enfermedad por CMV respecto a los hombres (232). Sin embargo, otros autores no están de acuerdo ya que, aunque se ha publicado una mayor incidencia de infección por CMV en mujeres, podría justificarse en base a los siguientes hechos: a) no haber incluido el género como variable en el análisis multivariante cuando no se había encontrado asociación significativa en el análisis bivariante (231), b) diferencias en el tipo de población de trasplante estudiada (trasplante alogénico vs. TOS) (231), c) tamaño muestral pequeño (233), d) diferencias inmunológicas basadas en el sexo (230), e) no realizar análisis multivariante (234) o f) diferencias en el punto final primario estudiado (sepsis vs. infección por CMV y enfermedad) (235).

En nuestro estudio, ser mujer trasplantada de riñón se asoció de manera independiente con la protección frente al desarrollo de viremias >1000 UI/ml, hecho que puede ser explicado debido a que las mujeres tienden a mostrar una mejor respuesta de anticuerpos que los hombres, además de un mayor número de células B y mayores niveles

de inmunoglobulinas y un aumento de la expresión de los genes en las células B (236-238).

### **Relación entre la terapia de inducción con basiliximab y la infección por CMV**

Durante los últimos años, los avances en los regímenes de inmunosupresión y en el tratamiento de los episodios de rechazo agudo han mejorado considerablemente la supervivencia del injerto tras el trasplante (239-241). Sin embargo, la terapia para el rechazo agudo incrementa el riesgo de infecciones oportunistas, como las infecciones por herpes virus (242). Pacientes con terapia para el rechazo agudo tienen hasta 13 veces más riesgo de recibir tratamiento anticipado para infecciones por CMV (243). La terapia de inducción con timoglobulina también ha sido asociada con la infección y enfermedad por CMV (137, 244), por este motivo y dado que descienden los niveles de células T en el receptor TOS, se aconseja recibir profilaxis universal para el tratamiento de la infección por CMV (149). Sin embargo, el uso de basiliximab no produce ningún cambio en la estrategia profiláctica (149). A pesar de que los pacientes que recibían tratamiento para evitar el rechazo agudo con rATG fueron excluidos en este estudio, conseguimos demostrar mediante análisis multivariante la asociación independiente de la inducción con basiliximab y el inicio de la terapia antiviral, presentando un riesgo 2,5 veces mayor aquellos pacientes que recibían basiliximab como terapia de inducción. Aunque la mayoría de estudios publicados asocian un menor riesgo de infección por CMV con el uso de basiliximab en comparación con rATG (245), el riesgo de infección sigue siendo considerable.

**Papel de la inmunidad celular específica de CMV en el control de la infección y enfermedad por CMV en pacientes que reciben inducción por timoglobulina y profilaxis para CMV**

En el presente estudio se ha analizado el papel de la respuesta inmune celular específica frente a CMV en el pretrasplante en pacientes con TOS de riesgo intermedio R+, nuestros resultados indican que los pacientes que en el pretrasplante tienen respuesta celular específica frente a CMV desarrollan más precozmente la inmunidad celular postrasplante, alcanzando mayores niveles de células T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> respecto a aquellos sin inmunidad celular pretrasplante. Estos resultados sugieren que la monitorización de la respuesta inmune celular pretrasplante junto con la serología de CMV podría ser de utilidad para la estratificación del riesgo de infección por CMV tras el trasplante. Estos datos pudieron ser corroborados en un estudio realizado en paralelo por nuestro grupo en el que se estudió en una cohorte similar de receptores de TOS a los que se les administró terapia de inducción con rATG para evitar rechazo agudo y se le administró profilaxis universal para evitar la infección por CMV durante los primeros 100 días postrasplante. Los resultados obtenidos en los pacientes de esta cohorte sugieren la hipótesis de que aquellos pacientes con inmunidad celular pretrasplante se les podrían proponer el tratamiento anticipado como tratamiento de los eventos de infección por CMV tras el trasplante en lugar de la profilaxis universal. Sin embargo, sería necesario realizar ensayos clínicos randomizados con un mayor tamaño muestral para verificar esta hipótesis.

Previamente al trabajo presentado en esta tesis se llevó a cabo en nuestro grupo, se estudió una cohorte de receptores de TOS seropositivos (sin inducción por



timoglobulina) y más del 90% de los pacientes con respuesta inmune celular pretrasplante alcanzaron una respuesta inmune celular al mes postrasplante (51). Además, tener inmunidad positiva constituye un factor de protección frente al desarrollo de viremias de alto grado y tratamiento anticipado.

Aunque otros estudios han demostrado también, utilizando ensayos como QuantiFERON-CMV o ELISPOT (118, 210), que los pacientes con inmunidad celular pretrasplante positiva específica frente a CMV tienen menor riesgo de infección por CMV tras el trasplante respecto a aquellos con inmunidad celular pretrasplante negativa, nuestro laboratorio ha sido pionero en el análisis de la respuesta inmune celular específica frente a CMV utilizando citometría de flujo antes y después del trasplante en pacientes que reciben inducción con timoglobulina y profilaxis frente a la infección por CMV. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que más del 40% de los pacientes tienen respuesta inmune celular durante el periodo de tratamiento profiláctico. Existen datos similares en un estudio en receptores de TOS de alto riesgo publicado en el que se usó QuantiFERON-CMV para determinar la respuesta inmune celular, en el que aproximadamente el 27% de los pacientes tenían respuesta inmune celular en el momento de la suspensión de la profilaxis (193).

Además, nuestros datos demuestran que los pacientes con inmunidad pretrasplante no desarrollan episodios de infección en el postrasplante. De hecho aunque se ha relacionado el uso de inducción con timoglobulina con mayor riesgo de infección por CMV. En un ensayo clínico randomizado que incluyó a más de 600 pacientes trasplantados renales, no se pudo relacionar la inducción por rATG con una mayor incidencia de infección por CMV en comparación con otras terapias de inmunosupresión (138). Por tanto, no está del todo claro si el incremento en la incidencia de infección por

CMV podría estar relacionado con el uso de timoglobulina y, consecuentemente, estos pacientes podrían no ser pacientes de alto riesgo de infección por CMV.

Se ha analizado el impacto de agentes como el basiliximab o la timoglobulina en la respuesta inmune de células B y T en pacientes trasplantados renales (246, 247). Concretamente en un estudio se evaluó la respuesta inmune frente a la vacunación por influenza en pacientes que recibían basiliximab vs. rATG y no se encontraron diferencias significativas en la respuesta entre ambos grupos (247). Otros estudios han evaluado el efecto de la reconstitución tras el trasplante de la inmunidad celular específica frente a CMV en pacientes R+ que reciben tratamiento anticipado y tampoco encontraron diferencias significativas en aquellos que recibían terapia de inducción (139, 248).

Por tanto, y en base a los resultados expuestos la inducción por timoglobulina tendría un impacto limitado en la recuperación de la respuesta inmune específica de CMV y en la incidencia de infección por CMV.

La presente tesis tiene las siguientes limitaciones:

En primer lugar, en esta tesis se ha demostrado el papel de la respuesta inmune celular y de anticuerpos neutralizantes determinados en el pretrasplante sobre el control de la infección por CMV postrasplante. Sin embargo, dichas determinaciones fueron realizadas el día del trasplante y no podemos asegurar que otras muestras obtenidas en tiempos distintos anteriores al trasplante ofrezcan resultados similares, debido a que la enfermedad terminal del paciente podría afectar a su estado inmunitario y en consecuencia, a la respuesta inmune celular específica de CMV.

En segundo lugar, la tinción intracelular de citoquinas utilizando citometría de flujo es una técnica difícil de estandarizar en comparación con otras como el QuantiFERON-CMV o el ELISPOT. Por tanto, sigue siendo una limitación para este estudio la extrapolación de estos resultados a otros centros por falta de estandarización entre las determinaciones, así como la complejidad y subjetividad de la técnica para analizar la respuesta inmune celular específica frente a CMV.

Debido a la baja incidencia de enfermedad por CMV en esta cohorte no hemos podido encontrar una asociación significativa entre tener inmunidad celular o de anticuerpos neutralizantes específicos de CMV en el pretrasplante y el desarrollo de enfermedad por CMV tras el trasplante. En este caso, utilizamos como variables subrogadas de enfermedad por CMV, el desarrollo de viremias de alto grado o la administración de tratamiento anticipado.

Por último, los modelos y puntos de corte establecidos en el presente trabajo respecto a la inmunidad celular y de anticuerpos neutralizantes específicos de CMV sólo podrían aplicarse a pacientes R+ TOS como los descritos en esta cohorte. Su extrapolación a otros receptores de trasplante de órgano sólido como los receptores de alto riesgo (D+/R-) o en receptores de progenitores hematopoyéticos debería ser validada en estudios con otras cohortes externas.

