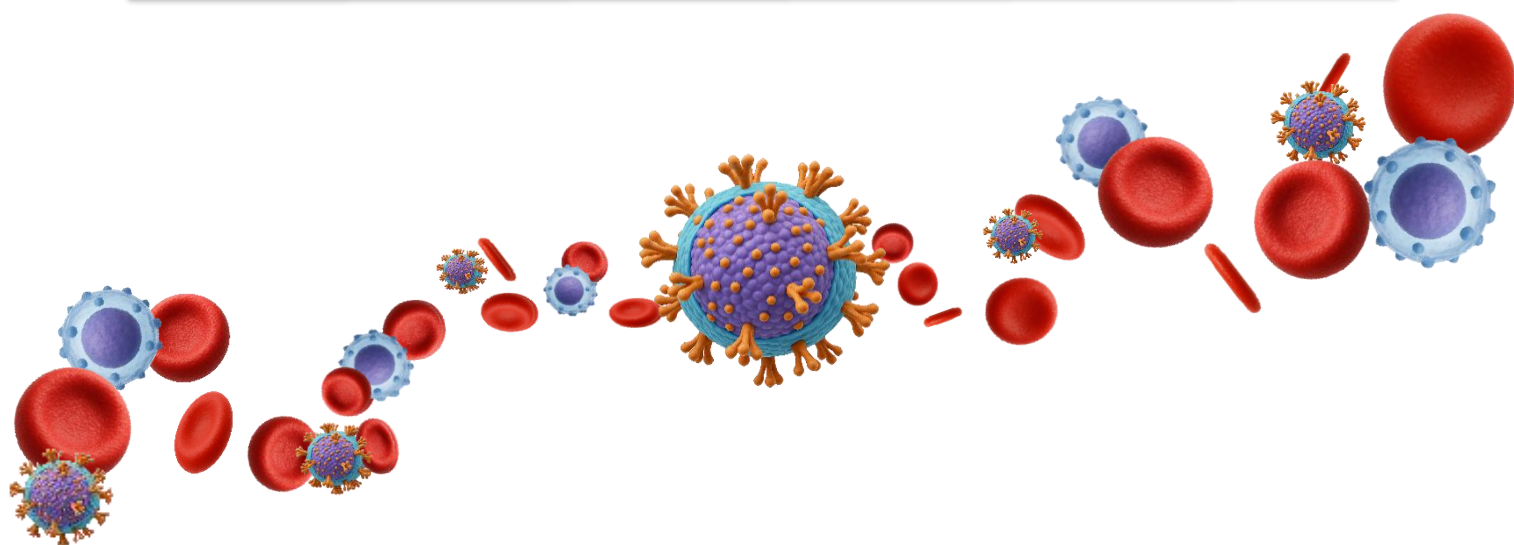




VNIVERSITAT Đ VALÈNCIA

Doctorado en Medicina

# **Virología e inmunología de la infección por citomegalovirus (CMV) en el paciente con neoplasias hematológicas en la era de las nuevas bioterapias**



**TESIS DOCTORAL**

VNIVERSITAT Đ VALÈNCIA  **Facultat de  
Medicina i Odontologia**

**Diciembre 2025**

**Carlos Solano de la Asunción**

**Dirigida por David Navarro Ortega y Eliseo Albert Vicent**





VNIVERSITAT  VALÈNCIA

Departamento de Microbiología y Ecología

Doctorado en Medicina

TESIS DOCTORAL

**Virología e inmunología de la infección  
por citomegalovirus (CMV) en el  
paciente con neoplasias hematológicas  
en la era de las nuevas bioterapias**

VNIVERSITAT  VALÈNCIA

**F**acultat de **M**edicina i **O**dontologia

**Carlos Solano de la Asunción**

---

Dirigida por David Navarro Ortega y Eliseo Albert Vicent

Diciembre 2025





VNIVERSITAT Đ VALÈNCIA

 **Facultat de Medicina i Odontologia**

**D. David Navarro Ortega**, Jefe del Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Clínico Universitario de Valencia y Catedrático del Departamento de Microbiología y Ecología de la Universidad de Valencia,

**D. Eliseo Alejandro Albert Vicent**, Facultativo Especialista del Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Clínico Universitario de Valencia,

**CERTIFICAN:**

Que la tesis doctoral titulada: “Virología e inmunología de la infección por citomegalovirus (CMV) en el paciente con neoplasias hematológicas en la era de las nuevas bioterapias”, ha sido realizada bajo nuestra dirección por Carlos Solano de la Asunción, Graduado en Medicina y Cirugía, y reúne a nuestro juicio las condiciones suficientes para su presentación y defensa para optar al grado de Doctor en Medicina, siempre que cumpla con la normativa prevista por el Programa Doctorado en Medicina de la Universidad de Valencia y así lo considere el tribunal designado por la Universidad de Valencia.

Y para que conste firman el presente certificado en Valencia, a septiembre de 2025.

Fdo.: Prof. David Navarro Ortega

Fdo.: Dr. Eliseo Albert Vicent



*“Not all those who wander are always lost”*





## Agradecimientos

Finalmente, me ha llegado el momento de echar la vista atrás y reconocer todos los esfuerzos que la consecución de esta tesis doctoral ha requerido. Decir que ha sido fácil sería mentir, pero decir que he recorrido en solitario este camino sería una mentira aún mayor.

Poner en palabras lo que ha supuesto este proceso es complicado. No sólo por la intensidad del trabajo, sino por la transformación personal que ha conllevado. Si esta tesis tiene algo de mérito, no es únicamente por el contenido científico, sino por haber conseguido, en paralelo, espantar la molice y adquirir una constancia que ni yo mismo creía posible. Ha sido, en muchos sentidos, una conquista de lo cotidiano y de mí mismo. Me gustaría ser capaz de agradecer a todos aquellos que han tenido parte en esta tesis doctoral.

En primer lugar, a mi familia. A mi madre, mi padre, mi hermano. A mis abuelos. No por convención, sino por convicción. Gracias por enseñarme que todo lo sólido se construye con amor, constancia y presencia. Gracias por la paciencia cuando sobra ansiedad, por la calma cuando me saturaba de todo (de mí mismo, en particular) y, especialmente, por el ejemplo: por mostrarme con hechos lo que es la entrega, el trabajo silencioso y el estar, sin pedirlo, siempre. Por relativizar y hacerme ver *“the big picture”*. Os debo mucho más de lo que nunca seré capaz de explicar aquí.

A mis amigos y compañeros del Servicio de Microbiología, a todos los residentes y adjuntos que me han acompañado, gracias por la amistad. Compartir esta residencia con vosotros ha sido un viaje, literal y metafóricamente. Cruzamos EEUU, y vimos lo bonito y lo majestuoso. Pero, como durante la residencia, también hubo tramos duros y crudos, accidentes y moteles inesperados, que tanto nos enseñaron. Espalda contra espalda, hicimos frente a todo aquello, incluidos pequeños inconvenientes, como la pandemia del SARS-CoV-2. Con vosotros, sin duda el camino ha sido el destino. *“Find your road”*, decíamos. Gracias por ayudarme a encontrar ese camino. A Nacho, Víctor, Dixie, Mireia, Felipe, Bea, Josep y Lorena. Al equipo investigador, a Estela, Patri, Ester y Alberto. Y a Ángela, has llegado más tarde, pero toda una amiga desde ese momento.

A Eliseo, mi codirector de tesis, un referente absoluto en unidades de paciencia, dedicación, buen humor y honestidad. Y de buena música. A Javier Colomina, incansable, irreverente, indómito, una persona en constante búsqueda de la perfección. Su peculiar programa personal e integral ha cambiado muchas cosas en mí, cosas que ni él mismo se esperaba. Y, por supuesto, a David Navarro, el director de esta tesis. Forma con Javier la extraña pareja, compensada, una pena que no lleguéis a formalizarlo. Es a David a quien debo, junto con mis padres, los firmes empujones que han conseguido hacerme ver que, en alguna parte de mí, habitaba una persona mejor y más capaz. Gracias por tu brutal sinceridad, tu vasta cultura, tu provocadora (pero siempre certera) visión de las personas y del mundo. Gracias por no dejarme otra salida que superarme a mí mismo, por mucho que aún me quede por hacer.

Por último, a Arantxa. Qué decir, a estas alturas. Tu aportación a esta tesis ha sido, sin embargo, menor en comparación a tu impacto en mi vida. Desde que te conocí sabía que no eres como el resto. Tu pureza y bondad desmedida, tu inteligencia, tu inmensa capacidad para hacer bien absolutamente todo lo que te propongas, tu autonomía. Tu conciencia e inquebrantable lealtad. Tu resiliencia. Tu mala leche. Tú también me has hecho mejor a pesar de mis esfuerzos por llevarte la contraria, incluido nuestro día a día. Ojalá sigamos construyendo proyectos juntos. A tus padres también, sois una familia increíble y sólo siento agradecimiento por la forma en que siempre me habéis tratado. Y a Coque, pues, aunque ahora nos falte,

siempre estará con nosotros.

Uno no se mejora por casualidad. Se mejora por obstinación y, también, por contagio, por el ejemplo de quienes te rodean, por buscar el entorno adecuado. Se mejora cuando se tiene el coraje de abandonar la queja cómoda y cuando uno se rodea de personas que no permiten el estancamiento, que empujan sin pedir permiso y que te obligan, con su sola presencia, a dar más.

En definitiva, “***per aspera ad astra***”. Pero siempre será menos *aspera* en el lugar y con las personas adecuadas.

Gracias a todos, de corazón.

*A mis abuelos, a mis padres, a Guille y a Arantxa*



## Presentación

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

Los trabajos de carácter científico que componen esta tesis doctoral se citan a continuación siguiendo un orden cronológico:

- I. Solano de la Asunción C, Terol MJ, Saus A, Olea B, Giménez E, Albert E, López-Jiménez J, Andreu R, García D, Fox L, Remigia MJ, Amat P, Solano C, Navarro D. Cytomegalovirus-specific T-cell immunity and ADNemia in patients with chronic lymphocytic leukaemia undergoing treatment with ibrutinib. *Br J Haematol*. 2021 Nov;195(4):637-641.
- II. Solano de la Asunción C, Giménez E, Hernández-Boluda JC, Terol MJ, Albert E, López-Jiménez J, García-Gutiérrez V, Andreu R, García D, Fox ML, Remigia MJ, Amat P, Solano C, Navarro D. Immunobiology of cytomegalovirus infection in patients with haematological malignancies undergoing treatment with small molecule inhibitors. *Br J Haematol*. 2023 Mar;200(6):e58-e61.
- III. Solano de la Asunción C, Hernani R, Albert E, Gómez MD, Giménez E, Benzaquén A, González-Barberá EM, Hernández-Boluda JC, Pérez A, Piñana JL, Choraó P, Guerreiro M, Montoro J, Sanz J, Solano C, Navarro D. Cytomegalovirus ADNemia in haematological patients undergoing CD19-directed chimeric antigen receptor T-cell therapy: should it be systematically monitored? *Clin Microbiol Infect*. 2023 Aug;29(8):1093-1095.
- IV. Solano de la Asunción C, Giménez E, Hernández-Boluda JC, Terol MJ, Albert E, López J, García-Gutiérrez V, Andreu R, Malo MDG, Fox ML, Remigia MJ, Amat P, Solano C, Navarro D. Assessment of the potential value of plasma Torque Teno virus DNA load monitoring to predict cytomegalovirus ADNemia in patients with hematological malignancies treated with small molecule inhibitors: A proof-of-concept study. *J Med Virol*. 2023 Jul;95(7):e28933.



## Abreviaturas y acrónimos

ADN = ácido desoxirribonucleico

ssADN = ADN de cadena sencilla

Alo-TPH = alo trasplante de progenitores hematopoyéticos

AIR = acondicionamiento de intensidad reducida

AMA = acondicionamiento mieloablativo

AOR = *Adjusted Odds Ratio*; razón de probabilidades ajustada

ARN = ácido ribonucleico

ATG = globulina antitimocítica o antitimoglobulina

ATP = adenosín trifosfato

BCL-2 = *B-cell lymphoma type 2 protein*; proteína tipo 2 de linfoma de células B

BCR/ABL = *breakpoint cluster region/Abelson tyrosine kinase*; región de ruptura agrupada/quinasa de tirosina de Abelson

BTK = *Bruton's tyrosin kinase*; tirosín quinasa de Bruton

CD = *cluster of differentiation*; cúmulo de diferenciación

Cdc42 = *cell division cycle 42*; ciclo de división celular 42

CMV = citomegalovirus

CMVH = citomegalovirus humano

CRS = *cytokine release syndrome*; síndrome de liberación de citoquinas

CT = *cycle threshold*; umbral de ciclo

DCs = *dendritic cells*; células dendríticas

DE = donante emparentado

DNE = donante no emparentado

EICR = enfermedad injerto contra receptor

EICRa = enfermedad injerto contra receptor aguda

EICRc = enfermedad injerto contra receptor crónica

ErbB2 = *Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2*; homólogo 2 del oncogén viral de leucemia eritroblástica

EM = esclerosis múltiple

ERK = *extracellular signal-regulated kinases*; quinasas reguladas por señales extracelulares

FDA = *Food and Drug Administration*; Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos

FSC = *forward scatter component*; componente de dispersión frontal

FSC-A = *forward scatter component-area*; área del componente de dispersión frontal

FSC-H = *forward scatter component-height*; altura del componente de dispersión frontal  
 gB = *glycoprotein B*; glucoproteína B  
 gH = *glycoprotein H*; glucoproteína H  
 GI = gastrointestinal  
 gL = *glycoprotein L*; glucoproteína L  
 gM = *glycoprotein M*; glucoproteína M  
 gN = *glycoprotein N*; glucoproteína N  
 HAP = hipertensión arterial pulmonar  
 HHV-6 = *human herpes virus 6*; virus del herpes humano 6  
 HHV-7 = *human herpes virus 7*; virus del herpes humano 7  
 HHV-8 = *human herpes virus 8*; virus del herpes humano 8  
 HLA = *human leukocyte antigen*; antígeno leucocitario humano  
 HUCV = Hospital Clínico Universitario de Valencia  
 HUPLF = Hospital Universitario y Politécnico La Fe  
 ICT = injerto contra tumor  
 ICTV = *International Committee on Taxonomy of Viruses*; Comité Internacional de Taxonomía Viral  
 IgG = inmunoglobulina G  
 IgM = inmunoglobulina M  
 IE = *immediate early*; inmediato temprano  
 IFN- $\gamma$  = interferón gamma  
 IMC = índice de masa corporal  
 IRS = *internal repeat short*; repetición interna corta  
 IRT = *internal repeat long*; repetición interna larga  
 IV = intravenoso  
 JAK = *Janus tyrosine kinase*; cinasa de tirosina Janus  
 JAK-STAT = *Janus tyrosine kinase - signal transducer and activator of transcription*; cinasa de tirosina Janus - transductor de señal y activador de la transcripción  
 JNK = *Jun N-terminal kinase*; cinasa N-terminal de Jun  
 LBA = lavado bronco-alveolar  
 LCR= líquido cefalorraquídeo  
 LDH = lactato deshidrogenasa  
 DLBGL = linfoma difuso de linfocitos B grandes  
 LF = linfoma folicular  
 LH = linfoma de Hodgkin

LLA = leucemia linfoblástica aguda

LMA = leucemia mieloide aguda

LMC = leucemia mieloide crónica

MEK = *mitogen-activated protein kinase/ERK kinase*; quinasa activada por mitógenos/cinasa ERK

MICB = *MHC class I polypeptide-related sequence B*; secuencia B relacionada con el polipéptido de clase I del MHC

microARN = micro ácido ribonucleico

MIEP = *major immediate early promoter*; promotor inmediato temprano mayor

MHC = *major histocompatibility complex*; complejo principal de histocompatibilidad

TAAN = técnica de amplificación de ácidos nucleicos

ND10 = *nuclear domain 10*; dominio nuclear 10

NF-κB = *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*; factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa en células B activadas

NK = *natural killer*; asesina natural

PCR = *polymerase chain reaction*; reacción en cadena de la polimerasa

PDGF = *platelet-derived growth factor*; factor de crecimiento derivado de plaquetas

PD-L1 = *programmed death-ligand 1*; ligando 1 de muerte celular programada

PET = *preemptive treatment*; tratamiento anticipado

Ph+ = Philadelphia positivo

PI3K = *phosphatidylinositol 3-kinase*; fosfatidilinositol 3-cinasa

pp = *phosphoprotein*; fosfoproteína

pre-miRNAs = microARNs precursores

PV = policitemia vera

Rac1 = *ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*; sustrato 1 de la toxina botulínica C3 relacionado con ras

RAF = rapidly accelerated fibrosarcoma; fibrosarcoma acelerado rápidamente

RC = remisión completa

RER = retículo endoplásmico rugoso

ROS = *reactive oxygen species*; especies reactivas del oxígeno

SCT = *stem cell transplantation*; trasplante de células madre

SG = supervivencia global

SIDA = síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SMD = síndrome mielodisplásico

SSC = *side scatter component*; componente de dispersión lateral

STAT = *signal transducer and activator of transcription*; transductor de señal y activador de la transcripción

STING = *stimulator of interferon genes*; estimulador de genes de interferón

TAP = transportador asociado al procesamiento de antígenos

TCR = receptor de célula T

TILs = *tumor-infiltrating lymphocytes*; linfocitos infiltrantes de tumor

KTI = *kinase tyrosin inhibitors*; inhibidores de tirosín quinasa

TLR = *toll-like receptor*; receptor tipo toll

TNF $\alpha$  = *tumoral necrosis factor alpha*; factor de necrosis tumoral alfa

TOS = trasplante de órgano sólido

TPH = trasplante de progenitores hematopoyéticos

T-regs = células T reguladoras

TRL = *terminal repeat long*; repetición terminal larga

TTV = torqueteno virus; virus torqueteno

UL = *unique long*; único largo

US = *unique short*; único corto

VEB = virus de Epstein-Barr

VIH = virus de la inmunodeficiencia humana

# Índice

|                                                                                                                                                                                                   |             |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>AGRADECIMIENTOS .....</b>                                                                                                                                                                      | <b>VII</b>  |
| <b>PRESENTACIÓN .....</b>                                                                                                                                                                         | <b>XI</b>   |
| <b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS .....</b>                                                                                                                                                             | <b>XIII</b> |
| <b>ÍNDICE .....</b>                                                                                                                                                                               | <b>XVII</b> |
| <b>RESUMEN .....</b>                                                                                                                                                                              | <b>XIX</b>  |
| <b>INTRODUCCIÓN .....</b>                                                                                                                                                                         | <b>1</b>    |
| <b>I. EL CITOMEGALOVIRUS HUMANO .....</b>                                                                                                                                                         | <b>3</b>    |
| I.1. Consideraciones históricas y taxonomía .....                                                                                                                                                 | 3           |
| I.2. Aspectos genómicos y estructurales del CMV .....                                                                                                                                             | 4           |
| I.3. Genoma del CMV y mecanismos de evasión inmunológica .....                                                                                                                                    | 7           |
| I.4. Análisis epidemiológico y transmisión de la infección por CMV .....                                                                                                                          | 10          |
| I.5. Células diana y ciclo viral del CMV .....                                                                                                                                                    | 12          |
| I.6. Definición de infección por CMV .....                                                                                                                                                        | 16          |
| I.7. La infección por CMV y control inmunitario en situación de inmunocompetencia .....                                                                                                           | 18          |
| I.8. La infección por CMV en pacientes con neoplasias hematológicas .....                                                                                                                         | 21          |
| I.9. Métodos de cuantificación de respuesta inmune T específica .....                                                                                                                             | 24          |
| <b>II. IMPACTO DE LAS NUEVAS TERAPIAS DIRIGIDAS Y BIOTERAPIAS EN EL MANEJO DE LA INFECCIÓN POR CMV .....</b>                                                                                      | <b>25</b>   |
| II.1. Ibrutinib .....                                                                                                                                                                             | 26          |
| II.2. Venetoclax .....                                                                                                                                                                            | 28          |
| II.3. Dasatinib .....                                                                                                                                                                             | 29          |
| II.4. Ruxolitinib .....                                                                                                                                                                           | 31          |
| II.5. Terapia CAR-T .....                                                                                                                                                                         | 33          |
| <b>III. TORQUE TENO VIRUS: ASPECTOS GENERALES Y ESTRUCTURA .....</b>                                                                                                                              | <b>39</b>   |
| III.1. TTV como marcador subrogado del estatus inmunitario. Relación con la infección por CMV .....                                                                                               | 40          |
| III.2. La infección por TTV en el contexto del trasplante de órgano sólido .....                                                                                                                  | 42          |
| III.3. La infección TTV en el alo-trasplante de progenitores hematopoyéticos .....                                                                                                                | 43          |
| <b>HIPÓTESIS .....</b>                                                                                                                                                                            | <b>47</b>   |
| <b>OBJETIVOS .....</b>                                                                                                                                                                            | <b>51</b>   |
| <b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>                                                                                                                                                                   | <b>55</b>   |
| I. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS .....                                                                                                                                                     | 57          |
| II. CUANTIFICACIÓN DE ADN DE CMV EN PLASMA .....                                                                                                                                                  | 60          |
| III. CUANTIFICACIÓN DE ADN DE TTV EN PLASMA .....                                                                                                                                                 | 61          |
| IV. RECUENTO DE LINFOCITOS TOTALES .....                                                                                                                                                          | 64          |
| V. MONITORIZACIÓN VIROLÓGICA Y MANEJO DE LA INFECCIÓN POR CMV .....                                                                                                                               | 64          |
| VI. MONITORIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE ESPECÍFICA FRENTE A CMV .....                                                                                                                           | 65          |
| VII. DEFINICIONES .....                                                                                                                                                                           | 69          |
| VIII. RECOLECCIÓN, ALMACENAMIENTO Y GESTIÓN DE LOS DATOS .....                                                                                                                                    | 70          |
| IX. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....                                                                                                                                                                    | 70          |
| <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>                                                                                                                                                               | <b>71</b>   |
| <b>I. ESTUDIO DE LA DINÁMICA DE LA ADNEMIA Y RESPUESTA INMUNE DE CÉLULAS T FRENTE AL CITOMEGALOVIRUS Y EN PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA (LLC) EN TRATAMIENTO CON IBRUTINIB .....</b> | <b>73</b>   |
| I.1. Presencia e impacto de la ADNemia de CMV en pacientes con LLC en tratamiento con ibrutinib .....                                                                                             | 73          |
| I.2. Respuesta inmune T-específica frente a CMV en pacientes con leucemia linfocítica crónica en tratamiento con ibrutinib .....                                                                  | 74          |
| I.3. Discusión .....                                                                                                                                                                              | 77          |
| <b>II. ANÁLISIS DEL IMPACTO DE LA ADNEMIA Y LA INMUNIDAD T EN PACIENTES CON NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS EN TRATAMIENTO CON SMALL MOLECULE INHIBITORS .....</b>                                       | <b>79</b>   |
| II.1. Presencia e impacto de la ADNemia de CMV en pacientes con neoplasias hematológicas en pacientes en tratamiento con nuevas terapias .....                                                    | 79          |
| II.2. Evaluación de la respuesta T a la infección por CMV en pacientes con neoplasias hematológicas bajo tratamiento .....                                                                        |             |

|                                                                                                                                                 |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| con small molecule inhibitors .....                                                                                                             | 81         |
| II.3 Discusión .....                                                                                                                            | 83         |
| <b>III. MONITORIZACIÓN SISTEMÁTICA DE LA ADNEMIA POR CMV EN TERAPIA CAR-T EN PACIENTES HEMATOLÓGICOS: ¿UNA NECESIDAD CLÍNICA?</b> .....         | <b>86</b>  |
| III.1. Presencia e impacto de la ADNemia de CMV en pacientes con neoplasias hematológicas en pacientes receptores de terapia CAR-T .....        | 86         |
| III.2. Discusión .....                                                                                                                          | 90         |
| <b>IV. VALOR PREDICTIVO DE LA CARGA DE ADN DEL VIRUS TORQUE TENO PARA LA ADNEMIA POR CITOMEGALOVIRUS EN NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS</b> .....      | <b>92</b>  |
| IV.1. Estudio de la cinética de la viremia por TTV en plasma de pacientes tratados con small molecule inhibitors ....                           | 92         |
| IV.2. Estudio de la correlación entre las cargas de ADN de TTV y los recuentos de linfocitos absolutos y de células T CD4+ y CD8+ totales ..... | 95         |
| IV.3. Monitorización de la carga de ADN TTV en plasma como predictor de ADNemia por citomegalovirus .....                                       | 97         |
| IV.4. Correlación entre las cargas virales de TTV y las células T-CD8 + y CD4 + productoras de IFN-γ específicos de CMV .....                   | 98         |
| IV.5. Discusión .....                                                                                                                           | 101        |
| <b>CONCLUSIONES</b> .....                                                                                                                       | <b>105</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....                                                                                                                       | <b>109</b> |
| <b>ANEXOS</b> .....                                                                                                                             | <b>123</b> |
| ESCRITO DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL SOBRE EL FACTOR DE IMPACTO DE LAS PUBLICACIONES QUE SE RECOGEN EN LA TESIS DOCTORAL                   | 125        |
| PRIMER ARTÍCULO .....                                                                                                                           | 125        |
| SEGUNDO ARTÍCULO .....                                                                                                                          | 126        |
| TERCER ARTÍCULO .....                                                                                                                           | 127        |
| CUARTO ARTÍCULO .....                                                                                                                           | 128        |
| INFORME DEL DIRECTOR Y CODIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL SOBRE LA COAUTORÍA DE LAS PUBLICACIONES COMPENDIADAS EN TESIS DOCTORAL .....             | 129        |
| <b>TRABAJOS PUBLICADOS O ACEPTADOS</b> .....                                                                                                    | <b>131</b> |

# Resumen

## Marco histórico y teórico

El citomegalovirus humano (CMV), miembro de la familia *Herpesviridae* y del género *Betaherpesvirus*, representa uno de los virus más ubicuos y clínicamente relevantes en el campo de la virología médica y la hematología. Desde su primera descripción en el siglo XX, cuando se reconocieron las características histopatológicas distintivas de células gigantes con inclusiones intranucleares (las llamadas “células en ojo de búho”), el CMV ha sido objeto de atención por su capacidad de establecer una infección latente de por vida en el huésped humano. Su genoma de gran tamaño y su compleja interacción con el sistema inmunitario lo convierten en un modelo privilegiado para comprender la coevolución virus-huésped y los mecanismos de evasión inmunitaria. La historia de la investigación sobre CMV refleja también el progreso en las herramientas diagnósticas, desde las técnicas histológicas y de cultivo celular hasta la antigenemia, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y, más recientemente, la monitorización cuantitativa estandarizada.

El genoma del CMV, de aproximadamente 235 kilobases, codifica más de 200 proteínas y una amplia gama de ARN no codificantes que contribuyen a modular tanto la replicación viral como la respuesta del huésped. Su compleja organización genética, con genes tempranos, tardíos e inmediatos, asegura la capacidad del virus de establecer un ciclo lítico completo o, alternativamente, mantener un estado de latencia en distintos reservorios celulares, entre ellos monocitos y células progenitoras hematopoyéticas. La plasticidad de este virus ha favorecido su persistencia evolutiva y su notable prevalencia en la población mundial, con tasas de seropositividad que superan el 60–70% en adultos, y que alcanzan cifras superiores al 90% en países en vías de desarrollo.

Desde un punto de vista epidemiológico, la infección primaria por CMV ocurre con mayor frecuencia en la infancia o en la adolescencia y suele ser asintomática en individuos inmunocompetentes. Sin embargo, el virus reviste gran importancia en contextos de inmunosupresión, como el trasplante de órgano sólido (TOS), el trasplante hematopoyético (TPH), las neoplasias hematológicas y el tratamiento con

fármacos inmunomoduladores. En estos escenarios, el CMV puede reactivarse desde su estado latente, ocasionando viremias detectables (ADNemia) y, en casos severos, enfermedad de órganos diana, con afectación gastrointestinal, pulmonar, hepática o retiniana. Además, múltiples estudios han demostrado que incluso la replicación subclínica puede ejercer efectos indirectos deletéreos, como un mayor riesgo de rechazo en trasplantes, incremento de infecciones oportunistas y aumento de la mortalidad global.

El control del CMV depende de manera fundamental de la inmunidad celular. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos y los linfocitos T CD4<sup>+</sup> cooperadores desempeñan un papel esencial en contener la replicación viral. En paralelo, las células NK actúan como una primera barrera de defensa frente a la reactivación viral. No obstante, el CMV ha desarrollado un amplio repertorio de estrategias de evasión inmunológica, que incluyen la modulación de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), la producción de homólogos virales de citocinas y quimioquinas, y la interferencia con las vías de señalización del interferón. Este equilibrio entre presión inmunitaria y evasión viral explica la frecuente detección de episodios de ADNemia en pacientes inmunocomprometidos sin que necesariamente progresen a enfermedad clínica.

En el ámbito de las neoplasias hematológicas, la relevancia del CMV es doble. Por un lado, la enfermedad de base y los tratamientos convencionales (especialmente la quimioterapia y el TPH alogénico) condicionan estados de inmunodepresión que favorecen la reactivación viral. Por otro lado, la irrupción en la última década de nuevas terapias dirigidas ha abierto un escenario complejo. Inhibidores de moléculas pequeñas, como ibrutinib, venetoclax, inhibidores de tirosina quinasa (TKI) y ruxolitinib, así como la terapia con células CAR-T, han transformado el pronóstico de enfermedades como la leucemia linfocítica crónica, la leucemia mieloide crónica, las neoplasias mieloproliferativas o los linfomas refractarios. Sin embargo, estas terapias, al modular de manera directa o indirecta la inmunidad adaptativa e innata, plantean nuevas incógnitas acerca de su interacción con infecciones latentes como el CMV.

El ibrutinib, inhibidor selectivo de la tirosina quinasa de Bruton (BTK), ha supuesto un hito en el tratamiento de la LLC y otras neoplasias de células B. Aunque

su perfil de toxicidad es más favorable que el de la quimioterapia convencional, se ha documentado un aumento de infecciones oportunistas, incluyendo micosis invasoras y reactivaciones virales. Su efecto sobre la señalización del receptor de células B y sobre las interacciones entre células B, células T y macrófagos podría explicar, al menos en parte, estas alteraciones inmunológicas. En el caso del CMV, se ha descrito la aparición de episodios de ADNemia en pacientes tratados con ibrutinib, aunque con tendencia a hacia la resolución espontánea, lo que sugiere que la inmunidad antiviral conserva su eficacia funcional pese a las modificaciones cuantitativas en la población linfocitaria.

El ruxolitinib, inhibidor de JAK1/2, utilizado en la policitemia vera y en la mielofibrosis, se asocia con un riesgo elevado de infecciones, incluidas reactivaciones virales como las de CMV y virus herpes zóster. Su capacidad para inhibir la vía JAK-STAT, crucial en la señalización de múltiples citocinas, compromete de manera significativa la activación y función de linfocitos y células dendríticas. En consecuencia, la vigilancia inmunológica frente a virus persistentes puede verse reducida. Aun así, los estudios sugieren que, incluso en este contexto, la mayoría de episodios de ADNemia no derivan en enfermedad de órgano diana, lo que apunta a una inmunidad residual aún efectiva.

De forma similar, los inhibidores de BCR-ABL1, como dasatinib, han revolucionado la leucemia mieloide crónica, pero se han vinculado a alteraciones inmunológicas que incluyen linfocitopenia y disfunción de células NK y T. En este escenario, la incidencia de ADNemia por CMV también parece incrementada, aunque sin traducirse en un aumento paralelo de enfermedad clínica. El venetoclax, inhibidor de BCL-2, constituye otro pilar en la terapéutica moderna de la LLC, y aunque su perfil infeccioso es menos problemático, se han reportado casos de reactivación viral que requieren atención.

Una mención especial merece la terapia con células CAR-T, que ha revolucionado el abordaje de linfomas y leucemias refractarias. La profunda inmunosupresión inducida por la quimioterapia de acondicionamiento, la expansión masiva de linfocitos T modificados y las complicaciones inmunológicas asociadas, como el síndrome de liberación de citocinas (CRS) o la neurotoxicidad (ICANS), configuran un terreno fértil para infecciones oportunistas. En este contexto, la

ADNemia por CMV se presenta con frecuencia y, aunque tiende a resolverse espontáneamente, la detección basal de viremia se asocia a cargas más elevadas y, en ocasiones, a la necesidad de instaurar tratamiento anticipado. Estos hallazgos abren la puerta a considerar la monitorización sistemática en determinados subgrupos de riesgo.

En paralelo al estudio de la respuesta inmunitaria frente al CMV, en los últimos años se ha explorado el Torque Teno virus (TTV) como biomarcador indirecto del estado inmunitario. El TTV es un virus anelovirus no patógeno, altamente prevalente en la población general, cuya replicación se ha correlacionado con el grado de inmunosupresión en trasplantes de órgano sólido y TPH. Niveles elevados de ADN de TTV en plasma se han vinculado a un mayor riesgo de infecciones oportunistas, incluyendo ADNemia por CMV, en estos contextos. Sin embargo, la utilidad de este biomarcador en pacientes hematológicos tratados con small molecule inhibitors no se ha confirmado. De hecho, los estudios sugieren que la carga de TTV no predice la aparición de ADNemia por CMV ni se correlaciona con la reconstitución de células T específicas, lo que limita su valor clínico en este escenario concreto.

En síntesis, la literatura acumulada en las últimas décadas ha permitido situar al CMV como un modelo paradigmático de infección latente, cuyas interacciones con el sistema inmunitario resultan especialmente relevantes en pacientes inmunocomprometidos. En las neoplasias hematológicas, el advenimiento de nuevas terapias dirigidas ha modificado el panorama clínico, generando la necesidad de revisar de manera crítica la epidemiología, la inmunobiología y el manejo de la ADNemia por CMV. Si bien la mayor parte de los episodios de replicación viral detectados en estos pacientes no progresan a enfermedad clínica, la vigilancia inmunológica se ve modulada de manera diversa por cada tratamiento, lo que justifica la investigación detallada de estos procesos. Asimismo, el estudio de biomarcadores alternativos como el TTV ofrece una perspectiva prometedora, aunque todavía no definitiva, en la búsqueda de herramientas predictivas que permitan personalizar la monitorización y la intervención terapéutica.

## Metodología empleada

El presente trabajo se fundamenta en un conjunto de estudios observacionales, retrospectivos y prospectivos, multicéntricos y unicéntricos, diseñados para evaluar la dinámica de la ADNemia por citomegalovirus (CMV), la inmunidad celular específica frente al virus y el potencial valor predictivo de biomarcadores alternativos en pacientes con neoplasias hematológicas sometidos a diferentes modalidades terapéuticas, incluyendo inhibidores de moléculas pequeñas y terapia con células CAR-T. La sección de Material y Métodos de esta tesis recoge de manera detallada las características de cada cohorte, el procesamiento de muestras biológicas, las técnicas de laboratorio empleadas, las definiciones clínicas utilizadas para la interpretación de los resultados y los procedimientos estadísticos aplicados en el análisis de los datos.

## Diseño y características de los estudios

El **primer estudio** incluyó a 23 pacientes adultos consecutivos con leucemia linfocítica crónica (LLC) seropositivos para CMV tratados con ibrutinib en monoterapia. Se trató de un estudio observacional multicéntrico con un seguimiento de seis meses, en el que se monitorizó la carga viral de CMV y se analizó la inmunidad T específica frente al virus en diferentes puntos temporales.

El **segundo estudio** abarcó a 36 pacientes seropositivos para CMV con neoplasias hematológicas tratados con venetoclax, inhibidores de BCR-ABL1 o ruxolitinib, reclutados en cinco hospitales españoles entre 2019 y 2022. Se trató de un estudio prospectivo multicéntrico con un periodo de observación de 180 días tras el inicio del tratamiento.

El **tercer estudio** consistió en un análisis retrospectivo de 51 pacientes consecutivos seropositivos para CMV receptores de terapia con células CAR-T, tratados en dos centros hospitalarios de referencia. Se evaluó la incidencia de ADNemia durante los 90 días posteriores a la infusión celular, así como los factores clínicos y biológicos asociados a su aparición.

El **cuarto estudio** incluyó la monitorización del virus Torque Teno (TTV) en

20 pacientes tratados con ibrutinib y 21 pacientes tratados con ruxolitinib, mediante la cuantificación seriada del ADN plasmático y su correlación con la aparición de ADNemia por CMV y con parámetros inmunológicos.

### **Obtención y procesamiento de muestras biológicas**

En los estudios analizados, las muestras de sangre total se obtuvieron en tubos con heparina sódica conforme a los calendarios de cada protocolo. Para la determinación de cargas virales de CMV o TTV, las muestras se centrifugaron a 2.000 rpm durante 10 minutos, separándose el plasma, que fue transferido a tubos estériles, etiquetado y almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis mediante PCR en tiempo real, dentro de un plazo máximo de un mes y sin descongelaciones intermedias.

En el estudio de inmunidad T específica frente a CMV, las muestras se procesaron inmediatamente. Se realizó estimulación antigénica directa sobre sangre total, con posterior criopreservación de las alícuotas estimuladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se aplicaron técnicas de tinción intracelular de citocinas (ICS) y análisis por citometría de flujo.

### **Cuantificación de ADN viral (CMV y TTV)**

La carga de CMV se determinó en plasma utilizando ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real (Abbott Molecular RealTime CMV assay), con un límite de detección validado en 15 UI/ml. En el caso del TTV, la cuantificación se realizó mediante PCR en tiempo real, empleando controles internos estandarizados y expresando los resultados en  $\log_{10}$  copias/ml. La frecuencia de muestreo se adaptó a cada estudio: quincenal hasta el día +90 y posteriormente mensual en pacientes tratados con inhibidores de moléculas pequeñas, y semanal durante el primer mes seguido de controles en los días +60 y +90 en receptores de terapia CAR-T.

### **Monitorización inmunológica**

La caracterización de la respuesta T específica frente a CMV se llevó a cabo mediante citometría de flujo con tinción intracelular de citocinas (ICS). Para ello, las

PBMCs fueron estimuladas in vitro con péptidos derivados de las proteínas inmunodominantes IE-1 y pp65 del CMV. Tras la incubación, se emplearon anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos frente a CD3, CD4, CD8 e IFN- $\gamma$ , entre otros marcadores. Se incluyeron controles negativos (células no estimuladas) y positivos (estimulación con PMA/ionomicina).

El análisis citométrico se realizó en equipos de ocho y diez colores, generando diagramas de dispersión (dot plots) a partir de los parámetros de dispersión frontal y lateral para identificar poblaciones linfocitarias. La estrategia de gating consistió en:

- Selección de células viables mediante exclusión de detritos.
- Definición de la población linfocitaria (CD3+).
- Subdivisión en células CD4+ y CD8+.
- Cuantificación de la producción intracelular de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  tras estimulación antigénica.

Esta metodología permitió caracterizar tanto la magnitud como la funcionalidad de la respuesta T específica frente al CMV. Asimismo, se analizó la frecuencia de células T reguladoras (T-regs) mediante tinción para CD4 y CD25, con objeto de valorar su posible asociación con la aparición de ADNemia.

### **Definiciones clínicas**

Se definió ADNemia detectable como la presencia de  $\geq 15$  UI/ml de ADN de CMV en plasma. Se consideró episodio de blip a la detección aislada de carga viral baja, con resolución espontánea en la siguiente determinación. La recurrencia se definió como dos o más episodios de ADNemia separados por al menos 14 días de negatividad. La enfermedad de órgano diana se estableció únicamente ante la combinación de ADNemia y clínica compatible confirmada por pruebas de imagen, histológicas o microbiológicas. El inicio de terapia antiviral preventiva (PET) con ganciclovir o valganciclovir se aplicó siguiendo los protocolos locales, habitualmente ante cargas  $\geq 1.500$  UI/ml. En el caso del TTV, se definió como carga detectable la cuantificación superior al umbral de sensibilidad del ensayo empleado.

## **Análisis estadístico**

El tratamiento estadístico se realizó con software especializado (SPSS, GraphPad Prism). Las variables continuas se describieron mediante medianas y rangos intercuartílicos, y las categóricas como frecuencias absolutas y porcentajes. Para comparaciones entre grupos se emplearon pruebas no paramétricas (Mann–Whitney, Kruskal–Wallis) y pruebas exactas de Fisher o  $\chi^2$  en variables categóricas. Las correlaciones se analizaron mediante coeficientes de Spearman (rho). La incidencia acumulada de ADNemia se estimó con curvas de Kaplan–Meier, y se calcularon cocientes de riesgo (hazard ratios) mediante modelos de regresión de Cox. Se consideró un valor de  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo.

## **Objetivos**

La infección por CMV, por tanto, continúa constituyendo un desafío relevante en el manejo de pacientes inmunodeprimidos, especialmente en aquellos con neoplasias hematológicas. Tradicionalmente, este reto se ha evidenciado en el contexto del trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH), donde la reactivación viral puede dar lugar a una morbilidad y mortalidad significativas. En la última década, sin embargo, la oncología hematológica ha experimentado una transformación profunda, impulsada por la irrupción de terapias innovadoras, como los inhibidores de pequeñas moléculas y la terapia con células CAR-T. Si bien estos avances han mejorado de manera sustancial los resultados oncológicos, han introducido nuevas complejidades en la interacción entre el huésped, el virus y el tratamiento. Es en este contexto de nuevo paradigma terapéutico donde se enmarcan los objetivos de la presente tesis, dirigida a explorar las incógnitas que emergen en la intersección de la inmunología, la virología y las bioterapias modernas.

El objetivo principal de la investigación consiste en desentrañar la dinámica del CMV en pacientes sometidos a estas terapias de vanguardia. En primer lugar, se busca caracterizar la incidencia y las manifestaciones clínicas de la reactivación viral, considerando que estas poblaciones presentan patrones de inmunosupresión distintos de los observados tras TPH convencional. Resulta esencial comprender cómo la modulación de las vías de señalización inmunitaria mediante fármacos

como los inhibidores de tirosina quinasa, o la alteración profunda del sistema inmune inducida por la terapia CAR-T, afecta la capacidad del organismo para mantener al CMV en estado de latencia. De este modo, el estudio pretende determinar si estos tratamientos representan un riesgo intrínseco de reactivación y cómo dicho riesgo se modula según el tipo de terapia y el perfil individual del paciente.

Un segundo objetivo de gran relevancia en la era de la medicina personalizada es la identificación de biomarcadores que permitan una monitorización más precisa y una estratificación adecuada del riesgo. En este sentido, la tesis plantea evaluar el TTV como biomarcador no invasivo de la inmunosupresión celular. Dada su correlación previamente establecida con el estado inmunitario del huésped, el TTV podría actuar como herramienta predictiva, anticipando qué pacientes presentan mayor probabilidad de reactivación de CMV. Este enfoque permitiría implementar estrategias de vigilancia y profilaxis antiviral dirigidas, reduciendo el riesgo de complicaciones derivadas de reactivaciones no controladas.

Finalmente, el objetivo último de este trabajo es generar conocimiento que contribuya a la optimización del manejo clínico de estos pacientes. Al profundizar en la virología del CMV en el contexto de nuevas bioterapias y validar potenciales biomarcadores como el TTV, la investigación aspira a dotar a los profesionales de la salud de herramientas diagnósticas y predictivas más robustas, con el fin de minimizar la morbilidad y la mortalidad asociadas a la reactivación viral y avanzar hacia un enfoque terapéutico seguro, personalizado y eficaz en una de las poblaciones más vulnerables de la oncología hematológica.

## **Resultados y discusión**

### **Estudio de la dinámica de la ADNemia y respuesta inmune de células T frente al citomegalovirus en pacientes con leucemia linfocítica crónica tratados con ibrutinib**

El presente análisis (Solano de la Asunción et al., Br J Haematol, 2021) abordó la interacción entre la replicación viral de CMV y la respuesta inmunitaria mediada por células T en pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC) tratados

con ibrutinib. Este estudio observacional multicéntrico incluyó 23 pacientes adultos seropositivos para CMV (mediana de edad 69 años, rango 48–86; 16 varones), seguidos prospectivamente durante seis meses mientras recibían ibrutinib en monoterapia. El objetivo principal fue evaluar la incidencia y cinética de la ADNemia plasmática por CMV, así como la dinámica de las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicas frente al virus.

La monitorización de la ADNemia se realizó al inicio del tratamiento y en los días +15, +30, +45, +60, +75, +90, +120, +150 y +180. Se detectó ADNemia en 7 de los 23 pacientes (30,4 %) entre los días 15 y 45, con un único caso presente en el inicio del tratamiento. La mayoría de estos episodios correspondieron a blips transitorios y ninguna carga viral superó las 210 UI/ml. Cabe señalar que la mayoría de los pacientes con ADNemia no habían recibido quimioterapia previa. Todos los episodios resolvieron espontáneamente sin progresión a enfermedad por órgano diana ni recurrencias durante el seguimiento, sugiriendo un curso clínico benigno de la replicación viral en este contexto.

En relación con la inmunidad T específica frente a CMV, al inicio del estudio (día 0) 19 de los 23 pacientes presentaban respuestas detectables de células T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> o ambas, cifra similar a la observada en individuos sanos seropositivos. No obstante, la aparición de ADNemia no se correlacionó con el recuento basal de células T específicas, indicando que la presencia de inmunidad preexistente no permitió predecir la replicación viral. A lo largo del seguimiento, se observaron fluctuaciones en la frecuencia de respuestas T específicas, con una tendencia general a la disminución al final del periodo evaluado. Los pacientes que experimentaron ADNemia presentaron valores pico medianos más altos de IFN- $\gamma$  en células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> específicas, aunque sin significación estadística. Además, seis de ocho pacientes evaluados mostraron expansión de células T CD8<sup>+</sup> y, en menor medida, CD4<sup>+</sup> tras la detección de ADNemia, evidenciando una respuesta inmunitaria funcional frente al virus.

Estos hallazgos aportan información relevante dado el conocido aumento de infecciones oportunistas asociado al tratamiento con ibrutinib, especialmente en los primeros meses tras el inicio de la terapia. La monitorización mediante tinción de tetrámeros HLA y estimulación con péptidos virales reveló una disminución en la

frecuencia de células T específicas de CMV durante el tratamiento, mientras que la capacidad de estas células para secretar IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  ante estímulo antigénico pareció incrementada, sugiriendo una funcionalidad preservada a pesar de la reducción en número.

En comparación con estudios previos sobre la inmunidad frente a CMV en pacientes tratados con ibrutinib, nuestros resultados coinciden parcialmente. Las diferencias en la temporalidad de la evaluación —nuestro seguimiento abarcó seis meses, mientras que otros estudios lo hicieron a una mediana de 21 meses— y la inclusión de datos virológicos, aportan una perspectiva novedosa sobre el impacto de la ADNemia en la dinámica de células T específicas frente a CMV.

Entre las limitaciones del estudio se encuentra el reducido tamaño muestral, que restringe la generalización de los hallazgos, y la disponibilidad limitada de muestras en determinados puntos temporales, lo que impidió un seguimiento más continuo de la respuesta inmune.

En conjunto, estos resultados indican que la ADNemia por CMV es un evento relativamente frecuente en pacientes con LLC tratados con ibrutinib, pero que típicamente se resuelve de manera espontánea sin requerir terapia antiviral ni causar enfermedad en órganos diana. Este comportamiento clínico parece comparable al de pacientes con LLC tratados con quimioterapia convencional, en los cuales estudios previos reportaron un 17 % de infecciones activas por CMV, detectadas mediante métodos menos sensibles que la PCR en tiempo real utilizada en nuestro estudio.

Asimismo, aunque la frecuencia de células T específicas detectables disminuye durante los primeros seis meses de tratamiento, los pacientes conservan la capacidad de expandir células T funcionales en respuesta a estímulos antigénicos, probablemente explicando la corta duración de los episodios de ADNemia observados.

En conclusión, el presente estudio aporta evidencia de que, en el contexto del tratamiento con ibrutinib, la replicación transitoria de CMV se asocia con una respuesta inmune T específica funcional y autolimitada, subrayando la compleja

interacción entre terapia dirigida, virosis latente y capacidad inmunitaria del huésped. Estos hallazgos tienen implicaciones potenciales en la vigilancia clínica de la ADNemia por CMV y en la comprensión de la inmunidad antiviral en pacientes con LLC bajo terapias moduladoras de la señalización BCR.

### **Impacto de la ADNemia y la inmunidad T en pacientes con neoplasias hematológicas tratados con inhibidores de moléculas pequeñas**

Este estudio (Solano de la Asunción et al., Br J Haematol, 2023), que exploró la interacción entre la replicación viral CMV y la respuesta inmune mediada por células T en pacientes con neoplasias hematológicas tratados con inhibidores de moléculas pequeñas. Se trata de un estudio prospectivo multicéntrico que incluyó 36 pacientes adultos seropositivos para CMV, tratados con venetoclax (n = 8), inhibidores de BCR-ABL1 (TKI; n = 7) o ruxolitinib (n = 21) como terapia de primera línea o tras quimioterapia convencional, en cinco hospitales españoles. El seguimiento abarcó los primeros 180 días posteriores al inicio del tratamiento, con monitorización periódica de la carga viral mediante PCR en tiempo real.