En resumen, los resultados de la presente tesis demuestran por primera vez que los anticuerpos neutralizantes específicos de CMV capaces de bloquear la infección en células epiteliales tienen un papel principal en el control espontáneo de la viremia por CMV en receptores de TOS de riesgo intermedio de enfermedad por CMV (R+). Por tanto, el desarrollo de inmunidad de anticuerpos neutralizantes con títulos superiores a

640 debería tenerse en cuenta en los modelos junto con la inmunidad celular específica frente a CMV ( $CD8^+CD69^+INF\gamma^+ >0,35\%$ ) para definir aquellos pacientes con riesgo muy bajo de infección por CMV y aquellos con riesgo intermedio. Además ambos factores podrían tenerse en cuenta junto con la serología en el pretrasplante para definir el riesgo de infección y planificar las estrategias de prevención de la enfermedad por CMV postrasplante.



## **VIII. CONCLUSIONES**

1. La presencia de una respuesta inmune de células T pretrasplante específica de CMV es un factor independiente de control espontáneo de la infección por CMV en R+ de TOS.
2. El desarrollo de una respuesta inmune celular específica de CMV previa al trasplante está relacionada con la detección y la evolución de la inmunidad celular tras el trasplante.
3. Teniendo en cuenta que la incidencia de enfermedad por CMV es baja en nuestra cohorte, todos los pacientes que desarrollaron enfermedad por CMV durante el seguimiento carecían de respuesta celular específica frente a CMV en el pretrasplante.
4. El uso de basiliximab como terapia de inducción es un factor independiente de riesgo de indicación de tratamiento antiviral anticipado en pacientes R+ SOT.
5. En este estudio confirmamos que los niveles de anticuerpos neutralizantes específicos de CMV capaces de bloquear la infección de fibroblastos no tienen relación clínica con la evolución de la infección por CMV tras el trasplante.
6. Los anticuerpos neutralizantes específicos de CMV capaces de bloquear la infección de células epiteliales son el principal factor protector de desarrollo de viremias de alto grado en receptores de TOS R+.

7. Títulos de anticuerpos neutralizantes específicos de CMV capaces de bloquear la infección de células epiteliales  $\leq 640$  es un factor independiente de riesgo de desarrollo de viremias  $\geq 1000$  UI/ml.
8. En pacientes con títulos de anticuerpos neutralizantes capaces de bloquear la infección de células epiteliales  $\leq 640$  y una respuesta de células T  $> 0,35\%$ , específicos de CMV, el riesgo de desarrollar infección es menor respecto de aquellos cuya respuesta de células T  $\leq 0,35\%$ .
9. Ser receptor de trasplante renal varón, con riesgo intermedio de infección por CMV (R+), se asoció de manera independiente con el desarrollo de viremias  $\geq 1000$  UI/ml.
10. A pesar de que la inmunidad celular específica frente a CMV pretrasplante se asocia de forma independiente al control espontáneo de la infección por CMV, es insuficiente para definir con VPP y VPN suficientemente elevado pacientes con riesgo intermedio de enfermedad por CMV.
11. Tanto la respuesta de anticuerpos neutralizantes de infección en células epiteliales como la respuesta inmune celular específicas de CMV deberían ser consideradas en el pretrasplante junto a la serología para identificar el riesgo de infección por CMV e individualizar la terapia preventiva frente a CMV en el postrasplante en pacientes R+ TOS.





## **IX. ANEXO I**

**La publicación de una parte de esta tesis, concretamente, el contenido susceptible de publicación que afecta al apartado Resultados y a los Artículos 1 y 2 del Anexo I, se demorará debido a que se prevé su publicación en los próximos meses. Por tanto, se ha solicitado una demora de 12 meses mínima para su publicación desde su defensa y aprobación.**

## **Artículo 1**

**Impact of pre-transplant CMV-specific T-cell immune response in the control of CMV infection after solid organ transplantation: a prospective cohort study.** Molina-Ortega, Alejandro; Martín-Gandul, Cecilia; Mena-Romo, Juan; Rodríguez-Hernández, María J; Suñer, Marta; Bernal, Carmen; Sánchez, Magdalena; Sánchez-Céspedes, Javier; Pérez-Romero, Pilar; Cordero Elisa.

Manuscrito en segunda revisión, remitido a la revista *Clinical Microbiology and Infection*.

## **Artículo 2**

**Impact of pre-transplant antibodies neutralizing epithelial cell infection in solid organ transplant recipients at intermediate risk for CMV infection.** Alejandro Molina-Ortega, Cecilia Martín-Gandul, Marta Suñer, Belén Gutiérrez-Gutiérrez, Juan Damián Mena-Romo, Pilar Blanco-Lobo, María Jesús Rodríguez-Hernández, Carmen Bernal, Magdalena Sánchez, Javier Sánchez-Céspedes, Pilar Pérez Romero, Elisa Cordero.

Manuscrito enviado a *Clinical Infectious Diseases*.

**En esta tesis existe un contrato de cesión de derechos que afecta al siguiente artículo publicado, por lo que, en sustitución de este artículo, se hace constar su referencia bibliográfica.**

*Presentación de otros resultados relacionados con esta tesis*

### **Artículo 3**

***Transplant Infectious Disease* 2018 Jun;20(3):e12883**

**Kinetic of the CMV-specific T-Cell Immune Response and CMV infection in CMV-seropositive kidney transplant recipients receiving anti-thymocyte globulin induction therapy: A pilot study.**

Martín-Gandul C, Perez-Romero P, Mena-Romo D, Molina-Ortega A, González-Roncero FM, Suñer M, Bernal G, Cordero E; Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI)



## **X. BIBLIOGRAFÍA**

1. Gandhi MK, Khanna R. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *The Lancet Infectious diseases*. 2004;4(12):725-38.
2. Davison AJ, Dolan A, Akter P, Addison C, Dargan DJ, Alcendor DJ, et al. The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *The Journal of general virology*. 2003;84(Pt 1):17-28.
3. Dunn W, Chou C, Li H, Hai R, Patterson D, Stolc V, et al. Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(24):14223-8.
4. Murphy E, Rigoutsos I, Shibuya T, Shenk TE. Reevaluation of human cytomegalovirus coding potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(23):13585-90.
5. Yu D, Silva MC, Shenk T. Functional map of human cytomegalovirus AD169 defined by global mutational analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(21):12396-401.
6. Chee MS, Bankier AT, Beck S, Bohni R, Brown CM, Cerny R, et al. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Current topics in microbiology and immunology*. 1990;154:125-69.
7. Chen DH, Jiang H, Lee M, Liu F, Zhou ZH. Three-dimensional visualization of tegument/capsid interactions in the intact human cytomegalovirus. *Virology*. 1999;260(1):10-6.
8. Varnum SM, Streblow DN, Monroe ME, Smith P, Auberry KJ, Pasa-Tolic L, et al. Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *Journal of virology*. 2004;78(20):10960-6.
9. Irmiere A, Gibson W. Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology*. 1983;130(1):118-33.
10. Roby C, Gibson W. Characterization of phosphoproteins and protein kinase activity of virions, noninfectious enveloped particles, and dense bodies of human cytomegalovirus. *Journal of virology*. 1986;59(3):714-27.
11. Crough T, Khanna R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clinical microbiology reviews*. 2009;22(1):76-98, Table of Contents.
12. Moses S, Malathi J, Singha NR, Bagyalakshmi R, Madhavan HN. Determination of human cytomegalovirus pp65 antigenemia among renal transplant patients. *Indian journal of nephrology*. 2012;22(5):347-52.
13. Grefte JM, van der Gun BT, Schmolke S, van der Giessen M, van Son WJ, Plachter B, et al. The lower matrix protein pp65 is the principal viral antigen present in peripheral blood leukocytes during an active cytomegalovirus infection. *The Journal of general virology*. 1992;73 ( Pt 11):2923-32.
14. Kern F, Bunde T, Faulhaber N, Kiecker F, Khatamzas E, Rudawski IM, et al. Cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 makes a large contribution to shaping the T cell repertoire in CMV-exposed individuals. *The Journal of infectious diseases*. 2002;185(12):1709-16.
15. Gilbert MJ, Riddell SR, Plachter B, Greenberg PD. Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product. *Nature*. 1996;383(6602):720-2.
16. Odeberg J, Plachter B, Branden L, Soderberg-Naucler C. Human cytomegalovirus protein pp65 mediates accumulation of HLA-DR in lysosomes and destruction of the HLA-DR alpha-chain. *Blood*. 2003;101(12):4870-7.
17. Arnon TI, Achdout H, Levi O, Markel G, Saleh N, Katz G, et al. Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nature immunology*. 2005;6(5):515-23.
18. Abate DA, Watanabe S, Mocarski ES. Major human cytomegalovirus structural protein pp65 (ppUL83) prevents interferon response factor 3 activation in the interferon response. *Journal of virology*. 2004;78(20):10995-1006.