Durante el periodo de estudio, 20 de 36 pacientes (55 %) desarrollaron al menos un episodio de ADNemia, con un total de 28 episodios detectados. De estos, 14 fueron blips transitorios que resolvieron espontáneamente. La mediana del tiempo hasta la aparición del primer episodio fue de 30 días (rango, 0–150), y tres pacientes ya presentaban ADNemia al inicio del seguimiento. La incidencia de ADNemia fue significativamente mayor en los pacientes tratados con TKI BCR-ABL1 (5/7) y ruxolitinib (12/21) que en los tratados con venetoclax (1/8; p = 0,04), mientras que la carga viral máxima fue comparable entre grupos y en ningún caso superó las 182 UI/ml. Ningún paciente desarrolló enfermedad de órgano diana asociada al CMV, lo que indica un curso clínico generalmente benigno.

El análisis de la respuesta inmune T específica frente a CMV se realizó mediante citometría de flujo con tinción de citocinas intracelulares, evaluando células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> productoras de IFN- $\gamma$  frente a antígenos virales pp65 e IE-1, así como células T reguladoras (T-regs) en múltiples puntos temporales. Al inicio, todos los pacientes excepto uno mostraron respuesta celular detectable; durante el seguimiento, 28 de 32 pacientes (87,5 %) mantuvieron respuestas T específicas

frente al CMV. Se identificaron patrones distintivos: los pacientes tratados con TKI BCR-ABL1 presentaron recuentos más bajos de células T CD4<sup>+</sup> específicas durante los primeros dos meses, mientras que los tratados con venetoclax o ruxolitinib mostraron una tendencia a disminución progresiva de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicas, aunque sin diferencias significativas respecto a los valores iniciales.

El análisis exploratorio de la capacidad predictiva de la inmunidad T frente a la aparición de ADNemia, realizado en pacientes tratados con ruxolitinib, indicó que los recuentos de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicas al inicio y a los 30 días no diferían entre pacientes con o sin ADNemia posterior. Asimismo, los niveles de T-regs fluctuaron durante el seguimiento sin correlación clara con el tiempo ni con los grupos de tratamiento, y no mostraron asociación consistente con los recuentos de células T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> específicas.

En conjunto, estos hallazgos sugieren que la ADNemia por CMV es relativamente frecuente en pacientes tratados con TKI BCR-ABL1 y ruxolitinib, particularmente durante los primeros dos meses, mientras que es menos frecuente con venetoclax. A pesar del impacto relativo de los primeros dos fármacos sobre la respuesta T específica, este efecto no impide el control eventual de la replicación viral, lo que se refleja en la ausencia de enfermedad de órgano diana. Estos resultados concuerdan con estudios previos que documentan que el uso prolongado de ruxolitinib puede reducir las respuestas T específicas frente al CMV, aunque la ADNemia detectable sigue siendo poco común.

Desde un punto de vista clínico, los datos sugieren que la monitorización sistemática de la ADNemia por CMV en sangre no se justifica rutinariamente en pacientes tratados con estas moléculas, aunque la posibilidad de efectos indirectos sobre el huésped, similares a los observados en receptores de TPH alogénico, merece investigación adicional. Las limitaciones del estudio incluyen el tamaño reducido de la muestra, la evaluación restringida de funciones T específicas a los antígenos pp65 e IE-1, y la disponibilidad limitada de muestras en algunos puntos temporales, lo que podría haber conducido a la subdetección de episodios de ADNemia.

En síntesis, los inhibidores de moléculas pequeñas representan avances

terapéuticos significativos para las neoplasias hematológicas, pero ejercen efectos moduladores sobre la inmunidad antiviral frente al CMV que requieren comprensión detallada. Aunque los TKI BCR-ABL1 y ruxolitinib muestran un mayor impacto sobre la respuesta T específica, la replicación viral se mantiene controlada de manera espontánea, y la enfermedad clínica es rara. Los hallazgos resaltan la necesidad de estudios prospectivos más amplios para caracterizar los mecanismos inmunomoduladores de estos fármacos y desarrollar estrategias que mitiguen riesgos asociados con la reactivación del CMV, optimizando así la atención clínica de pacientes inmunodeprimidos.

### **Monitorización de la ADNemia por CMV en pacientes hematológicos tratados con terapia CAR-T: ¿una necesidad clínica?**

El presente análisis (Solano de la Asunción et al., Clin Microbiol Infect, 2023) evaluó la presencia e implicaciones de la ADNemia por CMV en pacientes con neoplasias hematológicas sometidos a terapia con células CAR-T. Se trató de un estudio retrospectivo observacional que incluyó a 51 pacientes consecutivos seropositivos para CMV, con una edad media de 62 años (rango, 22–79; 26 hombres), sin profilaxis antiviral previa. La monitorización de la carga viral se realizó en días 0, 7, 14, 21, 30, 60 y 90 tras la infusión celular, utilizando PCR en tiempo real dentro de las primeras 24 horas tras la recolección. El tratamiento anticipado con (val)ganciclovir se inició cuando la carga viral alcanzó  $\geq 1.500$  UI/ml, conforme a protocolos locales.

Al inicio del seguimiento, 12 pacientes (24 %) presentaban ADNemia detectable. De los 39 restantes, 22 (56,4 %) desarrollaron ADNemia en algún momento tras la infusión, resultando en una incidencia acumulada del 57,9 % [IC 95 %, 43,2–70,2 %]. La mediana del tiempo hasta la primera detección fue de 14 días (rango, 7–60), y la mediana de carga máxima alcanzó 96 UI/ml (rango, 15–28.887). Solo tres de los 22 pacientes que desarrollaron ADNemia recibieron tratamiento anticipado. Todos los episodios se resolvieron espontáneamente, sin evidencia de enfermedad en órganos diana.

El análisis de factores asociados mostró que únicamente la administración de axi-cel se vinculó con la aparición de ADNemia postinfusión, con un hazard ratio

ajustado de 2,83 (IC 95 %: 1,14–6,96;  $p = 0,024$ ). Sin embargo, al comparar axi-cel con tisa-cel, no se observaron diferencias significativas en las variables clínicas relevantes, salvo la necesidad de terapia puente previa. Aunque axi-cel se ha asociado previamente a mayor incidencia de síndrome de liberación de citocinas (CRS), nuestros hallazgos difieren de estudios previos que vinculaban CRS o ICANS con reactivación viral. Ni la edad avanzada ni el uso de corticosteroides o tocilizumab para manejo de CRS/ICANS emergieron como factores de riesgo significativos.

Entre los 12 pacientes con ADNemia preexistente, cinco iniciaron tratamiento anticipado con una mediana de 30 días postinfusión, con cargas virales iniciales medianas de 3.514 UI/ml (rango, 1.565–4.728). La presencia de ADNemia basal se asoció significativamente con riesgo aumentado de cargas virales elevadas posteriores ( $\geq 1.500$  UI/ml; HR 29,71; IC 95 %: 2,88–306,28;  $p = 0,004$ ). No se observaron diferencias en características clínicas basales entre pacientes con ADNemia previa y aquellos que la desarrollaron tras la infusión.

Asimismo, se exploró la relación entre inflamación temprana y reactivación viral mediante el análisis del área bajo la curva (AUC) de IL-6 entre los días 0 y 2 postinfusión. No se encontraron diferencias significativas entre pacientes que desarrollaron ADNemia y los que no, ni entre quienes alcanzaron niveles que requirieron tratamiento anticipado y los que no. Estos resultados sugieren que, en esta cohorte, la inflamación temprana, CRS de alto grado o ICANS no fueron predictores fiables de reactivación viral, en contraste con algunos estudios previos que habían identificado asociaciones.

Entre las limitaciones del estudio se destacan el tamaño muestral y su diseño retrospectivo, la heterogeneidad de los protocolos de monitorización entre centros, la periodicidad mensual de seguimiento tras el día 30, y el uso de dos ensayos de PCR distintos, con diferencias en desempeño analítico. Estas limitaciones podrían haber conducido a la subdetección de episodios de ADNemia.

En síntesis, la ADNemia por CMV fue frecuente en pacientes receptores de terapia CAR-T, afectando a más de la mitad de la cohorte. Sin embargo, todos los episodios se resolvieron espontáneamente, sin afectación en órganos diana. Los hallazgos indican que la presencia de ADNemia basal constituye un factor de riesgo

para cargas virales elevadas posteriores. A pesar de la frecuencia de reactivación viral, la mayoría de los pacientes no requirió tratamiento antiviral, y la enfermedad clínica fue infrecuente.

Desde una perspectiva clínica, estos datos sugieren que los pacientes seropositivos para CMV que reciben terapia CAR-T podrían beneficiarse de un seguimiento sistemático de la ADNemia, particularmente aquellos con detección basal del virus. No obstante, el impacto de factores como CRS, ICANS, corticosteroides o tocilizumab parece limitado en la predicción de ADNemia. Este estudio aporta evidencia sobre la dinámica de la reactivación viral en un contexto clínico de creciente relevancia y subraya la necesidad de estudios prospectivos más amplios para definir criterios óptimos de monitorización y tratamiento.

### **Valor predictivo de la carga de ADN del virus Torque Teno para la ADNemia por citomegalovirus en pacientes con neoplasias hematológicas**

Este estudio (Solano de la Asunción et al., J Med Virol, 2023) evaluó la cinética del virus Torque Teno (TTV) en plasma de pacientes con neoplasias hematológicas tratados con inhibidores de moléculas pequeñas, específicamente ibrutinib y ruxolitinib, y su posible relación con la aparición de ADNemia por citomegalovirus (CMV).

Se analizaron 135 muestras de plasma de pacientes tratados con ibrutinib, con una mediana de ocho muestras por paciente (rango: 3–10). La detección de ADN de TTV se observó en 17 de 20 pacientes (85 %). La proporción de pacientes con ADN detectable aumentó progresivamente desde la evaluación basal hasta el día +120 (38,4 %–100 %), seguida de una ligera disminución en los días +150 y +180 (83,7 %). La carga viral inicial presentó una mediana de 5,27 log<sub>10</sub> copias/ml (rango: 0–6,54), alcanzando un pico de 7,83 log<sub>10</sub> copias/ml en el día +120 ( $p = 0,025$  vs. basal). En contraste, en 188 muestras de pacientes tratados con ruxolitinib, todos presentaron ADN de TTV detectable en algún momento, pero la carga viral mostró variaciones menores y no alcanzó diferencias significativas respecto a la línea basal (mediana inicial: 3,86 log<sub>10</sub> copias/ml; pico en día +60: 4,05 log<sub>10</sub> copias/ml).

Se evaluó la correlación entre la carga de TTV y parámetros inmunológicos. En pacientes con ibrutinib, se observó una correlación inversa moderada entre la carga de TTV y los recuentos absolutos de linfocitos (ALC;  $Rho = -0,46$ ;  $p < 0,001$ ), mientras que no existió asociación con los recuentos totales de células T CD4+ o CD8+. En pacientes tratados con ruxolitinib, no se identificaron correlaciones significativas entre TTV y ALC, CD4+ o CD8+, lo que sugiere que el impacto del fármaco sobre parámetros inmunológicos podría diferir de ibrutinib.

Respecto a la relación entre TTV y ADNemia por CMV, 7 de 20 pacientes tratados con ibrutinib desarrollaron ADNemia de bajo grado, con una mediana de aparición a 45 días y carga máxima promedio de 106 UI/ml. El análisis de la carga de TTV en el día +30 no mostró diferencias significativas entre pacientes con o sin ADNemia por CMV (mediana 6,12 vs. 4,55 log10 copias/ml;  $p = 0,77$ ). En el grupo de ruxolitinib, 16 de 21 pacientes (76 %) desarrollaron ADNemia por CMV a mediana de 30 días, con carga máxima de 182 UI/ml. La carga de TTV en día +30 tampoco permitió diferenciar a los pacientes que desarrollaron ADNemia de CMV de los que no lo hicieron (mediana 3,48 vs. 2,91 log10 copias/ml;  $p = 0,30$ ).

Además, se exploró la asociación entre la carga de TTV y la función de células T CD4+ y CD8+ productoras de IFN- $\gamma$  específicas de CMV, utilizando 236 muestras pareadas. No se identificó correlación significativa en ninguno de los dos grupos de tratamiento, indicando que la carga de TTV no refleja directamente la magnitud de la respuesta antiviral específica de CMV en este contexto.

En la discusión, los autores destacan que, si bien la carga de TTV se ha propuesto como biomarcador de inmunosupresión y predictor de infecciones virales en trasplantes de órgano sólido y hematopoyético alogénico, su utilidad en pacientes tratados con inhibidores de moléculas pequeñas no está clara. En este estudio, la cinética del TTV mostró un aumento significativo en pacientes tratados con ibrutinib, alcanzando un pico en el día +120, posiblemente relacionado con la expansión de linfocitos T, que actúan como nicho replicativo del virus. Por el contrario, los pacientes tratados con ruxolitinib mostraron menor variabilidad, acorde con el efecto conocido del fármaco sobre la activación de células dendríticas y la función de células T.

El hallazgo central fue que la carga de TTV basal o posterior al inicio del tratamiento no predijo la aparición de ADNemia por CMV, ni se correlacionó con la función antiviral de células T CD4+ o CD8+. Esto indica que, a diferencia de lo observado en trasplantes alogénicos o en trasplantes de órgano sólido, la monitorización de TTV no permite anticipar la reactivación de CMV en pacientes tratados con ibrutinib o ruxolitinib.

Entre las limitaciones del estudio se incluyen el tamaño reducido de la cohorte, la frecuencia de monitorización y el hecho de que solo se evaluaron células T productoras de IFN- $\gamma$  específicas de CMV.

En conclusión, aunque la dinámica de la carga de TTV difiere entre pacientes tratados con ibrutinib y ruxolitinib, la monitorización de TTV no proporciona un valor predictivo fiable para la aparición de ADNemia por CMV ni para la respuesta de células T específicas del virus en este contexto. Se requieren estudios adicionales con mayores cohortes para determinar si la monitorización seriada de TTV puede aportar información sobre el riesgo de otras infecciones oportunistas en pacientes con neoplasias hematológicas bajo tratamiento con inhibidores de moléculas pequeñas.

## **Conclusiones**

Los hallazgos de esta tesis concluyen que la ADNemia por citomegalovirus (CMV) constituye un evento frecuente en pacientes con neoplasias hematológicas, independientemente del tipo de tratamiento, pero rara vez evoluciona hacia enfermedad de órganos diana. En pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC) tratados con ibrutinib, se observó la aparición de ADNemia en una proporción significativa, sin que los episodios requirieran intervención antiviral en la mayoría de los casos. Aunque se detectó una disminución inicial en las células T específicas para CMV, especialmente en el componente CD4+, los pacientes conservaron la capacidad de expandir funcionalmente la respuesta T, destacando el papel protector de las células CD8+ en el control de la replicación viral. Estos resultados evidencian la resiliencia del sistema inmunitario adaptativo frente a la inmunomodulación farmacológica y resaltan la diferencia entre la presencia de viremia subclínica y enfermedad activa.

De manera consistente, los pacientes con otras neoplasias hematológicas tratados con small molecule inhibitors, como ruxolitinib y TKI BCR-ABL1, también presentaron episodios frecuentes de ADNemia que se resolvieron espontáneamente y sin complicaciones clínicas. Las fluctuaciones observadas en la respuesta específica de linfocitos T sugieren un efecto transitorio de estos fármacos sobre la inmunidad T frente al CMV, sin comprometer de forma significativa la capacidad de controlar la replicación viral. Además, se identificó un mayor riesgo de ADNemia en pacientes tratados con ruxolitinib y TKI BCR-ABL1 frente a venetoclax, lo que indica un impacto diferencial de estas terapias sobre la inmunidad celular, aunque sin traducirse en un riesgo clínico elevado.

En pacientes seropositivos al CMV sometidos a terapia CAR-T, la ADNemia se detectó con regularidad y se resolvió sin generar enfermedad de órgano diana. No obstante, la presencia de ADNemia basal antes de la infusión se asoció a cargas virales más elevadas y, en algunos casos, a la necesidad de instaurar terapia antiviral preventiva (PET). Estos hallazgos sugieren que, en este contexto, la monitorización sistemática podría ser útil para identificar a los pacientes con mayor riesgo de replicación viral significativa y guiar decisiones clínicas sobre la intervención temprana.

Por otro lado, la determinación de la carga de Torque Teno virus (TTV) en plasma no se mostró como un predictor fiable de ADNemia por CMV, ni se correlacionó de forma determinante con la reconstitución de células T CD4+ o CD8+ específicas para CMV en pacientes tratados con ibrutinib o ruxolitinib. Esto contrasta con lo observado en trasplantes hematopoyéticos o de órganos sólidos, donde TTV puede reflejar la inmunosupresión, y subraya la necesidad de identificar biomarcadores más específicos para anticipar la reactivación viral en pacientes hematológicos tratados con inhibidores de moléculas pequeñas.

En conjunto, estos resultados refuerzan que la ADNemia por CMV, aunque frecuente, no equivale necesariamente a enfermedad clínica y que el sistema inmunitario mantiene capacidad suficiente para controlar la replicación viral. La evidencia presentada proporciona un marco conceptual para optimizar la monitorización y manejo clínico de la reactivación por CMV, diferenciando entre

eventos subclínicos que no requieren intervención y situaciones en las que la monitorización sistemática puede estar justificada, como en pacientes receptores de terapia CAR-T con viremia basal detectable. Estos hallazgos ofrecen una base sólida para futuras investigaciones dirigidas a definir estrategias individualizadas de seguimiento y manejo de la ADNemia por CMV en distintos escenarios terapéuticos hematológicos.

# INTRODUCCIÓN



## **I. El citomegalovirus humano**

### **I.1. Consideraciones históricas y taxonomía**

La infección por citomegalovirus humano (CMVH), perteneciente a la familia Herpesviridae, ha constituido un foco relevante de investigación biomédica desde finales del siglo XIX. Su primera descripción documentada se remonta a 1881, cuando el patólogo alemán Hugo Ribbert observó células anormalmente agrandadas en tejidos humanos, específicamente en muestras de tejido renal y fetal. En aquel momento, estas estructuras celulares fueron erróneamente interpretadas como protozoos, dada su morfología atípica y el escaso conocimiento virológico de la época. Posteriormente, gracias a los estudios de Ernst Löwenstein y el uso de técnicas histológicas más avanzadas, se demostró que dichas células correspondían a células humanas infectadas (citomegálicas), que albergaban inclusiones intranucleares características, indicativas de una infección viral (1)(2).

En 1953, el perfeccionamiento de técnicas de vanguardia (con especial relevancia de los avances en microscopía electrónica) permitió confirmar la presencia del virus en las inclusiones nucleares previamente descritas en distintas muestras biológicas. Este hito hizo posible observar con mayor exactitud los efectos citopáticos asociados a la infección intracelular. De manera paralela, la optimización de los métodos de cultivo viral abrió la puerta al aislamiento del agente, un logro alcanzado de forma independiente por diversos grupos de investigación. Entre ellos sobresale el liderado por el científico estadounidense Thomas H. Weller, considerado pionero en este ámbito y a quien se atribuye el descubrimiento del virus, posteriormente denominado citomegalovirus (CMV)(3).

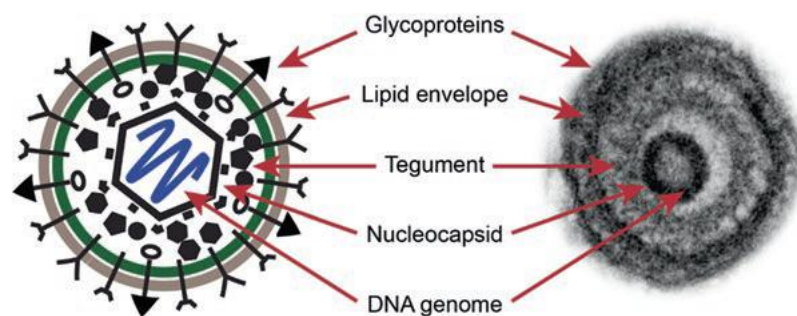
Conforme al Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV), el CMV es un género perteneciente al dominio Duplodnaviria, Orden Herpesvirales, Familia Herpesviridae y subfamilia Betaherpesvirinae, conociéndose también como Herpesvirus humano tipo 5. En la Tabla I.1 se presenta una clasificación taxonómica completa del CMV y sus familiares cercanos.

Tabla I-1. Integrantes principales de la familia *Herpesviridae*

| Subfamilia                        | Género                  | Designación habitual  | Célula de latencia principal  |
|-----------------------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------------|
| <b><i>Alphaherpesviridae</i></b>  | <i>Simplexvirus</i>     | Herpes simple 1       | Muco-epiteliales y neuronales |
|                                   |                         | Herpes simple 2       | Muco-epiteliales y neuronales |
| <b><i>Betaherpesviridae</i></b>   | <i>Varicellovirus</i>   | Varicela-Zoster       | Muco-epiteliales y neuronales |
|                                   | <i>Citomegalovirus</i>  | Citomegalovirus       | Macrófagos y linfocitos       |
|                                   | <i>Roseolovirus</i>     | HHV-6                 | Células inmunocompetentes     |
|                                   |                         | HHV-7                 | Linfocitos T                  |
| <b><i>Gammapherpesviridae</i></b> | <i>Linfocriptovirus</i> | Virus de Epstein-Barr | Linfocitos B                  |
|                                   | <i>Rhadinovirus</i>     | HHV-8                 | Linfocitos B                  |

## I.2. Aspectos genómicos y estructurales del CMV

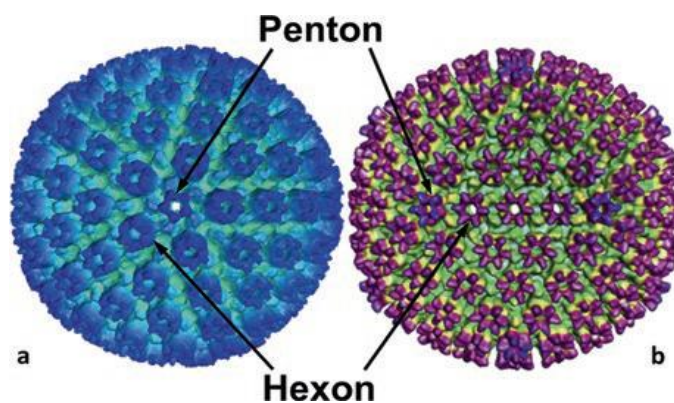
La estructura básica del CMV, como la del resto de virus de la familia *Herpesviridae*, consta de un genoma de ADN lineal de doble cadena protegido por una cápside icosaédrica, rodeada a su vez por una capa proteica llamada tegumento y envuelta finalmente por una membrana lipídica celular con glicoproteínas virales (4). Esta estructura se ilustra en la Figura I-1.



**Figura I-1.** Componentes de los viriones de los herpesvirus (5).

En particular, el genoma de CMV tiene 237 Kpb, distribuidos en 167 marcos de lectura abierta-ORF, con capacidad para codificar alrededor de 200 proteínas. Estas proteínas se clasifican según el momento de la infección viral en que se traducen, dando lugar a las proteínas  $\alpha$  y  $\beta$ , cuya expresión ocurre en las primeras horas de la infección, y a las proteínas  $\gamma$ , traducidas después de 24 horas de infección (6). El genoma de CMV que codifica estas proteínas se organiza en torno a dos secuencias únicas de diferente tamaño, una larga (UL, unique long) y otra corta (US, unique short), flanqueadas por otras secuencias, repetitivas e invertidas (TRL-IRL y TRS-IRS)(6).

La cápside icosaédrica del CMV tiene una arquitectura similar a las cápsides de otros miembros de la familia *Herpesviridae*. Está compuesta por subunidades proteicas con arquitectura de hexámero y pentámero, formando un total de 150 hexones y 12 pentones (Figura I-2).



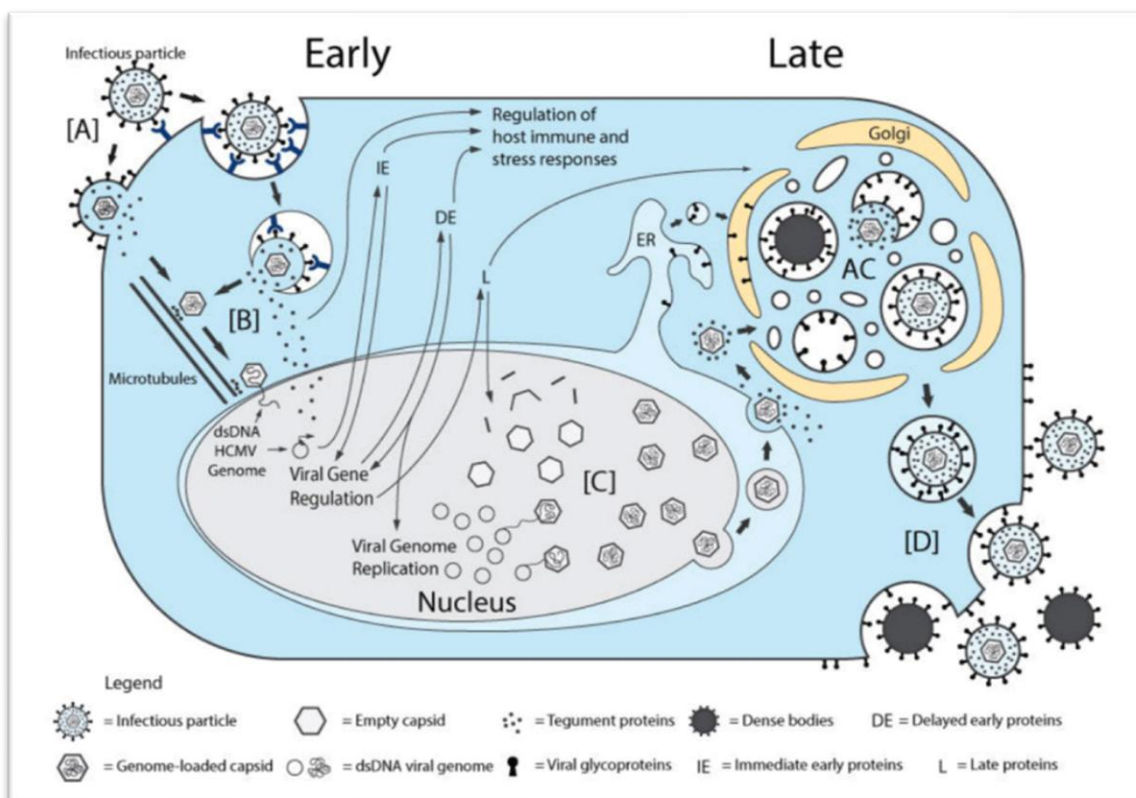
**Figura I-2.** Reconstrucción tridimensional por criomicroscopía electrónica de cápsides nucleares de CMV. William L. Close, Ashley N. Anderson, and Philip E. Pellett Betaherpesvirus Virion Assembly and Egress. *Advances in Experimental Medicine and Biology* (5).

Durante el proceso de encapsidación nuclear, ambas estructuras tienen la capacidad de asociarse con otras partículas proteicas de menor tamaño, culminando así en la conformación de la cápside definitiva (7)(8).

Tras la cápside se localiza el tegumento, una matriz estratificada que ocupa el espacio comprendido entre la cápside y la envoltura viral. Esta región, capaz de interactuar con las proteínas capsídicas adyacentes, constituye aproximadamente el 50 % del total de proteínas del virión, predominando entre ellas las fosfoproteínas.

En el tegumento se han identificado al menos diez proteínas conservadas en los herpesvirus, entre las que destacan los productos de UL32 (pp150), UL48, UL26, UL35, UL82 (pp71), UL83 (pp65), UL94, UL97 y UL99 (pp28). Dentro de este conjunto, las fosfoproteínas pp65, pp150 y pp71 alcanzan concentraciones particularmente elevadas, participando de manera esencial en el inicio del ciclo infeccioso, la modulación de la expresión génica viral y la formación de nuevos viriones con capacidad infectiva (9)(10).

La membrana es la estructura más externa de CMV, constituida por una bicapa lipídica derivada de la célula infectada, que rodea toda la estructura descrita. En esta membrana se anclan diversas glicoproteínas de codificación viral. Las glicoproteínas gB, gH y gL son responsables de la penetración celular en la primera etapa de la infección de CMV, permitiendo la fusión del virus a la célula huésped y la liberación del virión al ambiente intracelular, gracias a su interacción con diversas proteínas de la superficie celular como integrinas o el receptor del factor de crecimiento epitelial (Figura I-3) (9)(11)(12).



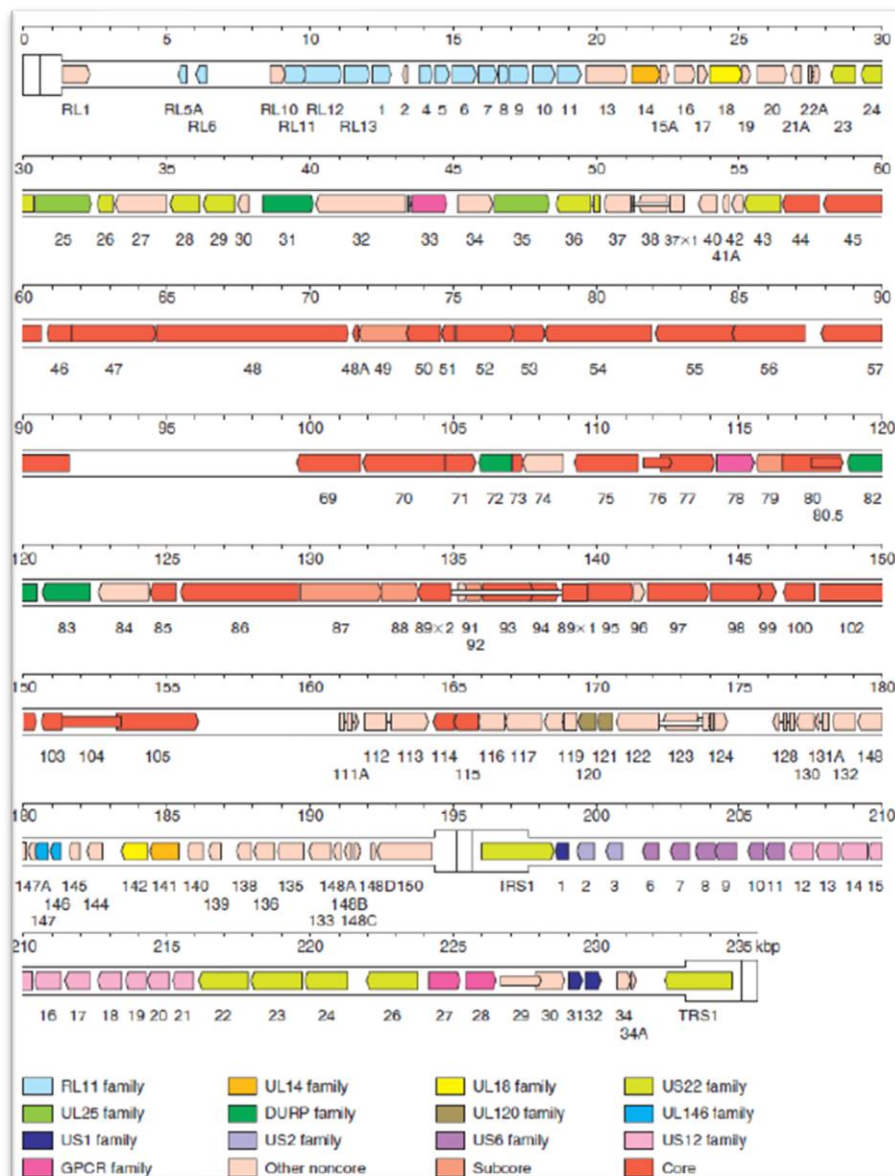
**Figura I-3.** Esquema del ciclo viral del CMV (13)

### **I.3. Genoma del CMV y mecanismos de evasión inmunológica**

El genoma del citomegalovirus humano (CMV) contiene, además de sus genes codificantes, diversos segmentos de RNAs no codificantes (lncRNAs) y microRNAs). Estos elementos reguladores desempeñan un papel clave en la modulación de la expresión génica viral y en la interferencia con los mecanismos de defensa celular dirigidos a limitar la replicación del virus.

Asimismo, el genoma del CMV presenta repeticiones terminales que actúan como señales en "cis", facilitando tanto su escisión como su encapsidación adecuada. Dicho genoma puede adoptar cuatro configuraciones isoméricas, aunque únicamente una de ellas se empaqueta en cada virión (14). Su estructura, como puede entenderse mejor en la Figura I-4, se compone de un segmento largo y único (UL, unique long), delimitado por secuencias repetidas e invertidas (TRL-IRL), y un segmento corto y único (US, unique short), también flanqueado por secuencias repetitivas invertidas (TRS-IRS).

A pesar de tratarse de un virus de ADN, el CMV exhibe una variabilidad genética considerablemente mayor en comparación a otros herpesvirus humanos (4). Se estima que hasta un 20% de su genoma puede diferir entre cepas, fenómeno atribuible tanto a la acumulación de mutaciones de novo en el hospedador como a la elevada frecuencia de recombinación en infecciones mixtas (ya sean coinfecciones o superinfecciones), o bien a una combinación de ambos factores (15). Aunque no existe evidencia concluyente de que esta diversidad genética altere de forma significativa la especificidad antigénica de las proteínas inmunodominantes, ciertos estudios apuntan a que podría influir en la patogenicidad viral en distintos contextos clínicos, como el trasplante de órgano sólido (TOS), el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (TPH) y la infección congénita. Sin embargo, esta hipótesis continúa siendo motivo de debate dentro de la comunidad científica.



**Figura I-4.** Organización genética y contenido del CMV humano wild type, basado en la cepa Merlin. Adaptado de Dolan A, Cunningham C, Hector RD, et al. (2004) Genetic content of wild type human cytomegalovirus. *Journal of General Virology* 85: 1301–1312.

El CMV posee un extenso repertorio génico codificante para proteínas, muchas de ellas homólogas a proteínas celulares, lo que le permite evadir la respuesta inmunitaria del hospedador y establecer una infección persistente (16). Entre estas proteínas, al menos doce, codificadas por los genes US20, UL16, UL17, UL18, UL40, UL43, UL83, UL140, UL141-UL144 y UL148, desempeñan un papel clave en la inhibición del reconocimiento de las células infectadas por parte de las

células NK, fundamentales en la primera línea de defensa antiviral. En particular, UL40, UL140 y UL142 producen proteínas que imitan moléculas HLA de clase I, regulando negativamente la actividad de las células NK. Además, el microARN miR-UL122 del CMV suprime la expresión en la superficie celular de MICB (MHC class I polypeptide-related sequence B), evitando así la lisis de las células infectadas mediada por células NK.

El virus emplea varias estrategias de evasión inmunológica para mantener una latencia de por vida y evitar ser detectado por el sistema inmunitario del huésped. Uno de los mecanismos clave consiste en atacar la vía de presentación del antígeno del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (17). Las proteínas producidas por el CMV, como la US2 y la US11, dislocan las moléculas de la cadena pesada del MHC de clase I del retículo endoplásmico hasta el citoplasma, lo que provoca su degradación e impide la presentación del antígeno viral a las células T CD8+. Además, el US10 retrasa la maduración de las moléculas del MHC de clase I, lo que dificulta aún más la detección inmunológica (17).

El CMV también modula la respuesta inmune innata mediante la inhibición de diversas vías de señalización antiviral (18). La proteína del tegumento UL82 inhibe el estimulador de la señalización de interferón (STING), mientras que el producto del gen UL145 facilita la degradación de helicasas con función antiviral. Asimismo, el producto tardío del gen UL111A codifica cmvIL-10, un homólogo de la interleucina-10 humana que se expresa durante la fase de latencia viral e induce un estado de inmunosupresión. Esta molécula modula la expresión de MHC de clase I y II e interfiere con la función de las células dendríticas, favoreciendo la evasión del sistema inmunológico.

El CMV también interfiere con los mecanismos de carga peptídica del huésped, clave en la presentación de antígenos a las células T y, por tanto, en la evasión de la detección inmunológica. Así, la proteína viral US6 actúa sobre el transportador asociado a la proteína procesadora de antígenos (TAP), mientras que la US3 inhibe la tapasina, crucial para la translocación de las moléculas del MHC a la superficie celular. Esta estrategia integral de evasión requiere una gran población de células T específicas del CMV para controlar el virus, lo que a menudo se refleja en los pacientes trasplantados por un aumento detectable de estas células (17)(19).

#### **I.4. Análisis epidemiológico y transmisión de la infección por CMV**

El CMV es un patógeno ubicuo que afecta a personas de todos los rangos de edad y que establece una latencia de por vida en el huésped al cual infecta (20). La epidemiología del CMV revela una importante variación global en la seroprevalencia, influenciada por factores como la edad, el nivel socioeconómico y la región geográfica (20)(21). En los países desarrollados, la seroprevalencia del CMV oscila entre el 24,6% y el 81%, mientras que en las regiones en desarrollo puede llegar al 95,7% (22). Además, su prevalencia aumenta de forma directamente proporcional a la edad debido a la creciente probabilidad de contagio durante el ciclo vital, estimándose en torno al 20% de niños hasta los 5 años de edad, 40% en los adolescentes y aumentando, posteriormente, a un ritmo aproximado de un 1% por año de vida. La capacidad del virus para infectar una amplia gama de células y su capacidad de persistencia y reactivación de por vida complican su epidemiología y su dinámica de transmisión.

El virus se transmite principalmente a través del contacto cercano y directo con fluidos corporales infectados, como la saliva, la sangre, la orina, el semen y la leche materna, y también puede estar presente en el órgano o células trasplantadas (como es el caso de receptores de un TOS o de TPH alogénico, o transfusiones de productos sanguíneos que contengan leucocitos de donantes seropositivos) (23)(24).

En el caso de la transmisión vertical de la madre al feto, esta puede ocurrir intraútero, durante el parto o a través de la leche materna, y el mayor riesgo se asocia con la infección materna primaria durante el embarazo (25). La transmisión horizontal ocurre principalmente mediante la saliva y el contacto con objetos entre niños o bien del niño al adulto. Además, los lactantes infectados eliminan este virus a través de la saliva y la orina durante periodos prolongados, sirviendo como reservorio para la propagación del virus a cuidadores y otros niños. La transmisión del virus a través de gotas o aerosolización no ha sido demostrada.

Si bien la implantación desde hace años de la depleción leucocitaria sistemática de todos los productos sanguíneos mediante filtración con filtros de tercera o cuarta generación ha eliminado esta forma de transmisión, en el pasado

era una vía frecuente ya que el virus quedaba de forma latente en los monocitos de individuos sanos. En los pacientes trasplantados de órgano sólido de donantes seropositivos, la transmisión puede deberse a una primoinfección en receptores seronegativos o a una reinfección por cepas distintas o la reactivación de la infección latente en el receptor seropositivo, como consecuencia de la inmunosupresión asociada al trasplante.

De la misma manera que ocurría en el caso de la infección congénita, la primoinfección supone el mecanismo de transmisión de mayor riesgo y con mayor probabilidad de enfermedad asociada a CMV, mientras que la reactivación es la situación más frecuentemente observada en la práctica clínica. En receptores de TPH alogénico seronegativos la transmisión de CMV de un donante seropositivo es posible, aunque muy ineficiente. En este subgrupo de pacientes, entre un 9% a un 21% desarrollarán infección CMV post-TPH. El mayor riesgo infección y enfermedad asociada al CMV se observa en receptores seropositivos que reciben un TPH con depleción de células T (23)(24).

Si atendemos a la expresión de la infección en la mujer embarazada, la infección primaria en el embarazo ocurre en torno al 3,5% de los casos, siendo asintomática en aproximadamente el 85% de éstos. Se expresa como un síndrome vírico con fiebre persistente y fatiga (26). Tras la infección primaria, se desarrollan anticuerpos anti-CMV y el virus queda latente.

La reactivación periódica del virus latente con diseminación viral es común y más pronunciada en individuos inmunocomprometidos. La diseminación viral puede ocurrir a tasas variables desde sitios únicos o múltiples después de una infección primaria o no primaria, tanto en mujeres embarazadas como no embarazadas. En poblaciones altamente seropositivas, la reactivación o la reinfección durante el embarazo representan un riesgo significativo de contraer infección por CMV congénito (cCMV). El impacto clínico de esta entidad no es desdeñable ya que entre sus posibles consecuencias se incluye el aborto espontáneo, la muerte fetal intrauterina y secuelas del neurodesarrollo a largo plazo, como la pérdida auditiva neurosensorial, retraso del crecimiento intrauterino, retraso mental o la ceguera (27), afectando a aproximadamente a 1 de cada 150 bebés nacidos vivos en todo el mundo, con alrededor de 40.000 casos al año sólo

en los Estados Unidos (27). Estas patologías son más frecuentes en caso de producirse la primoinfección durante el primer trimestre.

El periodo de incubación es de en torno a las 2 a 12 semanas. Tras la primoinfección, el virus permanecerá latente de manera indefinida en leucocitos, linfocitos T, endotelio vascular, epitelio de los túbulos renales, excretándose de forma irregular durante años a través de secreciones orofaríngeas y vaginales, orina, semen, leche materna y heces (28)(29).

### **I.5. Células diana y ciclo viral del CMV**

#### **I.5.1. Entrada en la célula hospedadora**

La entrada del virus en la célula hospedadora constituye un proceso sumamente complejo, del cual poseemos un conocimiento limitado. Esta complejidad se debe, en gran medida, al amplio tropismo celular característico del CMV, lo que lo diferencia de otros virus pertenecientes a la familia herpes. Cabe destacar que no solo tiene la capacidad de invadir e ingresar en las células empleando múltiples vías en diversos tipos celulares diana, sino que, además, el método de entrada puede diferir dentro de una misma estirpe celular, dependiendo de la cepa específica de CMV involucrada (30)(31). Este proceso está mediado por la interacción de las glucoproteínas de la envoltura lipídica del virus con receptores específicos de la célula hospedadora (32)(33).

Se han propuesto dos modelos de entrada celular, en función de los determinantes de tropismo:

#### **I.5.2. Entrada en fibroblastos**

Este proceso corre a cargo del del complejo trimérico gH/gL/gO, el cual reconoce integrinas  $\beta 1$  y  $\beta 3$ , además del receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas alfa (PDGF $\alpha$ )(33). La entrada ocurre mediante fusión directa de la envoltura viral con la membrana celular, aunque estudios recientes sugieren la participación de micropinocitosis y la actividad fusogénica de la glucoproteína B (gB) (34)(35).

### **I.5.3. Entrada en células epiteliales y endoteliales**

En este caso, el mecanismo depende del complejo pentamérico formado por gH/gL y las proteínas pUL129, pUL130 y pUL131, codificadas por genes del clúster UL128-150. Este modelo implica endocitosis dependiente de pH bajo y fusión mediada por otras glucoproteínas. La adhesión inicial en ambos modelos parece estar mediada por el complejo gN/gM. (14)(36).

### **I.5.4. Tráfico intracelular y transporte del DNA viral**

Tras la entrada, la cápside viral y las proteínas del tegumento se liberan en el citosol. Proteínas del tegumento como pUL47 y pUL48 interactúan con microtúbulos para dirigir la cápside hacia el núcleo. Paralelamente, otras proteínas modulan procesos de evasión inmune y señalización celular. Una vez en el núcleo, la cápside se descompone y transfiere el ADN viral al espacio intranuclear, donde se circulariza y permanece como episoma (13)(15)(37). Cabe destacar el papel de la proteína del tegumento pp65. Más allá de ser la proteína más abundante y de haberse utilizado previamente como herramienta diagnóstica y de monitorización terapéutica, la pp65 cumple una serie de funciones fundamentales en esta fase del ciclo viral que posibilitan la infección y que tienen que ver con la evasión inmune (9)(10), entre las que se incluyen:

- Fosforilación de proteínas virales codificadas por los genes immediate early (IE), bloqueando su presentación a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHC I).
- Inhibición de las células natural killer (NK) a través de la ruta mediada por el NF- $\kappa$ B.
- Descenso de los niveles de interferón (IFN).

Una vez infectada la célula e internalizado el DNA, el virus puede adoptar dos fases: la de latencia, o la de replicación activa e infección productiva, lo cual está determinado por un equilibrio complejo entre factores inhibidores y factores activadores que controlan la transcripción de los genes virales tras la infección inicial, y que puede, además, variar en diferentes estirpes celulares (38).

### **I.5.5. Estado de latencia del CMV**

El estado latente es el predeterminado tras la infección inicial y afecta principalmente células de estirpe mieloide, además de células epiteliales y endoteliales. Durante esta fase, el DNA viral se asocia con el complejo ND10 y se heterocromatiniza, bloqueando la transcripción de genes immediate early (IE), clave para la replicación viral.

### **I.5.6. Factores que desencadenan la reactivación**

La transición de latencia a infección productiva está influenciada por factores moleculares y condiciones del huésped:

- Inmunosupresión: reduce la capacidad de mantener los genes IE silenciados.
- Estrés oxidativo y citocinas inflamatorias: como la IL-6 y especies reactivas del oxígeno (ROS), que activan factores de transcripción (NF- $\kappa$ B, AP-1) capaces de unirse al promotor mayor immediate early promoter (MIEP).
- Diferenciación celular: la diferenciación de progenitores CD34+ a macrófagos o células dendríticas promueve la replicación viral.

### **I.5.7. Infección productiva: cascada genética**

Una vez se ha activado el paso de fase de latencia a infección, la expresión genética viral sigue una secuencia temporal:

1. Genes immediate early (IE): regulan la transcripción inicial y preparan el ambiente para la replicación viral. Productos clave como IE72 e IE86 optimizan el control del ciclo celular y la señalización.
2. Genes early (E): codifican proteínas para la replicación del DNA viral, incluyendo la polimerasa viral (pUL54) y quinasas como pUL97.
3. Genes late (L): producen proteínas estructurales para la cápside, el tegumento y el ensamblaje viral.

El feedback negativo, regulado por IE86, regula la cascada transcripcional, garantizando un control sobre la progresión de la infección.

### **I.5.8. Replicación del DNA viral y síntesis proteica**

La replicación del ADN y la formación de la cápside del virión tienen lugar en el núcleo celular. La partícula inmadura es transportada a lo largo del citoesqueleto celular. Al mismo tiempo, en el aparato de Golgi se produce el ensamblaje con la envoltura y el virus se libera de la célula a través de una vía exocítica, por lisis celular o por el paso de una célula a otra (28).

El ADN viral descondensado es replicado por la polimerasa viral (UL54-UL44) en forma de concatémeros. Estos son moléculas largas con múltiples copias del genoma separadas por sitios específicos para el posterior empaquetado.

Simultáneamente, la célula hospedadora es secuestrada para transcribir y traducir proteínas virales en el retículo endoplásmico rugoso (RER). Estas proteínas regresan al núcleo para integrarse en el ensamblaje de viriones.

### **I.5.9. Ensamblaje y empaquetado del DNA**

El ensamblaje de la cápside icosaédrica ocurre en el núcleo, utilizando proteínas estructurales y tegumentarias como pp150. El complejo terminasa (pUL56, pUL89 y pUL81) es clave en el empaquetado del DNA:

- Corta concatémeros en unidades genómicas individuales.
- Introduce el DNA en las cápsides utilizando energía derivada de la actividad ATPasa.
- Completa el proceso eliminando exceso de DNA en la cápside.

Estas cápsides completas adquieren su membrana lipídica en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi antes de ser liberadas de la célula.

Por tanto, el ciclo de vida del CMV combina estrategias complejas de entrada, evasión inmune y replicación, adaptadas a diversos tipos celulares y condiciones del huésped. Su capacidad de latencia y reactivación bajo condiciones específicas lo convierte en un patógeno relevante en pacientes inmunocomprometidos, como los sometidos a trasplantes hematopoyéticos. Los avances en la comprensión de estos mecanismos han identificado nuevas dianas terapéuticas, incluyendo complejos como el terminasa, destacando su importancia en el manejo clínico de infecciones

por CMV.

La persistencia indefinida del CMV en el paciente infectado puede deberse a:

**a.** Una infección productiva crónica de bajo grado, como sugiere la estabilidad de las respuestas de anticuerpos contra las proteínas del virus a lo largo del tiempo; y la respuesta de los linfocitos CD8 específicos frente al CMV, o bien.

**b.** Un estado de verdadera latencia, en el que sólo se expresa un número limitado de genes virales. Se ha observado la reactivación del CMV en los monocitos infectados de forma latente, tras su diferenciación en macrófagos tisulares y células dendríticas.

## **I.6. Definición de infección por CMV**

Las siguientes definiciones empleadas a lo largo de todos los artículos conformantes de esta tesis han sido obtenidas a partir de guías locales y contrastadas con documentos de consenso (39)(40).

### **I.6.1. Infección por CMV**

La infección por CMV se define como el aislamiento del virus o la detección de proteínas (antígenos) o ácidos nucleicos virales en cualquier muestra de tejido o fluido corporal. Se recomienda que tanto la fuente de las muestras analizadas [p. ej., plasma, suero, sangre total, leucocitos de sangre periférica, líquido cefalorraquídeo (LCR), lavado broncoalveolar (LBA)], orina o tejido] y el método de diagnóstico utilizados queden detallados.