19. Stamminger T, Gstaiger M, Weinzierl K, Lorz K, Winkler M, Schaffner W. Open reading frame UL26 of human cytomegalovirus encodes a novel tegument protein that contains a strong transcriptional activation domain. *Journal of virology*. 2002;76(10):4836-47.
20. Feng X, Schroer J, Yu D, Shenk T. Human cytomegalovirus pUS24 is a virion protein that functions very early in the replication cycle. *Journal of virology*. 2006;80(17):8371-8.
21. Theiler RN, Compton T. Characterization of the signal peptide processing and membrane association of human cytomegalovirus glycoprotein O. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(42):39226-31.
22. Isaacson MK, Juckem LK, Compton T. Virus entry and innate immune activation. *Current topics in microbiology and immunology*. 2008;325:85-100.
23. Compton T. Receptors and immune sensors: the complex entry path of human cytomegalovirus. *Trends in cell biology*. 2004;14(1):5-8.
24. Britt WJ, Mach M. Human cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirology*. 1996;39(5-6):401-12.
25. Soderberg C, Larsson S, Bergstedt-Lindqvist S, Moller E. Identification of blood mononuclear cells permissive of cytomegalovirus infection in vitro. *Transplantation proceedings*. 1993;25(1 Pt 2):1416-8.
26. Taylor-Wiedeman J, Sissons JG, Borysiewicz LK, Sinclair JH. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *The Journal of general virology*. 1991;72 ( Pt 9):2059-64.
27. Sinzger C, Jahn G. Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. *Intervirology*. 1996;39(5-6):302-19.
28. Sinzger C, Grefte A, Plachter B, Gouw AS, The TH, Jahn G. Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *The Journal of general virology*. 1995;76 ( Pt 4):741-50.
29. Revello MG, Gerna G. Human cytomegalovirus tropism for endothelial/epithelial cells: scientific background and clinical implications. *Reviews in medical virology*. 2010;20(3):136-55.
30. Ryckman BJ, Rainish BL, Chase MC, Borton JA, Nelson JA, Jarvis MA, et al. Characterization of the human cytomegalovirus gH/gL/UL128-131 complex that mediates entry into epithelial and endothelial cells. *Journal of virology*. 2008;82(1):60-70.
31. Kari B, Radeke R, Gehrz R. Processing of human cytomegalovirus envelope glycoproteins in and egress of cytomegalovirus from human astrocytoma cells. *The Journal of general virology*. 1992;73 ( Pt 2):253-60.
32. Feire AL, Koss H, Compton T. Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(43):15470-5.
33. Wang X, Huang DY, Huong SM, Huang ES. Integrin alphavbeta3 is a coreceptor for human cytomegalovirus. *Nature medicine*. 2005;11(5):515-21.
34. Bold S, Ohlin M, Garten W, Radsak K. Structural domains involved in human cytomegalovirus glycoprotein B-mediated cell-cell fusion. *The Journal of general virology*. 1996;77 ( Pt 9):2297-302.
35. Keay S, Baldwin B. Anti-idiotypic antibodies that mimic gp86 of human cytomegalovirus inhibit viral fusion but not attachment. *Journal of virology*. 1991;65(9):5124-8.
36. Navarro D, Paz P, Tugizov S, Topp K, La Vail J, Pereira L. Glycoprotein B of human cytomegalovirus promotes virion penetration into cells, transmission of infection from cell to cell, and fusion of infected cells. *Virology*. 1993;197(1):143-58.
37. Luxton GW, Haverlock S, Collier KE, Antinone SE, Pincetic A, Smith GA. Targeting of herpesvirus capsid transport in axons is coupled to association with specific sets of tegument proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(16):5832-7.



38. Wolfstein A, Nagel CH, Radtke K, Dohner K, Allan VJ, Sodeik B. The inner tegument promotes herpes simplex virus capsid motility along microtubules in vitro. *Traffic* (Copenhagen, Denmark). 2006;7(2):227-37.
39. Kondo K, Kaneshima H, Mocarski ES. Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte-macrophage progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(25):11879-83.
40. Soderberg-Naucler C, Fish KN, Nelson JA. Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell*. 1997;91(1):119-26.
41. Umbach JL, Kramer MF, Jurak I, Karnowski HW, Coen DM, Cullen BR. MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature*. 2008;454(7205):780-3.
42. Nelson JA. Small RNAs and large DNA viruses. *The New England journal of medicine*. 2007;357(25):2630-2.
43. Lungu O, Panagiotidis CA, Annunziato PW, Gershon AA, Silverstein SJ. Aberrant intracellular localization of Varicella-Zoster virus regulatory proteins during latency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(12):7080-5.
44. Jean Beltran PM, Cristea IM. The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: lessons from proteomics. *Expert review of proteomics*. 2014;11(6):697-711.
45. Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D. The human cytomegalovirus. *Pharmacology & therapeutics*. 2003;98(3):269-97.
46. Cristea IM, Moorman NJ, Terhune SS, Cuevas CD, O'Keefe ES, Rout MP, et al. Human cytomegalovirus pUL83 stimulates activity of the viral immediate-early promoter through its interaction with the cellular IFI16 protein. *Journal of virology*. 2010;84(15):7803-14.
47. Isomura H, Stinski MF. The human cytomegalovirus major immediate-early enhancer determines the efficiency of immediate-early gene transcription and viral replication in permissive cells at low multiplicity of infection. *Journal of virology*. 2003;77(6):3602-14.
48. Meier JL, Keller MJ, McCoy JJ. Requirement of multiple cis-acting elements in the human cytomegalovirus major immediate-early distal enhancer for viral gene expression and replication. *Journal of virology*. 2002;76(1):313-26.
49. Sinclair J, Sissons P. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *The Journal of general virology*. 2006;87(Pt 7):1763-79.
50. Griffiths P, Baraniak I, Reeves M. The pathogenesis of human cytomegalovirus. *The Journal of pathology*. 2015;235(2):288-97.
51. Mena-Romo JD, Perez Romero P, Martin-Gandul C, Gentil MA, Suarez-Artacho G, Lage E, et al. CMV-specific T-cell immunity in solid organ transplant recipients at low risk of CMV infection. Chronology and applicability in preemptive therapy. *The Journal of infection*. 2017;75(4):336-45.
52. Fietze E, Prosch S, Reinke P, Stein J, Docke WD, Staffa G, et al. Cytomegalovirus infection in transplant recipients. The role of tumor necrosis factor. *Transplantation*. 1994;58(6):675-80.
53. Bunde T, Kirchner A, Hoffmeister B, Habedank D, Hetzer R, Cherepnev G, et al. Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific CD8 T cells. *The Journal of experimental medicine*. 2005;201(7):1031-6.
54. Fortunato EA, Spector DH. Regulation of human cytomegalovirus gene expression. *Advances in virus research*. 1999;54:61-128.
55. Geballe AP, Leach FS, Mocarski ES. Regulation of cytomegalovirus late gene expression: gamma genes are controlled by posttranscriptional events. *Journal of virology*. 1986;57(3):864-74.
56. Leach FS, Mocarski ES. Regulation of cytomegalovirus late-gene expression: differential use of three start sites in the transcriptional activation of ICP36 gene expression. *Journal of virology*. 1989;63(4):1783-91.
57. McWatters BJ, Stenberg RM, Kerry JA. Characterization of the human cytomegalovirus UL75 (glycoprotein H) late gene promoter. *Virology*. 2002;303(2):309-16.

58. Isomura H, Stinski MF, Murata T, Yamashita Y, Kanda T, Toyokuni S, et al. The human cytomegalovirus gene products essential for late viral gene expression assemble into prereplication complexes before viral DNA replication. *Journal of virology*. 2011;85(13):6629-44.
59. Gkrania-Klotsas E, Langenberg C, Sharp SJ, Luben R, Khaw KT, Wareham NJ. Seropositivity and higher immunoglobulin g antibody levels against cytomegalovirus are associated with mortality in the population-based European prospective investigation of Cancer-Norfolk cohort. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2013;56(10):1421-7.
60. Reynolds DW, Stagno S, Alford CA. Congenital cytomegalovirus infection. *Teratology*. 1978;17(2):179-81.
61. Stagno S, Reynolds DW, Pass RF, Alford CA. Breast milk and the risk of cytomegalovirus infection. *The New England journal of medicine*. 1980;302(19):1073-6.
62. Lazzarotto T, Guerra B, Gabrielli L, Lanari M, Landini MP. Update on the prevention, diagnosis and management of cytomegalovirus infection during pregnancy. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2011;17(9):1285-93.
63. Griffiths PD, Grundy JE, Ali A, Sweny P, Trompeter RS, Fernando ON, et al. Cytomegalovirus matching in renal transplantation. *Lancet (London, England)*. 1988;2(8617):971.
64. Huang ES, Alford CA, Reynolds DW, Stagno S, Pass RF. Molecular epidemiology of cytomegalovirus infections in women and their infants. *The New England journal of medicine*. 1980;303(17):958-62.
65. Boppana SB, Rivera LB, Fowler KB, Mach M, Britt WJ. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *The New England journal of medicine*. 2001;344(18):1366-71.
66. S. S. Infección por citomegalovirus humano. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2014;32:15-22.
67. Swanson EC, Schleiss MR. Congenital cytomegalovirus infection: new prospects for prevention and therapy. *Pediatric clinics of North America*. 2013;60(2):335-49.
68. Carlson A, Norwitz ER, Stiller RJ. Cytomegalovirus infection in pregnancy: should all women be screened? *Reviews in obstetrics & gynecology*. 2010;3(4):172-9.
69. Blanco-Lobo P, Bulnes-Ramos A, McConnell MJ, Navarro D, Perez-Romero P. Applying lessons learned from cytomegalovirus infection in transplant patients to vaccine design. *Drug discovery today*. 2016;21(4):674-81.
70. Freeman RB, Jr. The 'indirect' effects of cytomegalovirus infection. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2009;9(11):2453-8.
71. Hodson EM, Jones CA, Webster AC, Strippoli GF, Barclay PG, Kable K, et al. Antiviral medications to prevent cytomegalovirus disease and early death in recipients of solid-organ transplants: a systematic review of randomised controlled trials. *Lancet (London, England)*. 2005;365(9477):2105-15.
72. Humar A. Reactivation of viruses in solid organ transplant patients receiving cytomegalovirus prophylaxis. *Transplantation*. 2006;82(2 Suppl):S9-s14.
73. Kotton CN. CMV: Prevention, Diagnosis and Therapy. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2013;13 Suppl 3:24-40; quiz
74. Paya CV. Indirect effects of CMV in the solid organ transplant patient. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society*. 1999;1 Suppl 1:8-12.
75. Rubin RH. Importance of CMV in the transplant population. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society*. 1999;1 Suppl 1:3-7.

76. Reyrburn HT, Mandelboim O, Vales-Gomez M, Davis DM, Pazmany L, Strominger JL. The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells. *Nature*. 1997;386(6624):514-7.
77. Reddehase MJ. Antigen and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nature reviews Immunology*. 2002;2(11):831-44.
78. Wang EC, McSharry B, Retiere C, Tomasec P, Williams S, Borysiewicz LK, et al. UL40-mediated NK evasion during productive infection with human cytomegalovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(11):7570-5.
79. Chapman TL, Heikeman AP, Bjorkman PJ. The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18. *Immunity*. 1999;11(5):603-13.
80. Solez K, Vincenti F, Filo RS. Histopathologic findings from 2-year protocol biopsies from a U.S. multicenter kidney transplant trial comparing tacrolimus versus cyclosporine: a report of the FK506 Kidney Transplant Study Group. *Transplantation*. 1998;66(12):1736-40.
81. McLaughlin K, Wu C, Fick G, Muirhead N, Hollomby D, Jevnikar A. Cytomegalovirus seromismatching increases the risk of acute renal allograft rejection. *Transplantation*. 2002;74(6):813-6.
82. Sagedal S, Nordal KP, Hartmann A, Sund S, Scott H, Degre M, et al. The impact of cytomegalovirus infection and disease on rejection episodes in renal allograft recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2002;2(9):850-6.
83. Pescovitz MD. Benefits of cytomegalovirus prophylaxis in solid organ transplantation. *Transplantation*. 2006;82(2 Suppl):S4-8.
84. Opelz G, Dohler B, Ruhentrost A. Cytomegalovirus prophylaxis and graft outcome in solid organ transplantation: a collaborative transplant study report. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2004;4(6):928-36.
85. Singh N, Wannstedt C, Keyes L, Wagener MM, Gayowski T, Cacciarelli TV. Indirect outcomes associated with cytomegalovirus (opportunistic infections, hepatitis C virus sequelae, and mortality) in liver-transplant recipients with the use of preemptive therapy for 13 years. *Transplantation*. 2005;79(10):1428-34.
86. Evans PC, Soin A, Wreghitt TG, Taylor CJ, Wight DG, Alexander GJ. An association between cytomegalovirus infection and chronic rejection after liver transplantation. *Transplantation*. 2000;69(1):30-5.
87. Razonable RR, Burak KW, van Crujisen H, Brown RA, Charlton MR, Smith TF, et al. The pathogenesis of hepatitis C virus is influenced by cytomegalovirus. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2002;35(8):974-81.
88. Tu W, Potena L, Stepick-Biek P, Liu L, Dionis KY, Luikart H, et al. T-cell immunity to subclinical cytomegalovirus infection reduces cardiac allograft disease. *Circulation*. 2006;114(15):1608-15.
89. Zakliczynski M, Krynicka-Mazurek A, Konecka-Mrowka D, Nozynski J, Zeglen S, Przybylski R, et al. Cytomegalovirus infection does not accelerate microvasculopathy development in heart transplant recipients. *Transplantation proceedings*. 2009;41(8):3219-21.
90. Gavalda J, Len O, San Juan R, Aguado JM, Fortun J, Lumberras C, et al. Risk factors for invasive aspergillosis in solid-organ transplant recipients: a case-control study. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2005;41(1):52-9.
91. Fortun J, Martin-Davila P, Moreno S, De Vicente E, Nuno J, Candelas A, et al. Risk factors for invasive aspergillosis in liver transplant recipients. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2002;8(11):1065-70.
92. Radisic M, Lattes R, Chapman JF, del Carmen Rial M, Guardia O, Seu F, et al. Risk factors for *Pneumocystis carinii* pneumonia in kidney transplant recipients: a case-control study.

- Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society. 2003;5(2):84-93.
93. Peleg AY, Husain S, Qureshi ZA, Silveira FP, Sarumi M, Shutt KA, et al. Risk factors, clinical characteristics, and outcome of Nocardia infection in organ transplant recipients: a matched case-control study. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2007;44(10):1307-14.
94. Cantisan S, Torre-Cisneros J, Lara R, Rodriguez-Benot A, Santos F, Gutierrez-Aroca J, et al. Age-dependent association between low frequency of CD27/CD28 expression on pp65 CD8+ T cells and cytomegalovirus replication after transplantation. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2009;16(10):1429-38.
95. Hjelmesaeth J, Sagedal S, Hartmann A, Rollag H, Egeland T, Hagen M, et al. Asymptomatic cytomegalovirus infection is associated with increased risk of new-onset diabetes mellitus and impaired insulin release after renal transplantation. *Diabetologia*. 2004;47(9):1550-6.
96. Mendez JC, Sia IG, Tau KR, Espy MJ, Smith TF, Chou S, et al. Novel mutation in the CMV UL97 gene associated with resistance to ganciclovir therapy. *Transplantation*. 1999;67(5):755-7.
97. Razonable RR, Paya CV, Smith TF. Role of the laboratory in diagnosis and management of cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell and solid-organ transplant recipients. *Journal of clinical microbiology*. 2002;40(3):746-52.
98. Grefte JM, van der Gun BT, Schmolke S, van der Giessen M, van Son WJ, Plachter B, et al. Cytomegalovirus antigenemia assay: identification of the viral antigen as the lower matrix protein pp65. *The Journal of infectious diseases*. 1992;166(3):683-4.
99. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Danziger-Isakov L, et al. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation*. 2013;96(4):333-60.
100. Caliendo AM, St George K, Allega J, Bullotta AC, Gilbane L, Rinaldo CR. Distinguishing cytomegalovirus (CMV) infection and disease with CMV nucleic acid assays. *Journal of clinical microbiology*. 2002;40(5):1581-6.
101. Emery VC, Sabin CA, Cope AV, Gor D, Hassan-Walker AF, Griffiths PD. Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation. *Lancet (London, England)*. 2000;355(9220):2032-6.
102. Rollag H, Sagedal S, Kristiansen KI, Kvale D, Holter E, Degre M, et al. Cytomegalovirus DNA concentration in plasma predicts development of cytomegalovirus disease in kidney transplant recipients. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2002;8(7):431-4.
103. Humar A, Gregson D, Caliendo AM, McGeer A, Malkan G, Krajden M, et al. Clinical utility of quantitative cytomegalovirus viral load determination for predicting cytomegalovirus disease in liver transplant recipients. *Transplantation*. 1999;68(9):1305-11.
104. Razonable RR, van Crujisen H, Brown RA, Wilson JA, Harmsen WS, Wiesner RH, et al. Dynamics of cytomegalovirus replication during preemptive therapy with oral ganciclovir. *The Journal of infectious diseases*. 2003;187(11):1801-8.
105. Evans PC, Soin A, Wreghitt TG, Alexander GJ. Qualitative and semiquantitative polymerase chain reaction testing for cytomegalovirus DNA in serum allows prediction of CMV related disease in liver transplant recipients. *Journal of clinical pathology*. 1998;51(12):914-21.
106. Kulkarni A, Westmoreland D, Fox JD. Molecular-based strategies for assessment of CMV infection and disease in immunosuppressed transplant recipients. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2001;7(4):179-86.
107. Pang XL, Fox JD, Fenton JM, Miller GG, Caliendo AM, Preiksaitis JK. Interlaboratory comparison of cytomegalovirus viral load assays. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2009;9(2):258-68.