### **I.6.2. Replicación del CMV**

El término “replicación” se puede utilizar para indicar evidencia de multiplicación viral y, a veces, se utiliza en lugar de infección por CMV.

### **I.6.3. Infección primaria por CMV**

La infección primaria por CMV se define como la primera detección de infección por CMV en un individuo que no tiene evidencia de exposición al CMV.

#### **I.6.4. Infección recurrente por CMV**

La “infección recurrente” se define como una nueva infección por CMV en un paciente con evidencia previa de infección por CMV al que no se le ha detectado el virus durante un intervalo de al menos 4 semanas durante la vigilancia activa. La infección recurrente puede deberse a la reactivación del virus latente (endógeno) o a la reinfección (exógena). Los anticuerpos específicos de CMV pueden transferirse pasivamente mediante productos sanguíneos o administración de inmunoglobulinas. Para fines prácticos, la presencia o ausencia de anticuerpos específicos del CMV mediante serología se puede utilizar como estimaciones aceptables de la exposición previa al CMV para clasificar a los pacientes para su ingreso a ensayos clínicos.

#### **I.6.5. Reinfección por CMV**

La reinfección se define como la detección de una cepa de CMV distinta de la cepa que causó la infección inicial.

#### **I.6.6. Reactivación del CMV**

La reactivación del CMV es probable si se descubre que las dos cepas virales (cepa anterior y actual) son indistinguibles, ya sea mediante la secuenciación de regiones específicas del genoma viral o mediante el uso de una variedad de técnicas moleculares que examinan genes que se sabe que son polimórficos.

#### **I.6.7. Enfermedad por CMV**

Podríamos definir la enfermedad por citomegalovirus (CMV) como la presencia de síntomas o signos clínicos junto con la detección del CMV mediante el aislamiento del virus, el cultivo rápido, la histopatología, la inmunohistoquímica, las técnicas de hibridación del ADN o el análisis de ácidos nucleicos en los tejidos de los órganos afectados, como los pulmones, el sistema nervioso central, el aloinjerto renal, la vejiga o el corazón, y cada enfermedad orgánica tiene criterios de diagnóstico específicos (40).

Dados los desafíos que supone el diagnóstico y la variabilidad en la presentación clínica de esta entidad, se introdujo la categoría de «enfermedad

probable», con el objetivo de refinar la clasificación de la enfermedad por CMV mediante la incorporación de pruebas cuantitativas de ácidos nucleicos para algunas categorías de enfermedades de los órganos diana.

En este sentido, la enfermedad por CMV está conformada por una miríada de presentaciones clínicas, entre las cuales quiero destacar las siguientes: neumonía, enfermedad gastrointestinal, hepatitis, retinitis, enfermedad del sistema nervioso central, nefritis, cistitis, miocarditis y pancreatitis, así como el síndrome por CMV.

### **I.6.8. Enfermedad de órgano diana**

En el caso de otras enfermedades de los órganos diana, la enfermedad se define como la presencia de síntomas o signos clínicos apropiados, junto con la documentación del CMV en el tejido del órgano correspondiente mediante histopatología, aislamiento del virus, cultivo rápido, inmunohistoquímica o hibridación del ADN.

### **I.6.9. Síndrome por CMV**

El síndrome por CMV se define como una infección sistémica generalizada por CMV acompañada de manifestaciones clínicas inespecíficas, sin evidencia de invasión tisular localizada. Esta entidad clínica es especialmente reconocida en el contexto del trasplante de órganos (41). Consiste en la detección del CMV en la sangre mediante aislamiento viral, cultivo rápido, antigenemia o técnica de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN), junto con al menos dos de los siguientes síntomas: fiebre  $\geq 38^{\circ}\text{C}$  durante al menos 2 días, malestar o fatiga nuevos o aumentados, leucopenia o neutropenia en 2 mediciones distintas con un intervalo de al menos 24 horas, más o igual a 5 linfocitos atípicos, trombocitopenia o elevación de las aminotransferasas hepáticas hasta 2 veces el límite superior normal en personas que no han recibido un trasplante de hígado (42).

## **I.7. La infección por CMV y control inmunitario en situación de inmunocompetencia**

La infección por CMV, como ya hemos comentado, es una enfermedad común que afecta a gran parte de la población humana, especialmente en los primeros años de vida. En la mayoría de los casos, los pacientes desarrollan una

inmunidad innata suficiente para superar la infección primaria sin presentar síntomas específicos, como fiebre, malestar general, mialgias, dolor de cabeza y fatiga muscular. Sin embargo, el virus puede permanecer latente en algunas células del hospedadora, como las células epiteliales, neuronales y propias del sistema inmune (neutrófilos, monocitos/macrófagos y linfocitos) (24)(43)(44).

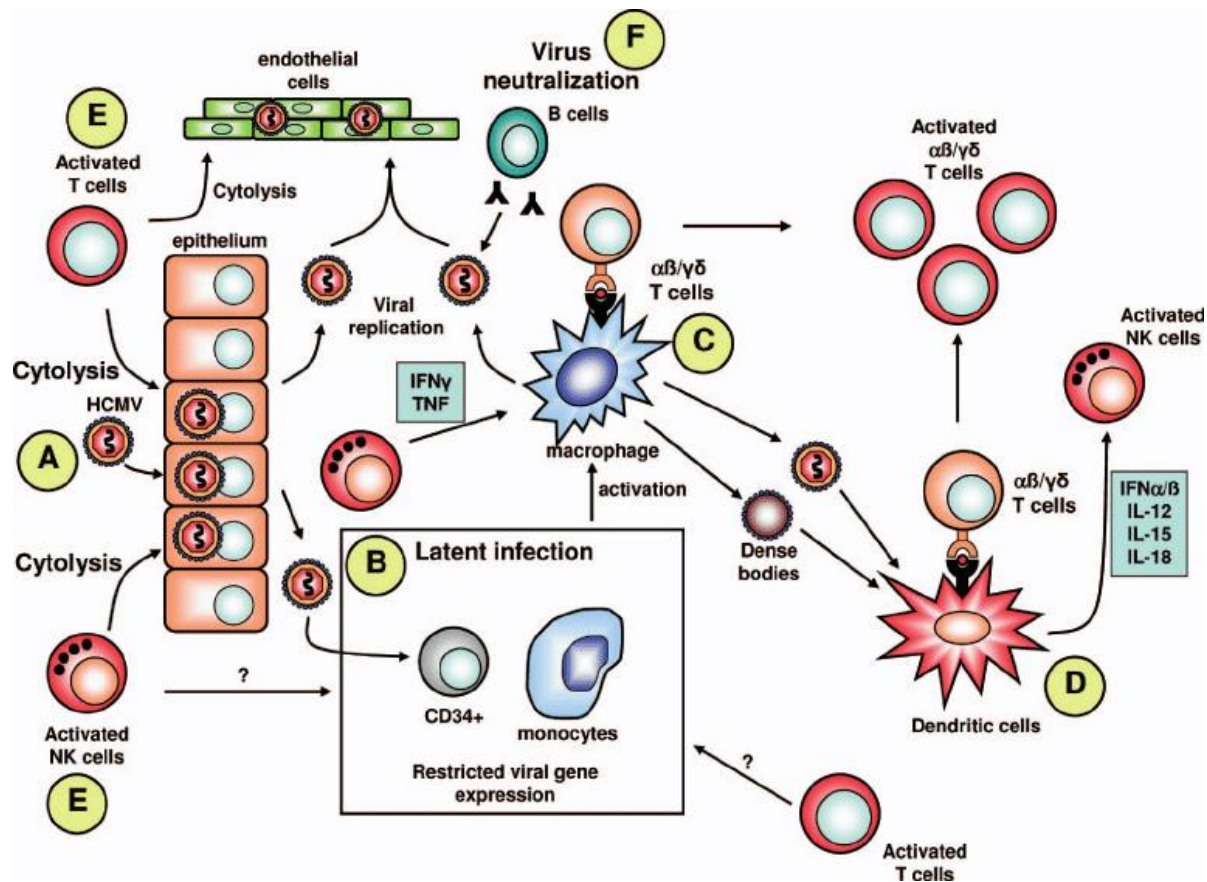
En individuos inmunocompetentes, como se ilustra en la Figura I-6, la infección primaria por CMV típicamente se inicia con la replicación viral en el epitelio de la mucosa (A). Posteriormente, el virus se desplaza hacia células monocíticas de linaje mieloide, incluyendo monocitos y células CD34+, donde establece un estado de latencia (B). Durante esta fase latente, la expresión genética del virus es restringida, lo que impide su reconocimiento por las células efectoras del sistema inmune. La diferenciación de estos monocitos latentes en macrófagos puede, en este punto, dar lugar a una infección productiva (C).

Paralelamente, las partículas virales pueden inducir la secreción de citocinas y quimiocinas, activando la respuesta inmunitaria, incluida la inmunidad innata mediada por células NK (D). Los macrófagos infectados también pueden estimular directamente las células T específicas de antígeno (C), que al activarse (CD8+, CD4+ y/o T- $\gamma\delta$ ) junto con las células NK, pueden eliminar células infectadas mediante citólisis o inhibir la replicación viral a través de la secreción de IFN- $\gamma$  y TNF (E).

Finalmente, las células B, activadas por células dendríticas (DCs), constituyen otro componente esencial de la respuesta adaptativa, controlando el virus a nivel extracelular mediante la neutralización mediada por anticuerpos (F).

La inmunidad innata, por otro lado, juega un papel crucial en la contención de la infección primaria, gracias principalmente a la participación de los receptores de patógenos o toll-like receptors (TLR) de las células inmunes mieloides y la citotoxicidad de los linfocitos NK (45). A pesar de la óptima respuesta inmune de los pacientes frente a CMV, el virus puede permanecer latente en células del huésped, lo cual puede conducir a su vez a episodios de reactivación viral intermitentes a lo largo de la vida, especialmente en pacientes con una respuesta inmune mermada, como aquellos con deficiencias notables en la inmunidad celular (disminución de

linfocitos T CD4 y CD8 específicos frente a CMV), derivando esta situación en el posible desarrollo de una enfermedad clínica más grave (43)(46).



**Figura I-6.** Control inmunológico del HCMV mediante inmunidad innata y adaptativa (43).

Asimismo, la reactivación del estado de latencia es un proceso crucial en la patogénesis del CMV, dándose principalmente en situaciones de inmunosupresión, infección o estrés inflamatorio. Aunque el mecanismo exacto no está completamente claro, se considera que TNF- $\alpha$  juega un papel fundamental. TNF- $\alpha$  interactúa con el receptor de TNF en las células infectadas latentemente, lo que provoca la activación de la proteína quinasa C y NF- $\kappa$ B, y posteriormente la transcripción de los genes IE del CMV, lo que finalmente desencadena la replicación viral (44).

Cuando la reactivación viral se encuentra controlada y la replicación del CMV es contenida, la respuesta inmune adaptativa adquiere un papel central, implicando la colaboración de las respuestas humoral y celular. Los linfocitos B, al diferenciarse en células plasmáticas, producen anticuerpos dirigidos contra dianas virales específicas, como las glicoproteínas gB y gH, y pueden beneficiarse de la

transferencia de anticuerpos IgG maternos a través de la placenta.

Por su parte, la respuesta celular resulta crucial frente al CMV, destacando la acción de los linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos. La gravedad de la infección se asocia frecuentemente con la depleción de esta inmunidad celular, subrayando su importancia. En individuos seropositivos sanos, la vigilancia inmunitaria eficiente frente a episodios de reactivación viral subclínica intermitente se mantiene gracias a la presencia de linfocitos T de memoria específicos circulantes en sangre periférica (43).

La infección por CMV es especialmente relevante en algunos contextos como la infección congénita y neonatal, donde puede producir una elevada tasa de mortalidad (hasta el 30%) y trayendo graves repercusiones en el feto, como retraso en el crecimiento, daño hepático y deterioro del sistema nervioso central. La infección fetal en madres seronegativas no es despreciable, pero las madres seropositivas protegen al feto con sus anticuerpos en caso de una reactivación durante el embarazo. Además, el CMV puede producir una infección oportunista en pacientes VIH positivos, especialmente en estadios más avanzados de SIDA, y en pacientes receptores de TOS, debido a su estatus de inmunosupresión (43)(46)(47).

### **I.8. La infección por CMV en pacientes con neoplasias hematológicas**

El CMV, como ya señalamos con anterioridad, es un miembro prototípico de la subfamilia *Betaherpesvirinae*, la cual incluye varias especies virales capaces de establecer infecciones latentes/persistentes de por vida en huéspedes humanos susceptibles tras la infección primaria (48).

Históricamente, la incidencia de reactivación del CMV y las manifestaciones de la enfermedad subsiguientes se consideraban bajas en entornos clínicos hematológicos distintos del trasplante alogénico de células madre. Sin embargo, el relativamente reciente aumento importante del uso intensivo de terapia inmunosupresora pleiotrópica, en particular en trastornos linfoproliferativos, ha llevado a un aumento de la incidencia de infecciones virales en diferentes pacientes hematológicos. Como consecuencia, el CMV representa un patógeno cada vez más importante, tanto en estos pacientes como en entornos diferentes del trasplante.

En este contexto, los episodios de reactivación viral subclínica esporádica son generalmente regulados por un sistema inmunológico eficiente, lo que justifica la abundancia de células T específicas contra el CMV presentes en la sangre periférica de individuos seropositivos y saludables. En contraste, la reactivación viral genera una considerable carga de morbilidad y mortalidad en individuos inmunocomprometidos, incluidos aquellos receptores de quimioterapia, trasplantes de órganos sólidos, trasplantes alogénicos de progenitores hematopoyéticos, así como en el contexto del desarrollo embrionario (49).

En este marco, se ha estudiado en profundidad la infección por CMV en los pacientes hematológicos receptores de trasplante, especialmente entre aquellos trasplantes alogénicos de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH), dada la elevada prevalencia y morbimortalidad en este conjunto de pacientes. Sin embargo, en contextos clínicos distintos del TPH alogénico, esta infección y sus repercusiones clínicas continúa siendo una cuestión poco explorada, de forma que puede afirmarse que falta experiencia clínica en el manejo de este escenario en particular (50). En consecuencia, el CMV se ha erigido en los últimos años como un patógeno de creciente relevancia en este tipo de pacientes.

Dada la seroprevalencia frente a CMV calculada en torno al 83% de media global (21) la incidencia reportada de infección por CMV y reactivación por CMV en pacientes con neoplasias hematológicas no receptores de TPH es notablemente heterogénea, variando entre el 2 y el 67% (50). En otro estudio, por ejemplo, se observó una incidencia de ADNemia por CMV del 17%, experimentando la mayoría de estos pacientes reactivaciones sintomáticas o enfermedad orgánica (51). Otra investigación destaca las elevadas tasas de infección por CMV, que oscilan entre el 25 y el 61% y de enfermedad por CMV del 3% al 16% dentro del año del diagnóstico (52). Se han identificado distintos factores de riesgo que justifican estas diferencias, incluyendo el uso de esteroides en altas dosis durante la inducción, el empleo de más de dos líneas de tratamiento para el linfoma, el uso de transfusiones de concentrado de hematíes, un bajo índice de masa corporal (IMC) y la presencia de hipoalbuminemia, asociándose, además, estos factores con una supervivencia general significativamente inferior en comparación con los pacientes sin infección por CMV (53).

Otra publicación más reciente confirmó que la mortalidad a los 30 días fue significativamente mayor en los pacientes con enfermedad por CMV (AOR=14,41, 3,23-64,31,  $p<0,001$ ) (54). Además, la mortalidad asociada a la infección por el CMV en estos pacientes se ve agravada aún más por las altas tasas de recurrencia, que oscilan entre el 20% y el 38% (52). Es importante destacar también la existencia de autores que asocian la viremia por CMV (incluida la de bajo grado y en ausencia de enfermedad CMV) a peores resultados clínicos y una disminución de la supervivencia en pacientes con neoplasias hematológicas (55). Sin embargo, se trata de un tema que genera gran controversia puesto que el tratamiento de la infección por CMV en esta población es complicado debido a los efectos adversos asociados con los tratamientos convencionales como el ganciclovir, el valganciclovir, o el foscarnet, que incluyen mielosupresión, neutropenia y nefrotoxicidad, que a menudo conducen a la interrupción del tratamiento (56). Además, el retraso de la recuperación de la neutropenia y la combinación con reactivación de virus de Epstein-Barr (VEB) después del trasplante son factores de riesgo comunes de infección por CMV e infección por CMV refractaria, siendo una carga viral de CMV de 10.000 UI/ml en plasma un umbral asociado con una mayor refractariedad y un menor riesgo de supervivencia general (SG) (57).

Por tanto, la elevada incidencia de la infección por CMV en pacientes con neoplasias hematológicas, así como su repercusión clínica, ponen de manifiesto la importancia de una vigilancia estrecha y del inicio precoz de la terapia antiviral, con el fin de reducir la morbilidad y mortalidad asociadas (55). El análisis detallado de su incidencia, de los factores de riesgo implicados y de los desenlaces clínicos en pacientes con neoplasias hematológicas que no son receptores de TPH evidencia la necesidad urgente de disponer de estrategias profilácticas y terapéuticas más eficaces. Ello permitiría no solo una mejor estratificación del riesgo, sino también la optimización de las intervenciones terapéuticas, con el objetivo último de mejorar el pronóstico en esta población especialmente vulnerable.

El desarrollo de enfermedad CMV en órganos diana, ya sea después de una infección primaria o de una reactivación del CMV, a menudo ocurre en el contexto de cargas virales altas o en ascenso (viremia/antigenemia pp65/ADNemia viral) en el compartimento sanguíneo (58). Esta enfermedad puede manifestarse como neumonía bilateral o enfermedad gastrointestinal, con mayor frecuencia; o bien

retinitis, hepatitis o encefalitis, con menor frecuencia.

## **I.9. Métodos de cuantificación de respuesta inmune T específica**

La evaluación de las respuestas específicas de las células T frente al CMV resulta fundamental tanto en el ámbito clínico como en el investigativo, en particular para el manejo adecuado de las infecciones en pacientes inmunodeprimidos, como aquellos sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH). Para este fin se dispone de diversas metodologías, entre ellas ELISPOT, IGRA y citometría de flujo con tinción intracelular de citoquinas, cada una con ventajas y limitaciones propias (39). Estos procedimientos han experimentado una notable evolución, lo que ha favorecido su creciente utilidad en el diagnóstico y en la investigación clínica.

### **I.9.1. Citometría de flujo con tinción de citoquinas intracelular**

Permite elaborar perfiles detallados de las células T, incluidos los marcadores de superficie y la producción de citoquinas. Además, proporciona datos exhaustivos sobre los subgrupos de células T y sus estados funcionales, lo que resulta valioso para comprender las respuestas inmunitarias en afecciones complejas como el TPH. El procedimiento suele basarse en el empleo de un conjunto de péptidos superpuestos a modo de antígeno, que abarcan las proteínas altamente inmunogénicas pp65 e IE-1 del CMV (59).

### **I.9.2. Ensayo ELISPOT (enzyme-linked immunospot)**

Este método permite evaluar la inmunidad mediada por células T a través de la estimulación *ex vivo* de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> con antígenos de CMV que interactúan con haplotipos de HLA de clase I, lo que induce la producción y liberación de IFN- $\gamma$ . En pacientes con infección latente por CMV, estos linfocitos son capaces de reconocer dichos antígenos y secretar IFN- $\gamma$  en respuesta; la detección de este proceso, mediante una versión modificada del ELISA convencional, constituye el fundamento del ensayo.

Este procedimiento se considera el estándar de referencia para cuantificar la frecuencia de células T específicas frente a determinados antígenos, gracias a su capacidad para ofrecer una enumeración precisa de los linfocitos que participan en

dicha respuesta (60). Es rentable y adecuado para análisis de alto rendimiento, lo que lo hace ideal para ensayos clínicos y estudios de vacunas.

Actualmente, el ensayo se ha optimizado en función de varios parámetros, como el número de células y el tiempo de incubación, a fin de mejorar su precisión y reproducibilidad

### **I.9.3. IGRA (ensayo de liberación de interferón gamma)**

Los ensayos de liberación de interferón gamma (IGRA) permiten evaluar la inmunidad celular específica mediante la cuantificación del IFN- $\gamma$  secretado por linfocitos T tras la estimulación antigénica. Entre estos, el Quantiferon-CMV, basado en la técnica de ELISA, se utiliza para detectar respuestas T frente a citomegalovirus, especialmente en pacientes inmunocomprometidos. Su sencillez técnica y aplicabilidad clínica lo convierten en una herramienta útil para monitorizar la inmunocompetencia específica frente a CMV (61), especialmente en el contexto de la investigación clínica.

La plataforma IGRA se adapta a diferentes patógenos y proporciona una herramienta versátil para las evaluaciones epidemiológicas y los ensayos clínicos (62).

## **II. Impacto de las nuevas terapias dirigidas y bioterapias en el manejo de la infección por CMV**

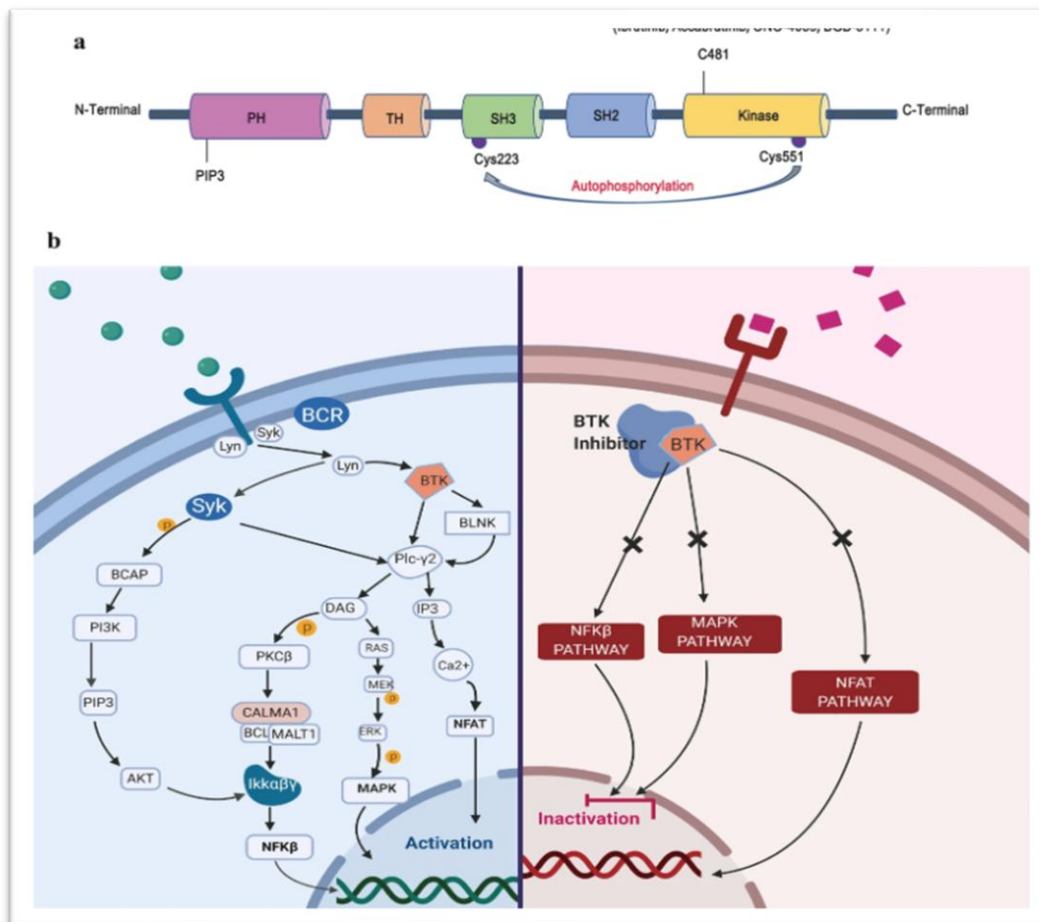
En el trasplante de progenitores hematopoyéticos, las denominadas “nuevas bioterapias” (ibrutinib, dasatinib, ruxolitinib y venetoclax, entre otros) han transformado la estrategia terapéutica al ofrecer inhibidores selectivos de vías moleculares críticas relacionadas con la supervivencia celular, la proliferación y la inflamación. Estos tratamientos pueden incluir terapias basadas en la modulación del sistema inmunológico, como la inmunoterapia, que busca potenciar la respuesta inmune del paciente contra la neoplasia y/o la infección CMV. Además, las nuevas bioterapias abarcan el uso de anticuerpos monoclonales y terapias génicas y/o celulares que buscan atacar directamente al virus/neoplasia o fortalecer la capacidad del sistema inmunológico para combatirlos (63)(64).