108. Clari MA, Bravo D, Costa E, Munoz-Cobo B, Solano C, Remigia MJ, et al. Comparison of the new Abbott Real Time CMV assay and the Abbott CMV PCR Kit for the quantitation of plasma cytomegalovirus DNAemia. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2013;75(2):207-9.
109. Hamprecht K, Steinmassl M, Einsele H, Jahn G. Discordant detection of human cytomegalovirus DNA from peripheral blood mononuclear cells, granulocytes and plasma: correlation to viremia and HCMV infection. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 1998;11(2):125-36.
110. Tang W, Elmore SH, Fan H, Thorne LB, Gulley ML. Cytomegalovirus DNA measurement in blood and plasma using Roche LightCycler CMV quantification reagents. *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B*. 2008;17(3):166-73.
111. Fryer JF, Heath AB, Minor PD. A collaborative study to establish the 1st WHO International Standard for human cytomegalovirus for nucleic acid amplification technology. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*. 2016;44(4):242-51.
112. Weller TH. Review. Cytomegaloviruses: the difficult years. *The Journal of infectious diseases*. 1970;122(6):532-9.
113. Razonable RR, Humar A. Cytomegalovirus in solid organ transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2013;13 Suppl 4:93-106.
114. Rubin RH. The pathogenesis and clinical management of cytomegalovirus infection in the organ transplant recipient: the end of the 'silo hypothesis'. *Current opinion in infectious diseases*. 2007;20(4):399-407.
115. Rubin RH. Cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society*. 2001;3 Suppl 2:1-5.
116. Limaye AP. Antiviral resistance in cytomegalovirus: an emerging problem in organ transplant recipients. *Seminars in respiratory infections*. 2002;17(4):265-73.
117. Lopez-Oliva MO, Martinez V, Buitrago A, Jimenez C, Rivas B, Escuin F, et al. Pretransplant CD8 T-cell response to IE-1 discriminates seropositive kidney recipients at risk of developing CMV infection posttransplant. *Transplantation*. 2014;97(8):839-45.
118. Bestard O, Lucia M, Crespo E, Van Liempt B, Palacio D, Melilli E, et al. Pretransplant immediately early-1-specific T cell responses provide protection for CMV infection after kidney transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2013;13(7):1793-805.
119. Manuel O, Kralidis G, Mueller NJ, Hirsch HH, Garzoni C, van Delden C, et al. Impact of antiviral preventive strategies on the incidence and outcomes of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2013;13(9):2402-10.
120. Atabani SF, Smith C, Atkinson C, Aldridge RW, Rodriguez-Peralvarez M, Rolando N, et al. Cytomegalovirus replication kinetics in solid organ transplant recipients managed by preemptive therapy. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2012;12(9):2457-64.
121. Emery VC, Asher K, Sanjuan Cde J. Importance of the cytomegalovirus seropositive recipient as a contributor to disease burden after solid organ transplantation. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2012;54(2):125-9.
122. Weigand K, Schnitzler P, Schmidt J, Chahoud F, Gotthardt D, Schemmer P, et al. Cytomegalovirus infection after liver transplantation incidence, risks, and benefits of prophylaxis. *Transplantation proceedings*. 2010;42(7):2634-41.
123. Kirklin JK, Naftel DC, Levine TB, Bourge RC, Pelletier GB, O'Donnell J, et al. Cytomegalovirus after heart transplantation. Risk factors for infection and death: a multiinstitutional study. *The Cardiac Transplant Research Database Group. The Journal of heart*

and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation. 1994;13(3):394-404.

124. Manez R, Kusne S, Green M, Abu-Elmagd K, Irish W, Reyes J, et al. Incidence and risk factors associated with the development of cytomegalovirus disease after intestinal transplantation. *Transplantation*. 1995;59(7):1010-4.

125. Kaufman DB, Leventhal JR, Gallon LG, Parker MA, Koffron AJ, Fryer JP, et al. Risk factors and impact of cytomegalovirus disease in simultaneous pancreas-kidney transplantation. *Transplantation*. 2001;72(12):1940-5.

126. Guaraldi G, Cocchi S, Codeluppi M, Di Benedetto F, De Ruvo N, Masetti M, et al. Outcome, incidence, and timing of infectious complications in small bowel and multivisceral organ transplantation patients. *Transplantation*. 2005;80(12):1742-8.

127. Lumbreras C, Fernandez I, Velosa J, Munn S, Sterioff S, Paya CV. Infectious complications following pancreatic transplantation: incidence, microbiological and clinical characteristics, and outcome. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1995;20(3):514-20.

128. Alexander BD, Tapson VF. Infectious complications of lung transplantation. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society*. 2001;3(3):128-37.

129. San Juan R, Aguado JM, Lumbreras C, Fortun J, Munoz P, Gavalda J, et al. Impact of current transplantation management on the development of cytomegalovirus disease after renal transplantation. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2008;47(7):875-82.

130. Fishman JA. Infection in solid-organ transplant recipients. *The New England journal of medicine*. 2007;357(25):2601-14.

131. Martin-Davila P, Blanes M, Fortun J. [Immunosuppression and infection in transplant recipients]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007;25(2):143-54.

132. Kirk AD. Induction immunosuppression. *Transplantation*. 2006;82(5):593-602.

133. Klein AS, Messersmith EE, Ratner LE, Kochik R, Baliga PK, Ojo AO. Organ donation and utilization in the United States, 1999-2008. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2010;10(4 Pt 2):973-86.

134. Gaber AO, Matas AJ, Henry ML, Brennan DC, Stevens RB, Kapur S, et al. Antithymocyte globulin induction in living donor renal transplant recipients: final report of the TAILOR registry. *Transplantation*. 2012;94(4):331-7.

135. Brennan DC, Daller JA, Lake KD, Cibrik D, Del Castillo D. Rabbit antithymocyte globulin versus basiliximab in renal transplantation. *The New England journal of medicine*. 2006;355(19):1967-77.

136. Charpentier B, Rostaing L, Berthoux F, Lang P, Civati G, Touraine JL, et al. A three-arm study comparing immediate tacrolimus therapy with antithymocyte globulin induction therapy followed by tacrolimus or cyclosporine A in adult renal transplant recipients. *Transplantation*. 2003;75(6):844-51.

137. Mourad G, Garrigue V, Squifflet JP, Besse T, Berthoux F, Alamartine E, et al. Induction versus noninduction in renal transplant recipients with tacrolimus-based immunosuppression. *Transplantation*. 2001;72(6):1050-5.

138. Thomusch O, Wiesener M, Opgenoorth M, Pascher A, Woitas RP, Witzke O, et al. Rabbit-ATG or basiliximab induction for rapid steroid withdrawal after renal transplantation (Harmony): an open-label, multicentre, randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*. 2016;388(10063):3006-16.

139. Abate D, Saldan A, Fison M, Cofano S, Paciolla A, Furian L, et al. Evaluation of cytomegalovirus (CMV)-specific T cell immune reconstitution revealed that baseline antiviral immunity, prophylaxis, or preemptive therapy but not antithymocyte globulin treatment contribute to CMV-specific T cell reconstitution in kidney transplant recipients. *The Journal of infectious diseases*. 2010;202(4):585-94.

140. Bernabeu-Wittel M, Naranjo M, Cisneros JM, Canas E, Gentil MA, Algarra G, et al. Infections in renal transplant recipients receiving mycophenolate versus azathioprine-based immunosuppression. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2002;21(3):173-80.
141. Sarmiento JM, Dockrell DH, Schwab TR, Munn SR, Paya CV. Mycophenolate mofetil increases cytomegalovirus invasive organ disease in renal transplant patients. *Clinical transplantation*. 2000;14(2):136-8.
142. Munoz MA, Andres A, Gallego R, Morales E, Morales JM, Aguado JM, et al. Mycophenolate mofetil immunosuppressive therapies increase the incidence of cytomegalovirus infection in renal transplantation. *Transplantation proceedings*. 2002;34(1):97.
143. Asberg A, Jardine AG, Bignamini AA, Rollag H, Pescovitz MD, Gahlemann CC, et al. Effects of the intensity of immunosuppressive therapy on outcome of treatment for CMV disease in organ transplant recipients. *American journal of transplantation* : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2010;10(8):1881-8.
144. Vigano M, Dengler T, Mattei MF, Poncelet A, Vanhaecke J, Vermes E, et al. Lower incidence of cytomegalovirus infection with everolimus versus mycophenolate mofetil in de novo cardiac transplant recipients: a randomized, multicenter study. *Transplant infectious disease* : an official journal of the Transplantation Society. 2010;12(1):23-30.
145. Cervera C, Fernandez-Ruiz M, Valledor A, Linares L, Anton A, Angeles Marcos M, et al. Epidemiology and risk factors for late infection in solid organ transplant recipients. *Transplant infectious disease* : an official journal of the Transplantation Society. 2011;13(6):598-607.
146. Perez-Sola MJ, Caston JJ, Solana R, Rivero A, Torre-Cisneros J. Indirect effects of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;26(1):38-47.
147. Rubin RH. Prevention and treatment of cytomegalovirus disease in heart transplant patients. *The Journal of heart and lung transplantation* : the official publication of the International Society for Heart Transplantation. 2000;19(8):731-5.
148. Paya C, Humar A, Dominguez E, Washburn K, Blumberg E, Alexander B, et al. Efficacy and safety of valganciclovir vs. oral ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *American journal of transplantation* : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2004;4(4):611-20.
149. Torre-Cisneros J, Aguado JM, Caston JJ, Almenar L, Alonso A, Cantisan S, et al. Management of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients: SET/GESITRA-SEIMC/REIPI recommendations. *Transplantation reviews (Orlando, Fla)*. 2016;30(3):119-43.
150. Reusing JO, Jr., Feitosa EB, Agena F, Pierrotti LC, Azevedo LSF, Kotton CN, et al. Cytomegalovirus prophylaxis in seropositive renal transplant recipients receiving thymoglobulin induction therapy: Outcome and risk factors for late CMV disease. *Transplant infectious disease* : an official journal of the Transplantation Society. 2018:e12929.
151. Brumble LM, Milstone AP, Loyd JE, Ely EW, Pierson RN, 3rd, Gautam S, et al. Prevention of cytomegalovirus infection and disease after lung transplantation: results using a unique regimen employing delayed ganciclovir. *Chest*. 2002;121(2):407-14.
152. San Juan R, Yebra M, Lumbreras C, Lopez-Medrano F, Lizasoain M, Meneu JC, et al. A new strategy of delayed long-term prophylaxis could prevent cytomegalovirus disease in (D+/R-) solid organ transplant recipients. *Clinical transplantation*. 2009;23(5):666-71.
153. Snyderman DR. Counterpoint: prevention of cytomegalovirus (CMV) infection and CMV disease in recipients of solid organ transplants: the case for prophylaxis. *Clinical infectious diseases* : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2005;40(5):709-12.
154. Sagedal S, Hartmann A, Rollag H. The impact of early cytomegalovirus infection and disease in renal transplant recipients. *Clinical microbiology and infection* : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2005;11(7):518-30.

155. Pescovitz MD, Rabkin J, Merion RM, Paya CV, Pirsch J, Freeman RB, et al. Valganciclovir results in improved oral absorption of ganciclovir in liver transplant recipients. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2000;44(10):2811-5.
156. Limaye AP, Bakthavatsalam R, Kim HW, Kuhr CS, Halldorson JB, Healey PJ, et al. Late-onset cytomegalovirus disease in liver transplant recipients despite antiviral prophylaxis. *Transplantation*. 2004;78(9):1390-6.
157. Khoury JA, Storch GA, Bohl DL, Schuessler RM, Torrence SM, Lockwood M, et al. Prophylactic versus preemptive oral valganciclovir for the management of cytomegalovirus infection in adult renal transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2006;6(9):2134-43.
158. Humar A, Lebranchu Y, Vincenti F, Blumberg EA, Punch JD, Limaye AP, et al. The efficacy and safety of 200 days valganciclovir cytomegalovirus prophylaxis in high-risk kidney transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2010;10(5):1228-37.
159. Arthurs SK, Eid AJ, Pedersen RA, Kremers WK, Cosio FG, Patel R, et al. Delayed-onset primary cytomegalovirus disease and the risk of allograft failure and mortality after kidney transplantation. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2008;46(6):840-6.
160. Ramanan P, Razonable RR. Cytomegalovirus infections in solid organ transplantation: a review. *Infection & chemotherapy*. 2013;45(3):260-71.
161. Lilleri D, Baldanti F, Gatti M, Rovida F, Dossena L, De Grazia S, et al. Clinically-based determination of safe DNAemia cutoff levels for preemptive therapy or human cytomegalovirus infections in solid organ and hematopoietic stem cell transplant recipients. *Journal of medical virology*. 2004;73(3):412-8.
162. Martin-Davila P, Fortun J, Gutierrez C, Marti-Belda P, Candelas A, Honrubia A, et al. Analysis of a quantitative PCR assay for CMV infection in liver transplant recipients: an intent to find the optimal cut-off value. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2005;33(2):138-44.
163. Emery VC. Prophylaxis for CMV should not now replace pre-emptive therapy in solid organ transplantation. *Reviews in medical virology*. 2001;11(2):83-6.
164. Martin-Gandul C, Perez-Romero P, Sanchez M, Bernal G, Suarez G, Sobrino M, et al. Determination, validation and standardization of a CMV DNA cut-off value in plasma for preemptive treatment of CMV infection in solid organ transplant recipients at lower risk for CMV infection. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2013;56(1):13-8.
165. Owers DS, Webster AC, Strippoli GF, Kable K, Hodson EM. Pre-emptive treatment for cytomegalovirus viraemia to prevent cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2013(2):Cd005133.
166. Limaye AP, Corey L, Koelle DM, Davis CL, Boeckh M. Emergence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease among recipients of solid-organ transplants. *Lancet (London, England)*. 2000;356(9230):645-9.
167. Asberg A, Humar A, Rollag H, Jardine AG, Mouas H, Pescovitz MD, et al. Oral valganciclovir is noninferior to intravenous ganciclovir for the treatment of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2007;7(9):2106-13.
168. Singh N, Wannstedt C, Keyes L, Mayher D, Tickerhoof L, Akoad M, et al. Valganciclovir as preemptive therapy for cytomegalovirus in cytomegalovirus-seronegative liver transplant recipients of cytomegalovirus-seropositive donor allografts. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2008;14(2):240-4.