Los small molecule inhibitors, englobados dentro de estas nuevas terapias dirigidas, son compuestos de bajo peso molecular (generalmente menor a 500 Da) que se diseñan para interferir con la función de proteínas específicas, como enzimas o receptores, que participan en procesos celulares críticos. Debido a su pequeño tamaño, pueden penetrar en las células y modular vías de señalización internas, lo que los hace especialmente útiles en terapias dirigidas, por ejemplo, en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer y otras enfermedades. En este grupo quedan precisamente englobados ibrutinib, venetoclax, dasatinib y ruxolitinib.

### **II.1. Ibrutinib**

El ibrutinib es un fármaco inhibidor irreversible de la tirosina quinasa de Bruton (BTK), clave en la vía de señalización de los receptores de las células B. Esta vía desempeña un papel crucial en el desarrollo, la diferenciación y la proliferación de las células B, así como en el reconocimiento de agentes infecciosos por el sistema inmunitario innato (65)(66). Como primer inhibidor de la BTK aprobado para el mercado, ibrutinib revolucionó el panorama del tratamiento de diversas neoplasias hematológicas al regular la proliferación, la apoptosis y la migración celular (67). Se ha aprobado para el tratamiento de varias neoplasias malignas de células B, como la leucemia linfocítica crónica (LLC), el linfoma de células del manto y la macroglobulinemia de Waldenstrom, así como para el tratamiento para la enfermedad crónica de injerto contra huésped (EICRc) en receptores de TPH alogénicos (68). Además, se ha sugerido su potencial en el tratamiento de tumores sólidos como es el cáncer de mama ErbB2+, ya que muestra una reducción de la viabilidad celular y efectos sinérgicos cuando se combina con los inhibidores de la vía PI3K (como el idelalisib)(69).

El mecanismo de acción del ibrutinib implica la inhibición de la BTK, crucial para el desarrollo y la función de las células B. Esta inhibición interrumpe la vía de señalización de los receptores de las células B, provocando la muerte de las células B malignas (70). Después de la unión del antígeno a la parte extracelular del BCR (B-cell receptor), la BTK activada juega un papel de señalización esencial en la ruta descendente del BCR, de manera que puede regular la proliferación celular múltiple,



**Figura I-9.** Estructura de la tirosina quinasa de Bruton (BTK) y vías de señalización de reticulación asociadas (65).

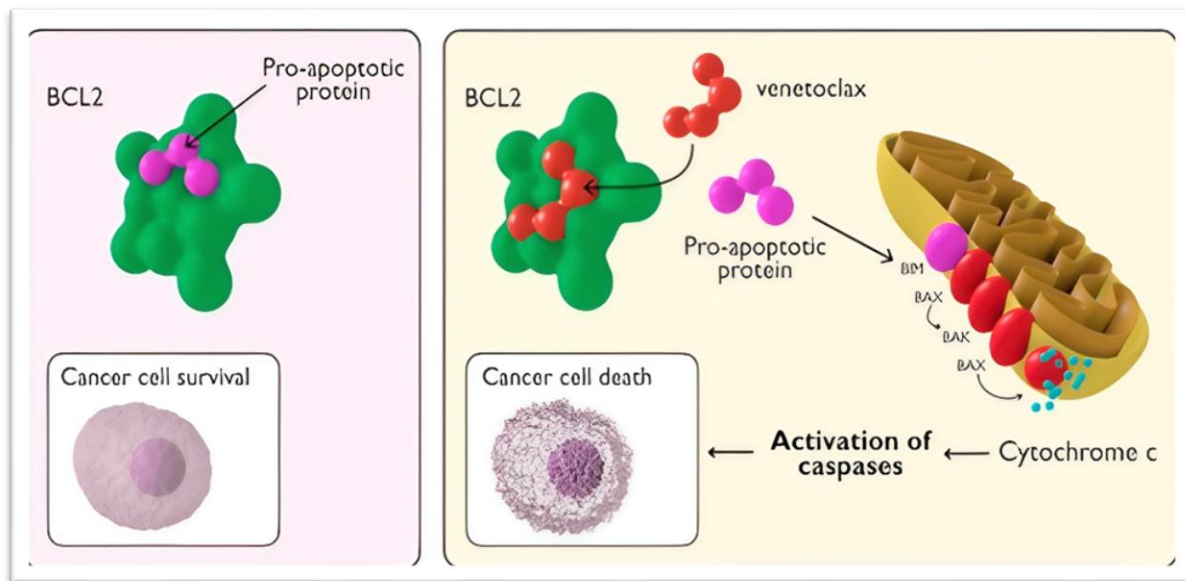
funciones de diferenciación y apoptosis mediante enlaces cruzados, activando muchas proteínas y vías cruciales en el tratamiento del linfoma de células B. A pesar de su eficacia, el uso del ibrutinib no está exento de desafíos. Los pacientes pueden desarrollar resistencia al fármaco, lo que a su vez puede provocar una recurrencia de la enfermedad y conllevar un mal pronóstico (71).

Además, el ibrutinib se asocia con varios efectos adversos, incluido un mayor riesgo de hemorragia y fibrilación auricular, lo que requiere una monitorización rigurosa del paciente (72). Además, el ibrutinib ha demostrado su potencial más allá de las neoplasias hematológicas, realizándose estudios que investigan su eficacia en tumores sólidos, aunque su función como monoterapia en este ámbito es limitada (73). En definitiva, el ibrutinib ha representado un avance significativo en el tratamiento de las neoplasias hematológicas, ofreciendo tasas de respuesta completa significativas. Sin embargo, su aplicación requiere una cuidadosa consideración de sus efectos adversos y del potencial de resistencia a los

medicamentos. La investigación actual continúa explorando formas de optimizar su uso y ampliar su potencial terapéutico.

## II.2. Venetoclax

Venetoclax es el primer fármaco inhibidor de BCL2 introducido y empleado en la práctica clínica. Se trata de una terapia perteneciente a los fármacos “small molecule inhibitors”, con biodisponibilidad oral, cuyo mecanismo de acción se basa en mimetizar farmacológicamente a las proteínas inductoras de la apoptosis (específicamente, las llamadas proteínas BH3). De esta forma, induce rápidamente la muerte de las células tumorales, especialmente en la leucemia linfática crónica con del(17p), donde esta proteína se expresa en niveles elevados y dependen de ella para su supervivencia (74)(75). Este mecanismo de acción es crucial por su eficacia en enfermedades caracterizadas por la sobreexpresión de BCL-2, que contribuye a la supervivencia, proliferación y resistencia de las células cancerosas.



**Figura I-10.** Mecanismo de acción de Venetoclax (76).

La utilidad clínica del venetoclax se reconoció por primera vez en la LLC, donde mostró una eficacia notable, especialmente en pacientes con enfermedad recidivante o refractaria. Su aprobación por parte de la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos) en 2016 para pacientes con LLC del(17p) previamente tratada se basó en tasas de respuesta significativas y beneficios de supervivencia libre de progresión demostrados en ensayos clínicos

(77). En terapia única, se han reportado respuestas duraderas en el 79 % de los pacientes con LLC o linfoma linfocítico pequeño en recaída o refractaria en un estudio de fase I, incluidas remisiones completas en el 20 % de los pacientes (78). Más allá de la LLC, venetoclax se ha mostrado prometedor en el tratamiento de otras enfermedades linfoproliferativas de células B, aunque las tasas de respuesta varían entre los diferentes subtipos debido a mecanismos de resistencia intrínsecos y adquiridos (79). Se ha explorado su actividad en combinación con otros agentes terapéuticos, como los inhibidores de la exportina 1 (XPO1) en la LMA, para superar la resistencia y mejorar la actividad antileucémica (75). Sin embargo, la resistencia al venetoclax plantea un desafío importante, con mecanismos que incluyen la regulación positiva de otras proteínas antiapoptóticas, mutaciones en las proteínas de la familia BCL-2 y alteraciones en la función y el metabolismo mitocondrial (80). Abordar estas vías de resistencia es fundamental para mejorar las terapias basadas en venetoclax. Actualmente hay varias investigaciones en desarrollo acerca de la posible combinación de venetoclax con otros tratamientos, como inhibidores de puntos de control inmunológico y radioterapia, lo que ofrece estrategias potenciales para mejorar su eficacia y superar la resistencia en diversas neoplasias hematológicas.

### **II.3. Dasatinib**

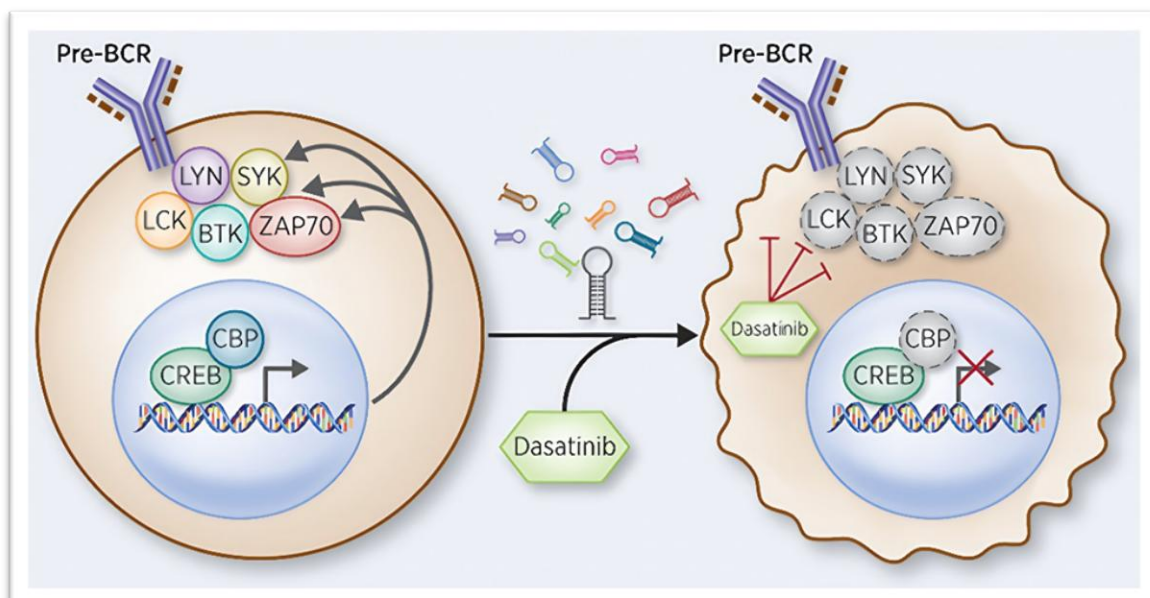
Dasatinib es un potente inhibidor de segunda generación de la tirosina quinasa (TKI). Actúa inhibiendo la proteína de fusión BCR/ABL y las quinasas de la familia SRC, así como c-KIT, PDGFR- $\alpha$  y - $\beta$ , y el receptor quinasa de efrina, tirosinas quinasas implicadas en la señalización celular, regulando procesos clave como proliferación, supervivencia, diferenciación y migración celular, estando frecuentemente asociadas a patologías como el cáncer. De esta manera, dasatinib bloquea la transición G1/S e inhibe el crecimiento celular con mayor potencia en comparación con otros inhibidores de BCR-ABL como imatinib (no requiere cambios conformacionales en el dominio de unión a ABL y, por tanto, es activo contra mutaciones resistentes a imatinib), por lo que fue diseñado para pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) en fase crónica, blástica o en fase acelerada resistentes o intolerantes al tratamiento previo (81). Además, se ha demostrado que dasatinib induce apoptosis y detención del ciclo celular en otras líneas celulares cancerosas, incluidos los cánceres de pulmón y orales, al atacar la LIM quinasa 1

(LIMK1) y Src (quinasas que regulan la dinámica del citoesqueleto y la señalización celular), respectivamente (82).

Los ensayos clínicos han demostrado que dasatinib produce respuestas moleculares, citogenéticas y hematológicas tempranas y duraderas tanto en pacientes adultos como pediátricos con leucemia mieloide crónica Ph+ recién diagnosticada o resistente o intolerante a imatinib (83). También ha demostrado eficacia para lograr respuestas citogenéticas importantes o completas en LMC en fase crónica recién diagnosticada y resistente o intolerante a imatinib, así como respuestas hematológicas importantes en LMC en fase acelerada o blástica y en la leucemia linfoblástica aguda (LLA) Ph+ (84)(85).

Por otro lado, existen efectos adversos documentados en relación al uso de este medicamento, como la hipertensión arterial pulmonar (HAP) y el derrame pleural, que están relacionados con el daño endotelial y el aumento de la permeabilidad vascular mediada por especies reactivas de oxígeno (86).

El mecanismo de acción de dasatinib también implica la inhibición de la vía RAF/MEK/ERK, lo que contribuye a su toxicidad cardiovascular (87).

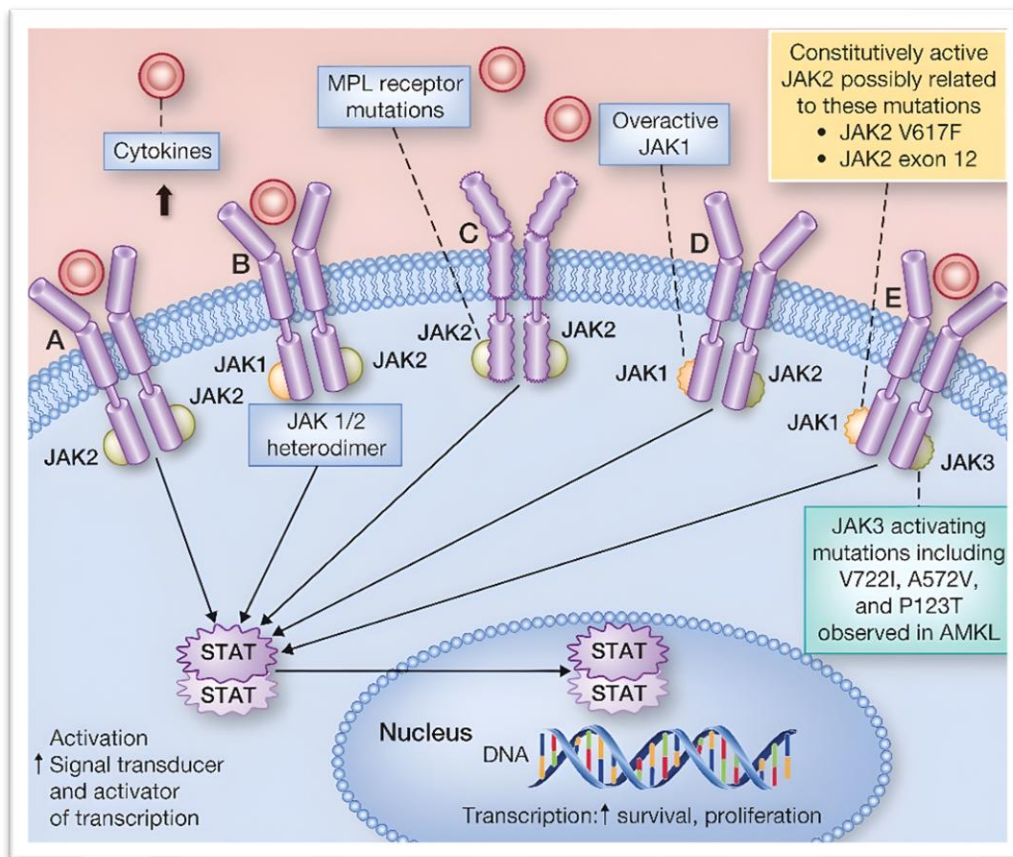


**Figura I-11. Mecanismo de acción de Dasatinib (88).**

**II.4. Ruxolitinib**

Ruxolitinib es un inhibidor selectivo de la familia Janus quinasa (JAK), dirigido específicamente a JAK1 y JAK2, las cuales desempeñan funciones cruciales en la vía de señalización JAK-STAT. Esta vía es clave para la transducción de señales de diversos factores de crecimiento y citoquinas involucradas en la proliferación, el crecimiento y la hematopoyesis celular (89). Al inhibir JAK1/2, ruxolitinib altera eficazmente la vía JAK-STAT, lo que lleva a una reducción de la fosforilación de las proteínas STAT, esenciales para la transcripción de genes implicados en la supervivencia y proliferación celular (90). Esta inhibición da como resultado la supresión de la proliferación celular y la inducción de la apoptosis en diversas líneas celulares de cáncer. Esta proliferación impulsada por mutaciones en el gen Janus quinasa 2 (JAK2), en particular la mutación JAK2V617F conduce a la activación constitutiva de la vía de señalización JAK-STAT y produce una proliferación y supervivencia celular descontrolada, contribuyendo a la patogénesis de diversos trastornos mieloproliferativos.

Inicialmente aprobado para el tratamiento de la mielofibrosis, ruxolitinib se ha utilizado desde entonces para otras afecciones como la policitemia vera, y varias afecciones dermatológicas que incluyen dermatitis atópica, psoriasis, alopecia areata y vitíligo (91)(92)(93). Actualmente, ruxolitinib se encuentra aprobado para pacientes con policitemia vera (PV) que tienen una respuesta inadecuada o intolerancia a la hidroxiurea. Esta indicación se aprobó en base a los resultados de ensayos clínicos como el RESPONSE de fase III, demostrando la eficacia de ruxolitinib para controlar los niveles de hematocrito, reducir el volumen del bazo y mejorar los síntomas y la calidad de vida relacionados con la PV. Este ensayo logró probar, al mismo tiempo, la superioridad de ruxolitinib respecto a la mejor terapia disponible en pacientes resistentes o intolerantes a la hidroxiurea (89). En el contexto de la EICR, ruxolitinib inhibe las vías inducidas por IFN- $\gamma$  en las células estromales mesenquimales, lo que reduce la expresión de moléculas proinflamatorias y, por lo tanto, mitiga los síntomas de la EICR (94). Además, se ha demostrado que ruxolitinib modula las respuestas inmunitarias al afectar la producción de citocinas y la función de las células inmunitarias.



**Figura I-12.** Mecanismo de acción de Ruxolitinib (95).

Por ejemplo, inhibe la producción de citocinas proinflamatorias como  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  en macrófagos pulmonares y células NK, sin abolir por completo sus capacidades citotóxicas (96). Ruxolitinib también promueve la diferenciación de megacariocitos y la trombocitopoyesis al unirse al receptor tipo Toll 2 (TLR2) y activar la vía Rac1/cdc42/JNK, al tiempo que reduce la expresión de PD-L1 en células de mieloma múltiple, mejorando la citotoxicidad mediada por células T (97). De interés también es mencionar que la farmacocinética del fármaco revela una alta biodisponibilidad y metabolismo hepático a través de CYP3A4 (enzima clave del citocromo P450), y los metabolitos activos contribuyen a sus efectos terapéuticos (98). En resumen, el mecanismo de acción multifacético de ruxolitinib implica la inhibición directa de la vía JAK-STAT, la modulación de las respuestas inmunitarias y la promoción de la hematopoyesis, lo que lo convierte en un agente versátil en el tratamiento de diversas afecciones hematológicas e inflamatorias.

## **II.5. Terapia CAR-T**

La terapia con células T portadoras de receptores de antígenos quiméricos (CAR-T) constituye una de las innovaciones más relevantes en el ámbito de la inmunoterapia oncológica. Esta estrategia se fundamenta en la modificación genética de linfocitos T autólogos, con el objetivo de dotarlos de capacidad para reconocer y eliminar selectivamente células tumorales (99).

El notable éxito de la terapia con células CAR-T en neoplasias hematológicas, como ciertas leucemias, linfomas y mieloma, ha allanado el camino para su aplicación en tumores sólidos, aunque esta expansión ha traído consigo una serie de desafíos adicionales. La alta eficacia de las terapias CAR-T dirigidas contra el antígeno CD19 y el antígeno de maduración de células B (BCMA) ha establecido un estándar de referencia para el potencial de esta estrategia terapéutica (100). Asimismo, en 2024 la FDA aprobó el uso de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) para el tratamiento del melanoma metastásico, convirtiéndose en la primera terapia basada en células T autorizada para un tumor sólido. Los desarrollos recientes, como los CAR-T de tercera y cuarta generación y los CAR-Ts duales o en tándem, han mejorado la respuesta inmune, contrarrestando el microambiente tumoral inmunosupresor e impidiendo la evasión antigénica. Además, CAR-T actúa independientemente del MHC, superando un mecanismo clave de evasión tumoral (100).

Por otro lado, es importante remarcar que las terapias convencionales actuales continúan teniendo limitaciones notables e impactos adversos sobre el sistema inmunológico y la salud general de los pacientes. Además, muchas células tumorales cuentan con la capacidad de evadir la detección inmunitaria al no expresar adecuadamente los antígenos que las identificarían como amenazas. La terapia CAR-T aborda este desafío mediante la introducción de un receptor de antígeno quimérico (CAR) en los linfocitos T del paciente. Este receptor quimérico combina un dominio de reconocimiento de antígeno, generalmente derivado de un fragmento de anticuerpo monoclonal, con dominios de señalización intracelular que activan la célula T al unirse al antígeno objetivo en la superficie de la célula tumoral. Esta configuración permite que las células T modificadas reconozcan y ataquen a las células cancerosas de manera independiente de las restricciones del MHC.

No obstante, existen en estos pacientes un alto riesgo de contraer infecciones, debido a factores como citopenias, hipogammaglobulinemia, inmunosupresión inducida y reactivación de CMV (101)(102). Además, el empleo de dosis elevadas de esteroides y tocilizumab para tratar el síndrome de liberación de citocinas (CRS) y el síndrome neurotóxico asociado a células efectoras inmunitarias (ICANS) también incrementa considerablemente el riesgo de infecciones (103)(104). Sin embargo, en la actualidad existe información limitada acerca de la replicación, así como la incidencia e importancia clínica del CMV en pacientes sometidos a tratamiento con CAR-T. Se ha notificado una elevada incidencia de ADNemia en pacientes CMV seropositivos receptores de esta terapia de hasta el 45%, pudiendo además empeorar los resultados clínicos de las mismas (105)(106).

Más allá del ámbito oncológico, la terapia con células CAR-T ha demostrado un enorme potencial en el tratamiento de enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple (EM) y el lupus eritematoso sistémico (LES), sentando las bases para la aplicación de terapias celulares basadas en CAR en el campo de las enfermedades autoinmunes (107). En la actualidad, estas patologías (como la esclerosis múltiple y el lupus eritematoso sistémico o la artritis reumatoide) se manejan principalmente mediante una amplia variedad de agentes inmunosupresores y anticuerpos bloqueantes, los cuales permiten controlar los síntomas, pero rara vez logran una curación definitiva (108).

### **II.5.1. Proceso de desarrollo de las células CAR-T**

El desarrollo de la terapia CAR-T implica varias etapas críticas, pudiendo resumirse de la siguiente manera:

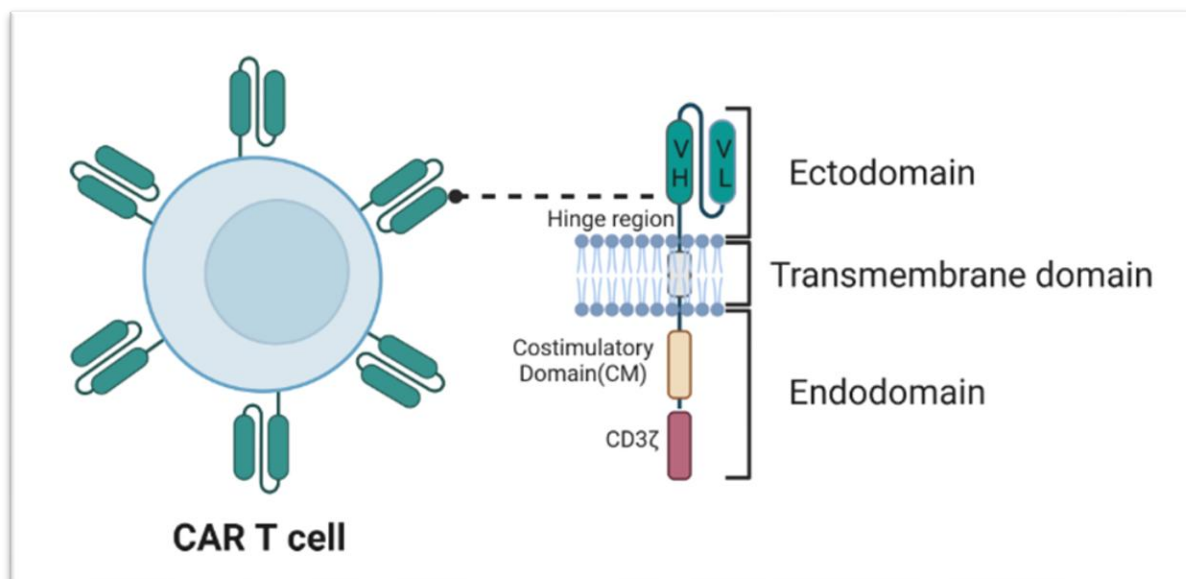
- **Recolección de células T:** Se extraen linfocitos T del paciente mediante un procedimiento llamado leucoaféresis, que separa específicamente los linfocitos del resto de la sangre.
- **Modificación genética:** Las células T recolectadas se modifican genéticamente en el laboratorio para expresar el CAR específico, haciéndolas capaces de expresar en su superficie un CAR, diseñado específicamente para identificar y unirse a determinados antígenos tumorales. Esta modificación se realiza comúnmente utilizando vectores virales, como retrovirus o lentivirus, que

introducen el gen del CAR en el genoma de las células T.