169. Humar A, Kumar D, Boivin G, Caliendo AM. Cytomegalovirus (CMV) virus load kinetics to predict recurrent disease in solid-organ transplant patients with CMV disease. *The Journal of infectious diseases*. 2002;186(6):829-33.
170. Diaz-Pedroche C, Lumberras C, San Juan R, Folgueira D, Andres A, Delgado J, et al. Valganciclovir preemptive therapy for the prevention of cytomegalovirus disease in high-risk seropositive solid-organ transplant recipients. *Transplantation*. 2006;82(1):30-5.
171. Asberg A, Humar A, Jardine AG, Rollag H, Pescovitz MD, Mouas H, et al. Long-term outcomes of CMV disease treatment with valganciclovir versus IV ganciclovir in solid organ transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2009;9(5):1205-13.
172. Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron*. 1976;16(1):31-41.
173. Posadas Salas MA, Taber DJ, Chua E, Pilch N, Chavin K, Thomas B. Critical analysis of valganciclovir dosing and renal function on the development of cytomegalovirus infection in kidney transplantation. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society*. 2013;15(6):551-8.
174. Hanley PJ, Bollard CM. Controlling cytomegalovirus: helping the immune system take the lead. *Viruses*. 2014;6(6):2242-58.
175. Manuel O, Pascual M, Trendelenburg M, Meylan PR. Association between mannose-binding lectin deficiency and cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transplantation*. 2007;83(3):359-62.
176. Eisen DP, Minchinton RM. Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2003;37(11):1496-505.
177. Kuhlman M, Joiner K, Ezekowitz RA. The human mannose-binding protein functions as an opsonin. *The Journal of experimental medicine*. 1989;169(5):1733-45.
178. Minchinton RM, Dean MM, Clark TR, Heatley S, Mullighan CG. Analysis of the relationship between mannose-binding lectin (MBL) genotype, MBL levels and function in an Australian blood donor population. *Scandinavian journal of immunology*. 2002;56(6):630-41.
179. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature immunology*. 2001;2(8):675-80.
180. Kijpittayarit S, Eid AJ, Brown RA, Paya CV, Razonable RR. Relationship between Toll-like receptor 2 polymorphism and cytomegalovirus disease after liver transplantation. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2007;44(10):1315-20.
181. Jost S, Altfeld M. Control of human viral infections by natural killer cells. *Annual review of immunology*. 2013;31:163-94.
182. Moretta A, Marcenaro E, Parolini S, Ferlazzo G, Moretta L. NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Cell death and differentiation*. 2008;15(2):226-33.
183. Wu Z, Sinzger C, Reichel JJ, Just M, Mertens T. Natural killer cells can inhibit the transmission of human cytomegalovirus in cell culture by using mechanisms from innate and adaptive immune responses. *Journal of virology*. 2015;89(5):2906-17.
184. Kuijpers TW, Baars PA, Dantin C, van den Burg M, van Lier RA, Roosnek E. Human NK cells can control CMV infection in the absence of T cells. *Blood*. 2008;112(3):914-5.
185. Sester U, Gartner BC, Wilkens H, Schwaab B, Wossner R, Kindermann I, et al. Differences in CMV-specific T-cell levels and long-term susceptibility to CMV infection after kidney, heart and lung transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2005;5(6):1483-9.
186. Reusser P, Riddell SR, Meyers JD, Greenberg PD. Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood*. 1991;78(5):1373-80.

187. Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, Taormina C, Pelte C, Ruchti F, et al. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *The Journal of experimental medicine*. 2005;202(5):673-85.
188. Egli A, Humar A, Kumar D. State-of-the-art monitoring of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity after organ transplant: a primer for the clinician. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2012;55(12):1678-89.
189. Lilleri D, Fornara C, Revello MG, Gerna G. Human cytomegalovirus-specific memory CD8+ and CD4+ T cell differentiation after primary infection. *The Journal of infectious diseases*. 2008;198(4):536-43.
190. Mawhorter S, Yamani MH. Hypogammaglobulinemia and infection risk in solid organ transplant recipients. *Current opinion in organ transplantation*. 2008;13(6):581-5.
191. Harari A, Zimmerli SC, Pantaleo G. Cytomegalovirus (CMV)-specific cellular immune responses. *Human immunology*. 2004;65(5):500-6.
192. BenMarzouk-Hidalgo OJ, Cordero E, Gomez-Cia T, Sanchez M, Gonzalez-Padilla JD, Infante-Cossio P, et al. First face composite-tissue transplant recipient successfully treated for cytomegalovirus infection with preemptive valganciclovir treatment. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(12):5949-51.
193. Manuel O, Husain S, Kumar D, Zayas C, Mawhorter S, Levi ME, et al. Assessment of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity for the prediction of cytomegalovirus disease in high-risk solid-organ transplant recipients: a multicenter cohort study. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2013;56(6):817-24.
194. Blanco-Lobo P, Cordero E, Martin-Gandul C, Gentil MA, Suarez-Artacho G, Sobrino M, et al. Use of antibodies neutralizing epithelial cell infection to diagnose patients at risk for CMV Disease after transplantation. *The Journal of infection*. 2016;72(5):597-607.
195. Benmarzouk-Hidalgo OJ, Cisneros JM, Cordero E, Martin-Pena A, Sanchez B, Martin-Gandul C, et al. Therapeutic effect of the acquisition of cytomegalovirus-specific immune response during preemptive treatment. *Transplantation*. 2011;91(8):927-33.
196. Bonaros N, Mayer B, Schachner T, Laufer G, Kocher A. CMV-hyperimmune globulin for preventing cytomegalovirus infection and disease in solid organ transplant recipients: a meta-analysis. *Clinical transplantation*. 2008;22(1):89-97.
197. Wirtz N, Schader SI, Holtappels R, Simon CO, Lemmermann NA, Reddehase MJ, et al. Polyclonal cytomegalovirus-specific antibodies not only prevent virus dissemination from the portal of entry but also inhibit focal virus spread within target tissues. *Medical microbiology and immunology*. 2008;197(2):151-8.
198. Jonjic S, Pavic I, Polic B, Crnkovic I, Lucin P, Koszinowski UH. Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. *The Journal of experimental medicine*. 1994;179(5):1713-7.
199. Farrell HE, Shellam GR. Protection against murine cytomegalovirus infection by passive transfer of neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies. *The Journal of general virology*. 1991;72 ( Pt 1):149-56.
200. Cui X, Lee R, Adler SP, McVoy MA. Antibody inhibition of human cytomegalovirus spread in epithelial cell cultures. *Journal of virological methods*. 2013;192(1-2):44-50.
201. Rasmussen L, Morris S, Wolitz R, Dowling A, Fessell J, Holodniy M, et al. Deficiency in antibody response to human cytomegalovirus glycoprotein gH in human immunodeficiency virus-infected patients at risk for cytomegalovirus retinitis. *The Journal of infectious diseases*. 1994;170(3):673-7.
202. Boppana SB, Britt WJ. Antiviral antibody responses and intrauterine transmission after primary maternal cytomegalovirus infection. *The Journal of infectious diseases*. 1995;171(5):1115-21.

203. Boppana SB, Polis MA, Kramer AA, Britt WJ, Koenig S. Virus-specific antibody responses to human cytomegalovirus (HCMV) in human immunodeficiency virus type 1-infected persons with HCMV retinitis. *The Journal of infectious diseases*. 1995;171(1):182-5.
204. Alberola J, Tamarit A, Igual R, Navarro D. Early neutralizing and glycoprotein B (gB)-specific antibody responses to human cytomegalovirus (HCMV) in immunocompetent individuals with distinct clinical presentations of primary HCMV infection. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2000;16(2):113-22.
205. Schoppel K, Schmidt C, Einsele H, Hebart H, Mach M. Kinetics of the antibody response against human cytomegalovirus-specific proteins in allogeneic bone marrow transplant recipients. *The Journal of infectious diseases*. 1998;178(5):1233-43.
206. Chou SW. Neutralizing antibody responses to reinfected strains of cytomegalovirus in transplant recipients. *The Journal of infectious diseases*. 1989;160(1):16-21.
207. Pass RF, Griffiths PD, August AM. Antibody response to cytomegalovirus after renal transplantation: comparison of patients with primary and recurrent infections. *The Journal of infectious diseases*. 1983;147(1):40-6.
208. Ishibashi K, Tokumoto T, Shirakawa H, Hashimoto K, Ikuta K, Kushida N, et al. Lack of antibodies against the antigen domain 2 epitope of cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B is associated with CMV disease after renal transplantation in recipients having the same glycoprotein H serotypes as their donors. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society*. 2011;13(3):318-23.
209. Gerna G, Sarasini A, Patrone M, Percivalle E, Fiorina L, Campanini G, et al. Human cytomegalovirus serum neutralizing antibodies block virus infection of endothelial/epithelial cells, but not fibroblasts, early during primary infection. *The Journal of general virology*. 2008;89(Pt 4):853-65.
210. Cantisan S, Lara R, Montejo M, Redel J, Rodriguez-Benot A, Gutierrez-Aroca J, et al. Pretransplant interferon-gamma secretion by CMV-specific CD8+ T cells informs the risk of CMV replication after transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2013;13(3):738-45.
211. Lee H, Park KH, Ryu JH, Choi AR, Yu JH, Lim J, et al. Cytomegalovirus (CMV) immune monitoring with ELISPOT and QuantiFERON-CMV assay in seropositive kidney transplant recipients. 2017;12(12):e0189488.
212. Abate D, Saldan A, Mengoli C, Ficon M, Silvestre C, Fallico L, et al. Comparison of cytomegalovirus (CMV) enzyme-linked immunosorbent spot and CMV quantiferon gamma interferon-releasing assays in assessing risk of CMV infection in kidney transplant recipients. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(8):2501-7.
213. Kwon JS, Kim T, Kim SM, Sung H, Shin S, Kim YH, et al. Comparison of the Commercial QuantiFERON-CMV and Overlapping Peptide-based ELISPOT Assays for Predicting CMV Infection in Kidney Transplant Recipients. *Immune network*. 2017;17(5):317-25.
214. Clari MA, Munoz-Cobo B, Solano C, Benet I, Costa E, Remigia MJ, et al. Performance of the QuantiFERON-cytomegalovirus (CMV) assay for detection and estimation of the magnitude and functionality of the CMV-specific gamma interferon-producing CD8(+) T-cell response in allogeneic stem cell transplant recipients. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2012;19(5):791-6.
215. Costa C, Saldan A, Cavallo R. Evaluation of virus-specific cellular immune response in transplant patients. *World journal of virology*. 2012;1(6):150-3.
216. Fernandez-Ruiz M, Kumar D, Humar A. Clinical immune-monitoring strategies for predicting infection risk in solid organ transplantation. *Clinical & translational immunology*. 2014;3(2):e12.
217. Gerna G, Lilleri D, Chiesa A, Zelini P, Furione M, Comolli G, et al. Virologic and immunologic monitoring of cytomegalovirus to guide preemptive therapy in solid-organ

transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2011;11(11):2463-71.