- Expansión celular: Las células T modificadas se cultivan y expanden en condiciones controladas in vitro hasta alcanzar una cantidad suficiente para la infusión terapéutica.
- Infusión al paciente: Las células CAR-T expandidas se infunden de nuevo en el paciente, donde buscan y destruyen las células tumorales que expresan el antígeno objetivo.

### II.5.2. Estructura del CAR

La base fundamental de la terapia con células CAR-T reside en la estructura de los CARs, diseñados mediante ingeniería genética. Estos receptores sintéticos modificados están conformados por cuatro elementos estructurales principales: el dominio extracelular de reconocimiento antigénico, que incluye un fragmento variable de cadena única (ScFv) junto con una región bisagra; un dominio transmembrana (TMD); y un dominio intracelular encargado de la activación de los linfocitos (Figura I-13)(99).



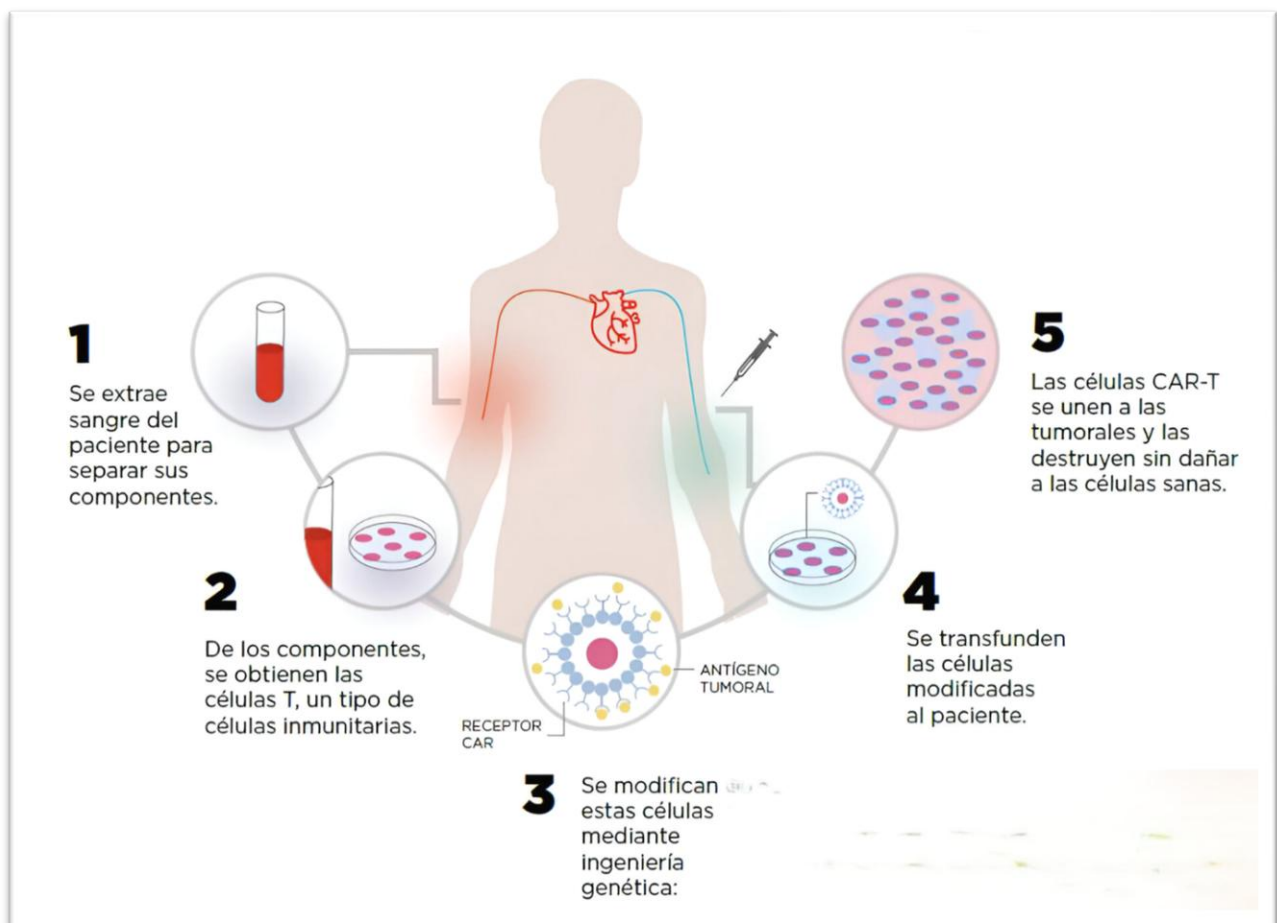
**Figura I-13.** Estructura del receptor de antígeno quimérico (CAR). Se compone de tres regiones principales. El ectodominio, generalmente constituido por un fragmento variable de cadena única (scFv) derivado de un anticuerpo, está formado por una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL), siendo el responsable del reconocimiento del antígeno. El dominio transmembrana ancla el CAR a la membrana del linfocito T, proporcionando estabilidad estructural. Finalmente, el endodominio integra elementos de señalización, como la cadena

CD3 $\zeta$ , que contiene motivos ITAMs, y un dominio coestimulador (CM), el cual potencia la activación, proliferación y persistencia de los linfocitos T.

---

### II.5.3. Aplicaciones Clínicas y Eficacia

De esta manera, la terapia con células CAR-T tiene ventajas únicas en comparación con las terapias convencionales, incluida su naturaleza altamente personalizada y adaptativa. Esta personalización implica analizar el tumor del paciente para identificar antígenos asociados al tumor (TAA) específicos.



**Figura I-14.** Esquema del proceso de desarrollo e infusión de la terapia CAR-T.

---

Este enfoque terapéutico altamente específico permite diseñar un tratamiento personalizado para cada tipo de cáncer, lo que se traduce en una notable eficacia clínica. En particular, la terapia con células CAR-T ha demostrado ser particularmente efectiva en neoplasias hematológicas de difícil manejo con tratamientos convencionales, tales como linfomas, leucemia linfocítica crónica,

mieloma múltiple y leucemia linfoblástica aguda de células B (109).

Su aplicación en neoplasias sólidas sigue, sin embargo, planteando desafíos, en términos de eficacia terapéutica y seguridad. En respuesta a estos obstáculos, la investigación continúa refinando el diseño de las células CAR-T. Los avances recientes han logrado superar algunas de las limitaciones presentes en generaciones anteriores de esta terapia. Un ejemplo de ello es la cuarta generación de células CAR-T, que incorpora la expresión inducible de citocinas con el propósito de potenciar la activación y el reclutamiento de células del sistema inmunitario innato, permitiendo así una respuesta antitumoral más sostenida y eficaz dentro del microambiente tumoral inmunosupresor (110).

#### **II.5.4. Efectos adversos de la terapia CAR-T**

Uno de los principales desafíos para la adopción generalizada de la terapia con células CAR-T es la toxicidad asociada a este enfoque, incluyendo el CRS e ICANS (103)(104)(111). Estos síndromes derivan del propio mecanismo de funcionamiento de la terapia CAR-T. La activación de las células CAR-T y la secreción de citocinas dependen de la interacción entre el dominio de unión al antígeno y su diana específica, alcanzando un umbral de activación determinado. Este umbral se refiere a la cantidad mínima de interacción antigénica necesaria para inducir una activación suficiente de las células CAR-T, lo que normalmente implica la unión de un número específico de receptores en su superficie.

Cuando se supera este umbral, se desencadena una respuesta inmunitaria intensa, generándose una liberación excesiva de citocinas, lo que a su vez aumenta el riesgo de toxicidad, como el CRS o efectos fuera de objetivo en tejidos sanos. Como respuesta a este problema, se han explorado diversas estrategias de modificación en el diseño del CAR para mitigar estos efectos adversos (112).

Entre las estrategias más prometedoras para disminuir estas complicaciones destaca la modificación de la afinidad del dominio de reconocimiento antigénico, de modo que se requiera una mayor expresión del antígeno en las células tumorales para inducir la activación de los linfocitos T. Esta aproximación permite, en consecuencia, una mayor preservación de las células sanas, que suelen expresar

el antígeno diana en niveles más bajos. (111). Otra estrategia clave para reducir la toxicidad implica la modificación de las regiones bisagra y transmembrana del CAR. Estas alteraciones tienen como objetivo optimizar la flexibilidad y estabilidad estructural del receptor, influyendo en la intensidad y duración de la señal de activación. Al ajustar estas regiones, se logra una activación más controlada y equilibrada de las células CAR-T, regulando la secreción de citocinas y minimizando respuestas inmunitarias excesivas.

Es relevante señalar que la modificación de la región bisagra y transmembrana del CD8- $\alpha$  en terapias con células CAR-T dirigidas frente a CD19 ha demostrado una reducción notable en la liberación de citocinas. En este sentido, el control de la toxicidad asociada a la terapia CAR-T constituye un requisito esencial para garantizar tanto su seguridad como su eficacia clínica. Las estrategias actuales se orientan principalmente a optimizar el diseño de los CAR, con el propósito de modular de manera más precisa su activación y la liberación de citocinas, minimizando así la aparición de efectos adversos.

### **II.5.5. Infecciones secundarias al tratamiento con CAR-T**

Esta respuesta inmunitaria exacerbada se asocia, además, a una mayor susceptibilidad a infecciones (101)(102) favorecida por citopenias, hipogammaglobulinemia, inmunosupresión inducida y el uso de esteroides o tocilizumab. Destaca la reactivación del citomegalovirus (CMV), con una incidencia de hasta el 45 % en pacientes seropositivos tratados con CAR-T (105), y una posible repercusión negativa en los desenlaces clínicos (105)(106).

Para mitigar estas complicaciones, se han desarrollado estrategias de rediseño del receptor CAR. Entre ellas, la reducción de la afinidad del dominio antigénico exige mayor expresión tumoral para la activación, protegiendo células sanas. Asimismo, la modificación de las regiones bisagra y transmembrana, como el uso de la región CD8- $\alpha$  en CARs anti-CD19, ha demostrado disminuir significativamente la liberación de citocinas.

Estas mejoras estructurales han permitido una activación más controlada, reduciendo tanto la toxicidad como el riesgo de infecciones, y constituyen un avance

clave para la seguridad y eficacia de esta inmunoterapia.

### **III. Torque Teno Virus: aspectos generales y estructura**

El Torque Teno Virus (TTV) fue identificado por primera vez en 1997 en un paciente japonés durante un episodio de hepatitis postransfusional no viral, es decir, no atribuible a los virus de la hepatitis A a E. Este virus se caracteriza por su alta prevalencia, que supera el 90 % en la población general, sin diferencias significativas en función del sexo o del estatus socioeconómico (113).

Perteneciente a la familia Anelloviridae, el nombre inicialmente correspondió a las iniciales de dicho paciente, para finalmente establecerse en 2005 a partir del latín torques y tenuis, collar y delgado respectivamente (114). Asimismo, el género alphatorquevirus, que comprende los TTV, incluye no menos de 29 especies y representa el prototipo de la familia Anelloviridae. Se trata de un virus de pequeño tamaño (entre 30 y 50 nm) y cadena sencilla (ssADN), genéticamente muy heterogéneo, de polaridad negativa, desnudo y encapsulado (115). Los tamaños del genoma varían de 1,6 a 3,9 kb; si buscamos una comparativa, el genoma del CMV está por encima de los 230 kb.

Se adquiere de forma temprana y tras la primoinfección, provoca una infección persistente replicándose en grandes cantidades. Esta replicación suele darse en granulocitos, así como células mononucleares de sangre periférica activadas, especialmente linfocitos T (116)(117). Queda aún por identificar, sin embargo, el receptor celular empleado por el virus (118). Tras producirse el contacto con el virus, es posible detectarlo en plasma al cabo de unas pocas semanas.

Puede transmitirse de diversas maneras, habiéndose demostrado la excreción del virus en heces y la materno-fetal (leche materna, transplacentaria)(119) o a través de transfusiones sanguíneas. Se ha postulado asimismo la vía respiratoria como medio de transmisión del virus (120). Inicialmente, se postuló un posible efecto deletéreo a nivel hepático, dada su capacidad de replicarse en el hígado. Sin embargo, existe actualmente un consenso acerca de considerar este virus como virus inocuo o comensal ya que hasta el momento no se ha asociado a ningún efecto patológico o enfermedad específica (121).

En cuanto a su estructura, los anellovirus estudiados en mamíferos poseen un marco de lectura abierto (ORF) grande y dos o tres más pequeños (115). El genoma viral contiene una región rica en guanina-citosina (GC) (en torno al 90%). La región URT es la más conservada y se cree que desempeña un papel regulatorio en la replicación viral, mientras que en la región transcrita destacan dos marcos abiertos de lectura ORF-1 y ORF-2, codificando la cápside viral y una proteína interferente con los linfocitos B, respectivamente (115). Ambos ORF tienen un alto nivel de divergencia, de entre un 47% y hasta un 70% en la secuencia de aminoácidos de los péptidos que codifican (122).

Este virus se caracteriza, como ya hemos comentado, por no responder a los antivirales actuales y por desarrollar una carga viral en plasma estable, con poca variabilidad intraindividuo (123). La alta tasa de replicación en las personas infectadas, así como de eliminación, pueden indicar que con mucha probabilidad existen santuarios de replicación activa del virus, pudiendo ser un ejemplo de esto las células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Se puede concluir que, respecto al TTV, en vista de su distribución ubicua y su capacidad de establecer una latencia persistente, posiblemente de por vida, no es sorprendente que el TTV constituya un componente relevante del viroma sanguíneo en sujetos sanos (122).

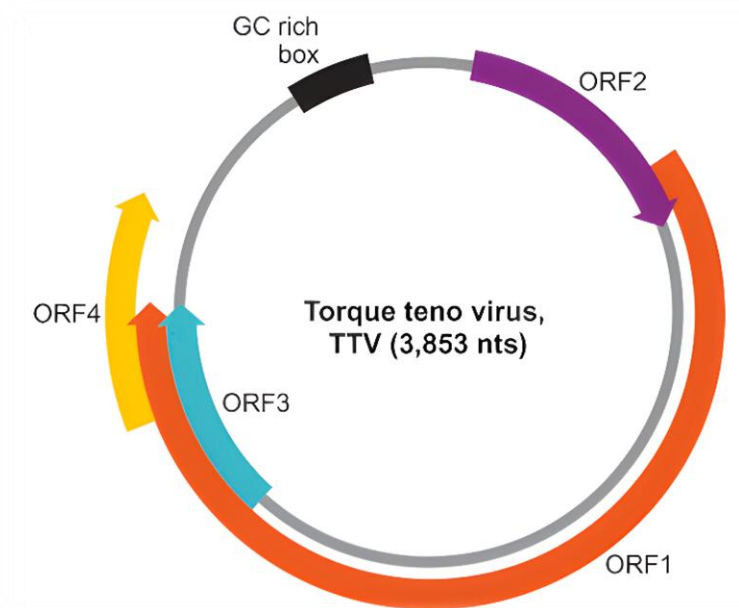
Todas estas características del TTV llevaron a especular sobre su posible papel sobre la inmunomodulación así como a diversos estudios sobre su posible papel como herramienta auxiliar a la hora de predecir la ocurrencia de complicaciones infecciosas, rechazo de injerto y otras complicaciones de base inmunológica en recipientes de TOS y alo-TPH (122)(124).

### **III.1. TTV como marcador subrogado del estatus inmunitario. Relación con la infección por CMV**

La identificación de biomarcadores inmunológicos fiables continúa siendo esencial para predecir infecciones, rechazo agudo del injerto y otras complicaciones tras el TOS o el alo-TPH. Entre las estrategias emergentes destaca la monitorización del viroma humano, particularmente del torque teno virus (TTV), cuya ADNemia, de distribución casi universal y elevada prevalencia en pacientes inmunocomprometidos, se postula como indicador funcional del grado de

inmunosupresión.

Sus niveles en sangre no se ven alterados por tratamientos farmacológicos, lo que refuerza su valor como marcador objetivo. Además, su estabilidad intraindividual, resistencia a antivirales y la disponibilidad de métodos comerciales de cuantificación por PCR lo convierten en un candidato idóneo para estudios clínicos. Todo ello respalda su potencial aplicación en la monitorización inmunológica de pacientes trasplantados, con enfermedades autoinmunes, inmunodeficiencias o sometidos a terapias inmunomoduladoras. (123).



**Figura I-15.** Organización genómica de un torque teno virus (TTV). Imagen obtenida de King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds.), Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, p. 332. (2018).

Como hemos mencionado, la carga viral de TTV en un receptor TOS o alo-TPH parece mantenerse relativamente estable con el tiempo, sin los cambios pronunciados que sí parecen observarse en otros marcadores como el virus de Epstein-Barr (EBV). Además, una ventaja importante es que el TTV no es sensible a los antivirales disponibles, lo que facilitaría en mayor medida su utilidad como biomarcador subrogado estable y fiable del estatus inmunitario. En este sentido, recientemente se han desarrollado ensayos comerciales de PCR para medir los

niveles de ADN de TTV.

La mayoría de los estudios clínicos que investigan el uso del monitoreo de TTV se enfocan en su capacidad para predecir infecciones tras el trasplante, buscando reflejar de manera precisa el riesgo individual de complicaciones infecciosas, una necesidad que no ha sido completamente satisfecha. Un creciente número de investigaciones han demostrado una correlación clara entre niveles elevados o en aumento de ADN de TTV y la aparición de infecciones post-trasplante, aunque también se han reportado algunos resultados contradictorios. No obstante, estas investigaciones varían considerablemente en cuanto a la definición de resultados, las poblaciones de TOS estudiadas, el momento del monitoreo, los ensayos de PCR empleados, los umbrales sugeridos y las estimaciones de precisión diagnóstica.

### **III.2. La infección por TTV en el contexto del trasplante de órgano sólido**

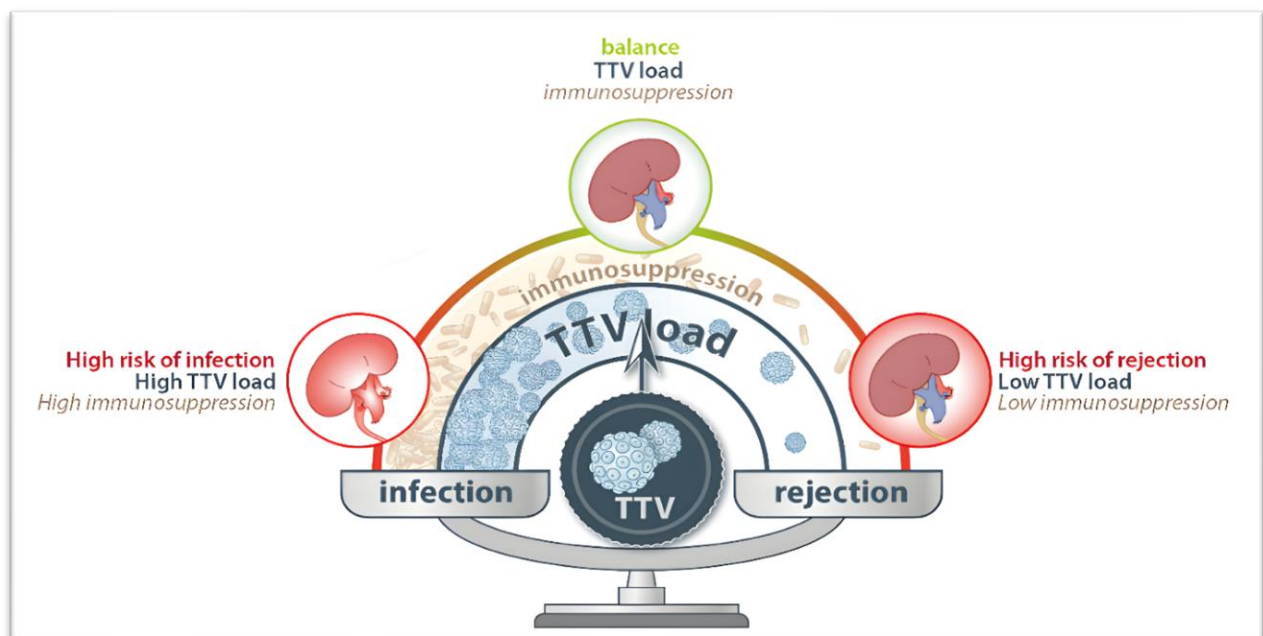
Actualmente, el manejo de pacientes con fármacos inmunosupresores tras un TOS continúa requiriendo un equilibrio cuidadoso entre una inmunosupresión insuficiente, que podría causar rechazo, y una inmunosupresión excesiva, que aumenta el riesgo de infecciones oportunistas graves. De esta manera, distinguir entre las complicaciones derivadas de ambas situaciones sigue siendo un desafío, ya que los signos y síntomas pueden superponerse, especialmente en las fases tempranas postrasplante (125).

Si bien los enfoques actuales son generalmente eficaces para prevenir el rechazo, las tasas más altas de infecciones y cánceres en los años posteriores al trasplante resaltan la necesidad de apuntar al nivel mínimo de inmunosupresión que aún asegure la supervivencia del injerto, minimizando al mismo tiempo el riesgo de infección.

En este sentido, el TTV se ha erigido en los últimos años como una herramienta predictiva prometedora en el TOS, radicando su utilidad en su capacidad para reflejar el equilibrio entre la inmunosupresión y la inmunocompetencia, algo crucial para prevenir el rechazo de los injertos y las infecciones oportunistas.

Una gran cantidad de evidencia experimental reunida en el contexto del TOS apoya la suposición de que los niveles altos o crecientes de ADN de TTV en sangre después del trasplante se asocian con la aparición de ciertos eventos infecciosos, mientras que lo opuesto es válido para el rechazo agudo (123)(126)(127).

De esta forma, existe evidencia que sostiene la existencia de una correlación directa entre la carga viral del TTV en el plasma y el grado de inmunosupresión: las cargas altas indican inmunosupresión y las cargas bajas indican inmunocompetencia (128). Por otro lado, se ha demostrado que una menor carga de TTV se asocia con un mayor riesgo de rechazo del injerto. En el contexto del trasplante de riñón, un metanálisis reveló que los pacientes que experimentaron un rechazo agudo presentaban una carga de ADN viral del TTV significativamente menor. (129).



**Figura I-16.** Imagen ilustrativa del equilibrio entre la carga de TTV y el estatus de inmunosupresión en la prevención de infección y rechazo del injerto (126).

### III.3. La infección TTV en el alo-trasplante de progenitores hematopoyéticos

En contraste con la abundante literatura producida en los últimos años sobre la utilidad clínica del seguimiento de TTV en el ámbito de los TOS, la evidencia disponible para los pacientes que reciben un alo-TPH es más limitada. A esto hay

que sumarle que la interpretación de los resultados puede ser complicada, dado que el significado clínico de la infección por TTV post alo-TPH puede estar influenciado por una serie de factores: la enfermedad subyacente, el tipo de régimen de acondicionamiento o el uso de agentes inmunosupresores para la profilaxis o el tratamiento de la EICR.

Es de tener en cuenta que, a diferencia de lo observado en el contexto del TOS, la linfopenia que ocurre en los receptores de alo-TPH es mucho más profunda y duradera, especialmente tras acondicionamiento mieloablativo o del agotamiento de células T. Siendo este virus, como ya hemos mencionado anteriormente, esencialmente linfotrópico, la viremia por TTV puede en estos casos ser indetectable dada la profunda depleción de células T, consideradas como el nicho replicativo principal (117). En consecuencia, el estudio de la cinética del TTV postrasplante puede reflejar una reconstitución inmunológica en lugar de servir como marcador subrogado del estatus de inmunosupresión, como sí sucede en los receptores de TOS.

Sin embargo, y en línea con lo que sucede en el trasplante de TOS, las cargas de TTV son significativamente más elevadas en receptores de alo-TPH respecto a las de sujetos sanos (130). Otro aspecto a tener en cuenta es que los pacientes con neoplasias linfoides suelen tener una mayor carga de TTV en comparación con los pacientes con neoplasias mieloides. Además, factores como la remisión completa antes del trasplante, el acondicionamiento mieloablativo y el uso del ATG se asocian a cargas más elevadas de TTV (130)(131).