218. Kumar D, Chernenko S, Moussa G, Cobos I, Manuel O, Preiksaitis J, et al. Cell-mediated immunity to predict cytomegalovirus disease in high-risk solid organ transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2009;9(5):1214-22.

219. Gimenez E, Blanco-Lobo P, Munoz-Cobo B, Solano C, Amat P, Perez-Romero P, et al. Role of cytomegalovirus (CMV)-specific polyfunctional CD8+ T-cells and antibodies neutralizing virus epithelial infection in the control of CMV infection in an allogeneic stem-cell transplantation setting. *The Journal of general virology*. 2015;96(9):2822-31.

220. Humar A, Mazzulli T, Moussa G, Razonable RR, Paya CV, Pescovitz MD, et al. Clinical utility of cytomegalovirus (CMV) serology testing in high-risk CMV D+/R- transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2005;5(5):1065-70.

221. Nigro G, Adler SP, La Torre R, Best AM. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *The New England journal of medicine*. 2005;353(13):1350-62.

222. Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2002;34(8):1094-7.

223. Ritta M, Costa C, Sidoti F, Ballocco C, Ranghino A, Messina M, et al. Pre-transplant assessment of CMV-specific immune response by Elispot assay in kidney transplant recipients. *The new microbiologica*. 2015;38(3):329-35.

224. Sester M, Gartner BC, Sester U, Girndt M, Mueller-Lantzsch N, Kohler H. Is the cytomegalovirus serologic status always accurate? A comparative analysis of humoral and cellular immunity. *Transplantation*. 2003;76(8):1229-30.

225. Cantisan S, Rodelo-Haad C, Paez-Vega A, Nieto A, Vaquero JM, Poyato A, et al. Factors related to the development of CMV-specific CD8+ T cell response in CMV-seropositive solid organ transplant candidates. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2015;15(3):715-22.

226. Schachtner T, Stein M, Reinke P. CMV-Specific T Cell Monitoring Offers Superior Risk Stratification of CMV-Seronegative Kidney Transplant Recipients of a CMV-Seropositive Donor. *Transplantation*. 2017;101(10):e315-e25.

227. Crough T, Fazou C, Weiss J, Campbell S, Davenport MP, Bell SC, et al. Symptomatic and asymptomatic viral recrudescence in solid-organ transplant recipients and its relationship with the antigen-specific CD8(+) T-cell response. *Journal of virology*. 2007;81(20):11538-42.

228. Diaz J, Henao J, Rodelo J, Garcia A, Arbelaez M, Jaimes F. Incidence and risk factors for cytomegalovirus disease in a Colombian cohort of kidney transplant recipients. *Transplantation proceedings*. 2014;46(1):160-6.

229. Hahn G, Revello MG, Patrone M, Percivalle E, Campanini G, Sarasini A, et al. Human cytomegalovirus UL131-128 genes are indispensable for virus growth in endothelial cells and virus transfer to leukocytes. *Journal of virology*. 2004;78(18):10023-33.

230. Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nature reviews Immunology*. 2016;16(10):626-38.

231. Xiao Y, Song J, Jiang Z, Li Y, Gao Y, Xu W, et al. Risk-factor analysis of poor graft function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *International journal of medical sciences*. 2014;11(6):652-7.

232. Freeman RB, Paya C, Pescovitz MD, Humar A, Dominguez E, Washburn K, et al. Risk factors for cytomegalovirus viremia and disease developing after prophylaxis in high-risk solid-organ transplant recipients. *Transplantation*. 2004;78(12):1765-73.

233. Viot B, Garrigue I, Taton B, Bachelet T, Moreau JF, Dechanet-Merville J, et al. Two-year post-transplantation cytomegalovirus DNAemia in asymptomatic kidney transplant recipients: incidence, risk factors, and outcome. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society*. 2015;17(4):497-509.
234. Henrique Pinto C, Tedesco-Silva H, Jr., Rosso Felipe C, Nicolau Ferreira A, Cristelli M, Almeida Viana L, et al. Targeted preemptive therapy according to perceived risk of CMV infection after kidney transplantation. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2016;20(6):576-84.
235. Schachtner T, Zaks M, Otto NM, Kahl A, Reinke P. Factors and outcomes in association with sepsis differ between simultaneous pancreas/kidney and single kidney transplant recipients. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society*. 2018;20(2):e12848.
236. Abdullah M, Chai PS, Chong MY, Tohit ER, Ramasamy R, Pei CP, et al. Gender effect on in vitro lymphocyte subset levels of healthy individuals. *Cellular immunology*. 2012;272(2):214-9.
237. Teixeira D, Longo-Maugeri IM, Santos JL, Duarte YA, Lebrao ML, Bueno V. Evaluation of lymphocyte levels in a random sample of 218 elderly individuals from Sao Paulo city. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*. 2011;33(5):367-71.
238. Furman D, Hejblum BP, Simon N, Jojic V, Dekker CL, Thiebaut R, et al. Systems analysis of sex differences reveals an immunosuppressive role for testosterone in the response to influenza vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(2):869-74.
239. Kim WR, Smith JM, Skeans MA, Schladt DP, Schnitzler MA, Edwards EB, et al. OPTN/SRTR 2012 Annual Data Report: liver. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2014;14 Suppl 1:69-96.
240. Matas AJ, Smith JM, Skeans MA, Thompson B, Gustafson SK, Schnitzler MA, et al. OPTN/SRTR 2012 Annual Data Report: kidney. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2014;14 Suppl 1:11-44.
241. Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Tolkoff-Rubin N, Cosimi AB. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *The New England journal of medicine*. 2002;346(8):580-90.
242. Martin-Gandul C, Stampf S, Hequet D, Mueller NJ, Cusini A, van Delden C, et al. Preventive Strategies Against Cytomegalovirus and Incidence of alpha-Herpesvirus Infections in Solid Organ Transplant Recipients: A Nationwide Cohort Study. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2017;17(7):1813-22.
243. Choudhary NS, Saraf N, Saigal S, Gautam D, Rastogi A, Goja S, et al. Revisiting chronic rejection following living donor liver transplantation in the tacrolimus era: A single center experience. 2018;32(2).
244. Akalin E, Sehgal V, Ames S, Hossain S, Daly L, Barbara M, et al. Cytomegalovirus disease in high-risk transplant recipients despite ganciclovir or valganciclovir prophylaxis. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2003;3(6):731-5.
245. Kim JM, Jang HR, Kwon CH, Huh WS, Kim GS, Kim SJ, et al. Rabbit antithymocyte globulin compared with basiliximab in kidney transplantation: a single-center study. *Transplantation proceedings*. 2012;44(1):167-70.
246. Gasser O, Bihl F, Sanghavi S, Rinaldo C, Rowe D, Hess C, et al. Treatment-dependent loss of polyfunctional CD8+ T-cell responses in HIV-infected kidney transplant recipients is associated with herpesvirus reactivation. *American journal of transplantation : official journal of the*

American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2009;9(4):794-803.

247. Hequet D, Pascual M, Lartey S, Pathirana RD, Bredholt G, Hoschler K, et al. Humoral, T-cell and B-cell immune responses to seasonal influenza vaccine in solid organ transplant recipients receiving anti-T cell therapies. *Vaccine*. 2016;34(31):3576-83.

248. Ge S, Karasyov A, Sinha A, Petrosyan A, Lovato D, Thomas DL, et al. Cytomegalovirus Immunity After Alemtuzumab Induction in Desensitized Kidney Transplant Patients. *Transplantation*. 2017;101(7):1720-6.