Es importante señalar que la correlación entre los recuentos de células T y las cargas virales de TTV es variable, por lo que el momento de realización de la PCR ha de elegirse con cuidado, si queremos poder evaluar correctamente los resultados de la monitorización. Se ha constatado una correlación directa entre el aumento de los niveles de ADN del TTV y la recuperación de la población linfocitaria. Este fenómeno sugiere que la replicación del TTV depende de la reaparición de la población linfocitaria, pudiendo estas células funcionar tanto como dianas como reservorios del virus (132). Podría postularse, en este sentido, que el aumento de los niveles de TTV no es meramente un hecho aislado, sino más bien un indicador potencial de la capacidad funcional del sistema inmunitario durante la fase de

reconstitución. Sin embargo, tras el injerto, otros estudios indican una inversión en esta correlación entre la carga de la TTV y el recuento linfocitario, lo que sugiere el restablecimiento de la respuesta inmune específica para el TTV (133)(131), incluso para la respuesta CD8+CD57+ T-específica (134).



## **HIPÓTESIS**



Ibrutinib, idelalisib, ruxolitinib, dasatinib y venetoclax merman, en mayor o menor medida, o modulan las respuestas inmunitarias innata (NK) y adaptativa (T, B, o ambas), cuya funcionalidad es esencial en el control de la infección crónica-persistente por el CMV. Los pacientes infectados por el CMV (IgG seropositivos) tratados con estas moléculas podrían responder subóptimamente frente a la reactivación viral, lo que les situaría en una posición de alto riesgo de viremia (ADNemia), en última instancia, de enfermedad orgánica o tisular, ambos potencialmente deletérea. Puesto que no existen datos consistentes en la literatura que avalen lo anterior, nuestra presunción es inferida con base en el mecanismo de acción de estas moléculas, en consecuencia, es posible que los resultados obtenidos no corroboren la hipótesis inicial.

Por otro lado, la inmunosupresión profunda que acompaña a la terapia CAR-T, junto con los efectos secundarios como el CRS y el ICANS, predispone a los pacientes a infecciones virales como CMV y otros herpesvirus. En este contexto, la literatura en torno a la reactivación del CMV todavía es limitada, pero algunos estudios sugieren que una monitorización de la ADNemia por CMV podría ayudar a prevenir complicaciones infecciosas y mejorar la supervivencia general en estos pacientes.

Finalmente, existe en la actualidad evidencia indicativa de una relación inversa entre la carga viral de TTV y el estatus inmunológico del individuo. En esta tesitura, podría ser de extrema utilidad contar con una herramienta predictiva de complicaciones derivadas del trasplante (como rechazo del injerto o infecciones oportunistas) tanto en el contexto de órgano sólido (TOS) como el alo trasplante de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH). Sin embargo, la mayor parte de estos trabajos se centran en evaluar el riesgo de rechazo y cuentan con un tamaño muestral escaso.

En el contexto anterior, nos planteamos los siguientes objetivos.



## **OBJETIVOS**



## OBJETIVOS

- I. Determinar la incidencia de ADNemia plasmática del CMV, así como su cinética de aclaramiento en pacientes tratados con nuevas terapias oncohematológicas:
  - a) Pacientes sometidos a tratamiento con ibrutinib.
  - b) Pacientes sometidos a tratamiento con dasatinib, venetoclax y ruxolitinib.
- II. Evaluar prospectivamente las respuestas T CD4+ y T CD8+ funcionales frente al CMV en estos pacientes.
- III. Explorar la utilidad de la monitorización de la carga viral de CMV en pacientes tratados con terapia de células T con receptor de antígeno quimérico dirigido a CD19 (terapia CAR-T).
- IV. Estudiar la cinética de la ADNemia de TTV como potencial marcador subrogado de inmunosupresión celular (linfocitos T y B) neta en pacientes con neoplasias hematológicas tratadas con small molecule inhibitors.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**



Los distintos estudios que conforman esta tesis incluyeron cohortes de pacientes con diversos trastornos hematológicos y neoplasias, así como episodios de viremia por CMV, reclutados en cinco hospitales terciarios de referencia en España. Únicamente el tercer estudio se circunscribió a dos centros específicos, el Hospital Clínico Universitario de Valencia (HCUV) y el Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia (HUPLF). El periodo de inclusión, común a todos los trabajos, abarcó desde diciembre de 2018 hasta enero de 2022. Las características metodológicas de cada estudio se resumen en la Tabla IV-1.

Las variables clínicas y demográficas de cada cohorte se describen en su totalidad en las tablas correspondientes de cada artículo. Asimismo, todos los proyectos contaron con la aprobación del Comité de Ética e Investigación Clínica (CEIC) y se llevaron a cabo tras obtener el consentimiento informado de los pacientes. En cada publicación se detallan también las técnicas microbiológicas empleadas para la detección y cuantificación de CMV.

## **I. Procesamiento de muestras biológicas**

En los estudios incluidos, se recolectaron muestras de sangre total en tubos con heparina sódica, siguiendo los calendarios establecidos para cada protocolo. Para la obtención de plasma y posterior análisis de carga viral (CMV o TTV), las muestras fueron centrifugadas a 2.000 rpm durante 10 minutos. El plasma separado se transfirió a tubos secos estériles, fue etiquetado, registrado y criopreservado a -80 °C hasta su procesamiento mediante PCR a tiempo real, dentro de un periodo máximo de un mes y sin descongelaciones intermedias.

En el caso del estudio de inmunidad T específica frente a CMV, las muestras fueron procesadas de forma inmediata. Se realizó una estimulación antigénica sobre sangre total, seguida de criopreservación a -80 °C de las muestras “estimuladas”. Posteriormente, se llevaron a cabo técnicas de tinción intracelular de citocinas (ICS) y análisis por citometría de flujo. Los aspectos metodológicos específicos de cada estudio se resumen en la Tabla IV-1.

**Tabla IV-1. Características metodológicas: artículo, tipo de artículo, procedencia, nº de pacientes y periodo de estudio**

| Artículo                                             | Tipo       | Procedencia                         | Nº<br>pacientes | Periodo de<br>estudio                       |
|------------------------------------------------------|------------|-------------------------------------|-----------------|---------------------------------------------|
| <b>Solano C.<br/>Br J Haematol.<br/>2021</b>         | Prospec.   | HCUV<br>HUVH<br>HUPLF<br>HRC<br>HMM | 23              | Diciembre de<br>2018 a noviembre<br>de 2020 |
| <b>Solano C.<br/>Br J Haematol.<br/>2023</b>         | Prospec.   | HCUV<br>HUVH<br>HUPLF<br>HRC<br>HMM | 36              | Enero de 2019 a<br>enero de 2022            |
| <b>Solano C.<br/>Clin Microbiol Infect.<br/>2023</b> | Retrospec. | HCUV<br>HUPLF                       | 51              | Febrero de 2020<br>a junio de 2022          |
| <b>Solano C.<br/>J Med Virol.<br/>2023</b>           | Retrospec. | HCUV<br>HUVH<br>HUPLF<br>HRC<br>HMM | 41              | Enero de 2019 a<br>enero de 2022            |

**Hospitales incluidos:** HCUV: Hospital Clínico Universitario de Valencia; HUPLF: Hospital Universitario Politécnico La Fe; HUVH: Hospital Universitario Vall d'Hebron; HRC: Hospital Ramón y Cajal; HMM: Hospital Morales Meseguer.

En el **primero** de los artículos de esta tesis (Solano de la Asunción, C. Br J Haematol 2021 Aug), que evaluó la incidencia de la ADNemia plasmática de CMV en pacientes en tratamiento con ibrutinib, monitorizamos la carga de CMV en 23 pacientes adultos seropositivos para CMV afectados de LLC y tratados con ibrutinib en monoterapia, durante un período de 6 meses. Se recolectó un total de 154 muestras (mediana de 7 muestras de plasma por paciente; rango 3-10).

Para ello, se recogieron muestras de sangre total y, sobre el plasma, se

determinó la carga viral de CMV en los días +0, +15, +30, +45, +60, +75, +90, +120, +150 y +180 haciendo uso de una PCR a tiempo real (límite de detección de 31 UI/ml), recogiendo muestras de sangre total a lo largo de un periodo de 6 meses. En este primer trabajo, y de forma paralela a la determinación de la carga viral de CMV, se evaluó la respuesta T a la infección por CMV en pacientes tratados con ibrutinib. De esta forma, obtuvimos muestras de sangre total remitidas los días +0, +30, +60, +90, +120, +150 y +180 tras inicio de tratamiento con ibrutinib para el análisis de la respuesta inmunitaria T específica frente a CMV y, llegado el momento de realizar el análisis, descongelamos las muestras de sangre total y procedimos a realizar ICS y citometría de flujo sobre éstas, con el fin de cuantificar la respuesta inmune específica frente a CMV.

En el **segundo** de los artículos (Solano de la Asunción, C. Br J Haematol Mar 2023), se realizó un estudio que abarcó a 36 adultos seropositivos para CMV (un total de 236 muestras) con neoplasias hematológicas tratadas con small molecule inhibitors (dasatinib, venetoclax y ruxolitinib). Para establecer la frecuencia de la ADNemia por CMV en esta cohorte de pacientes, monitorizamos la carga viral de CMV los días +0, +15, +30, +45, +60, +75, +90, +120, +150 y +180 tras inicio de estas terapias, usando una PCR a tiempo real de idéntica manera a la empleada en el primer trabajo publicado.

Para la cuantificación de la respuesta de las células T específicas de CMV, así como de las células T reguladoras en esta cohorte de pacientes, y de manera similar a la anterior publicación, se hizo uso de las muestras pertenecientes a los días +0, +30, +60, +90, +120, +150 y +180 y realizamos ensayos de ICS y citometría de flujo, de acuerdo con lo descrito previamente.

En la **tercera** publicación (Solano de la Asunción, C. Clin Microbiol Infect. Aug 2023) se incluyó a 51 pacientes seropositivos para CMV en terapia CAR-T CD19, con una mediana de edad de 62 años (rango 22-79). En esta serie, ningún paciente recibió profilaxis contra el CMV. Se recolectó una mediana de seis muestras de plasma por paciente (rango 2-7) en los días +0, +7, +14, +21, +30, +60, y +90 después de la perfusión para monitorizar la ADNemia por CMV. Las muestras se conservaron a -80°C hasta el momento de su análisis y posteriormente se analizaron mediante ensayos de PCR en tiempo real.

En la **cuarta** publicación (Solano de la Asunción, C. J Med Virol Jul 2023) de esta tesis por compendio participaron 41 pacientes adultos seropositivos al CMV con neoplasias hematológicas malignas tratados con ibrutinib (20 pacientes) o ruxolitinib (21 pacientes) pertenecientes a cinco hospitales terciarios españoles. Se analizaron un total de 236 muestras de plasma de pacientes tratados con ibrutinib y 188 de pacientes tratados con ruxolitinib, con una mediana de 10 muestras (3-10) por paciente.

Las cargas plasmáticas de ADN del TTV y el CMV se cuantificaron mediante PCR en tiempo real los días +0, +15, +30, +45, +60, +75, +90, +120, +150 y +180 tras haber sido iniciado el tratamiento. Asimismo, la respuesta inmune específica frente a CMV fue cuantificada mediante ICS y citometría de flujo.

A las muestras con ADN de TTV indetectable se les asignó un valor de 0 para el análisis, y todas las muestras de cada paciente se analizaron simultáneamente en unidades individuales.

## **II. Cuantificación de ADN de CMV en plasma**

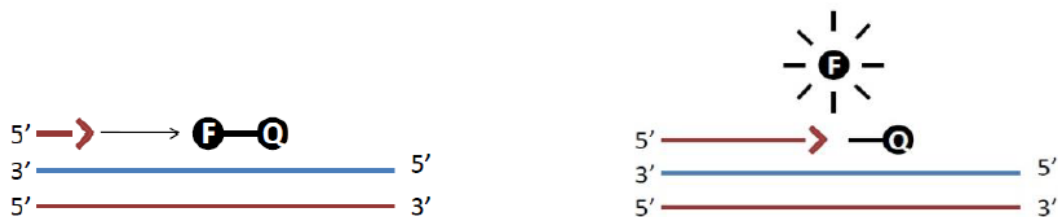
La técnica común empleada para determinar la carga viral del CMV en todos los estudios fue un ensayo de PCR de alta sensibilidad en tiempo real. Concretamente, se empleó el ensayo de PCR para el CMV RealTime del laboratorio Abbott Molecular (RealTime CMV PCR; Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA), según descrito anteriormente (135).

En el caso del tercer estudio se utilizaron dos ensayos de PCR diferentes en dos centros: PCR del CMV a tiempo real (Abbott Molecular) en una plataforma m2000rt en el Hospital Clínico Universitario de Valencia, y la plataforma ARGENE CMV-R GENE (Biomerieux) realizado en StepOne, Rotor-Gene Q, CFX96 (BioRad) en el Hospital Universitario Politécnico La Fe de Valencia.

Los ensayos contaron con diferentes límites de detección: el ensayo de Abbott detectó 31,2 UI/ml mientras que el ensayo de Biomerieux tuvo un límite de detección de 190 UI/ml.

### III. Cuantificación de ADN de TTV en plasma

La determinación de la carga viral de TTV se llevó a cabo mediante PCR cuantitativa en tiempo real, según lo previamente descrito (136) y empleando la plataforma TaqMan de Applied Biosystems (Foster City, CA, EE. UU.). Este sistema se basa en sondas marcadas con un fluoróforo y un quencher: durante la síntesis del ADN diana, la polimerasa escinde la sonda, liberando el fluoróforo y generando una señal proporcional a la cantidad de producto amplificado, tal y como se muestra a continuación:



La PCR se orientó a un fragmento de la región UTR del genoma viral, elegido por su elevada conservación entre todas las especies de TTV. (137)(138)(139).

Los primers y la sonda utilizada para la cuantificación del virus son los siguientes:

**Tabla IV-2. descripción de la sonda y los primers empleados para la cuantificación de TTV**

| Sonda y primers | Posición | Secuencia de oligonucleótidos        |
|-----------------|----------|--------------------------------------|
| AMTS Forward    | 177–194  | 5' -GTGCCGIAGGTGAGTTTA-3'            |
| AMTAS Reverse   | 226-239  | 5' -AGCCCGGCCAGTCC-3'                |
| AMTPTU TaqMan   | 205-223  | 5' FAM -TCAAGGGGCAATTCGGGCT-TAMRA-3' |

La extracción de ADN se realizó a partir de 200 µl de plasma empleando el kit NucliSENS® en la plataforma automatizada easyMAG® (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia), siguiendo las indicaciones del fabricante, en el último de los trabajos publicados (Solano de la Asunción et al., J Med Virol, jul 2023). El método aprovecha la afinidad del ADN por una membrana de sílice en condiciones iónicas específicas, ajustadas mediante tampón de pH. Tras una digestión inicial con proteinasa K (una serina-proteasa derivada de Tritirachium álbum) para liberar el material genético, la purificación se completa en cuatro etapas secuenciales: unión a la sílice, dos lavados

y, finalmente, elución del ADN.

Mediante la purificación en membrana de sílice se obtiene, en promedio, 6 µg de ADN total a partir de 200 µl de plasma, concentrados finalmente en 60 µl de eluido. En cambio, la tecnología BOOM empleada por NucliSENS® recurre a partículas magnéticas de sílice para realizar lisis, fijación, lavados y elución en un único pocillo, ofreciendo un procedimiento análogo al descrito, pero con un flujo de trabajo simplificado.

Para la amplificación y detección de los amplicones de TTV se utilizó el sistema ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.). En cada reacción, 5 µl del eluido se incorporan a una mezcla de 20 µl preparada con los componentes que se detallan en la tabla siguiente:

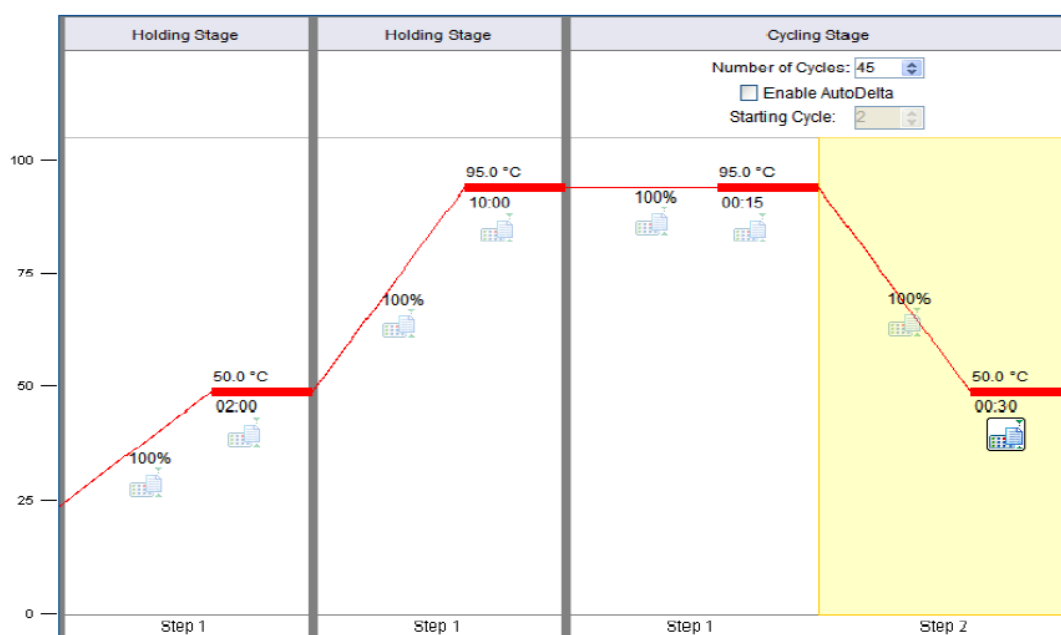
**Tabla IV-3. Composición de la mezcla de reacción utilizada en la PCR del ensayo**

| Componente                                                   | Concentración (µl) |
|--------------------------------------------------------------|--------------------|
| <b>Universal Master Mix II, with UNG (Applied Biosystem)</b> | 10                 |
| <b>Primer AMTS</b>                                           | 0,9                |
| <b>Primer AMT-AS</b>                                         | 0,9                |
| <b>Probe AMTP</b>                                            | 0,04               |
| <b>H<sub>2</sub>O</b>                                        | 8,2                |

El protocolo de amplificación consistió en una PCR bifásica repetida durante 45 ciclos:

- Desnaturalización a 95 °C por 15 segundos
- Hibridación/extensión a 50 °C por 30 segundos

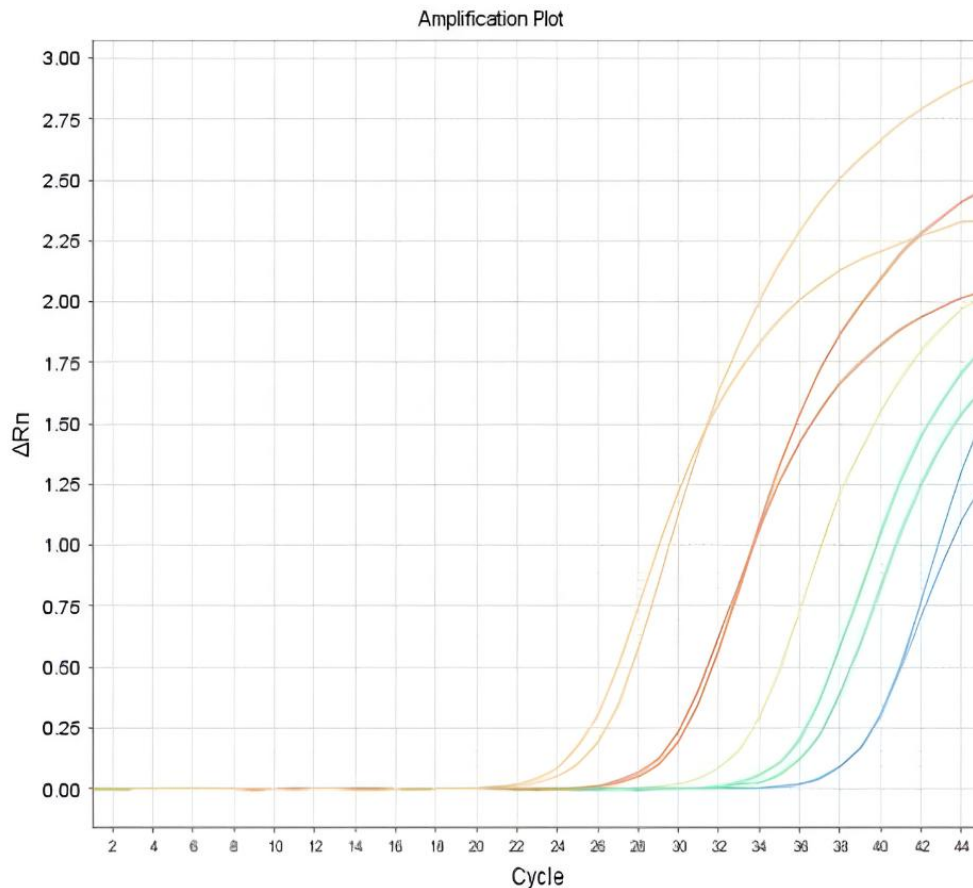
Ambas fases se precedieron de una desnaturalización inicial en dos pasos: incubación a 50 °C durante 2 minutos seguida de desnaturalización a 95 °C durante 10 minutos, tal como se muestra a continuación:



La cuantificación, en número de copias por mililitro de muestra, se obtuvo extrapolando el valor de (Cycle Threshold) de cada una de las muestras en una recta de calibrado. La recta de calibrado se calculó mediante un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados de un conjunto de estándares de concentración conocida obtenidos por diluciones seriadas 1/10 partiendo de la concentración inicial de 106 copias/ml.

Se empleó como estándar un plásmido de concentración conocida, obtenido mediante PCR anidada y que contenía la región amplificada con los cebadores AMTS y AMTAS, clonado en el vector PCR 2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA), según lo descrito previamente por el doctor Fabrizio Maggi (137).

En nuestra experiencia, el ensayo presentó un límite de cuantificación cercano a 25 copias/ml y un límite de detección de aproximadamente 10 copias/ml (con un 75% de repetibilidad). A las muestras con carga viral de TTV indetectable se les asignó un valor de 0 para los análisis estadísticos. Todas las muestras de cada paciente se procesaron simultáneamente en singlete.



**Figura IV-1.** Curvas de amplificación de correspondientes a una recta de calibrado entre las concentraciones de  $10^6$  hasta  $10^2$  copias.

---

#### **IV. Recuento de linfocitos totales**

El cuarto estudio planteó entre sus objetivos investigar la posible correlación entre la carga viral de TTV y el recuento absoluto de linfocitos (ALC), así como los recuentos específicos de células T CD4+ y T CD8+. Para ello, se procedió a la cuantificación de los linfocitos totales mediante realización de hemograma sobre sangre total, obteniendo posteriormente estos datos registrados durante la práctica clínica habitual. Este procedimiento se realizó conforme a los protocolos establecidos y validados por el centro.

#### **V. Monitorización virológica y manejo de la infección por CMV**

La monitorización de las cargas de ADN del CMV se realizó al menos una vez a la semana en todos los estudios incluidos mediante los métodos descritos

previamente.

En todos los estudios se implementó un enfoque preventivo de enfermedad por CMV, el cual se planteó en caso de alcanzarse un umbral viral de 1.000 UI/ml (o 1.500 UI/ml, al menos en el caso del HCUV) en muestra de plasma, o bien (en el caso del HCUV) cuando el tiempo de duplicación ( $t_d$ ) del ADN viral fuera igual o inferior a dos días. Este parámetro corresponde al período que tarda el ADN viral en duplicarse y es característico de cada episodio de infección activa. Asimismo, refleja la velocidad de replicación del virus y está influenciado tanto por las propiedades del propio virus como por las condiciones del huésped. El cálculo del tiempo de duplicación fue realizado de manera sistemática por el servicio de microbiología al inicio de cada episodio de replicación viral, siempre que se cumplieran determinados criterios cinéticos descritos en la literatura científica (140)(141)(142).

De forma resumida, el tiempo de duplicación ( $dt$ ) se estimó utilizando la siguiente fórmula:  $dt = (t_2 - t_1) \times [\ln 2 / \ln(q_2/q_1)]$ , donde  $q_1$  y  $q_2$  corresponden a las cargas plasmáticas de ADN de CMV (expresadas en UI/ml) en la primera y segunda medición positiva, respectivamente, y  $(t_2 - t_1)$  representa el intervalo de tiempo, en días, entre ambas determinaciones. Solo se consideraron para el análisis aquellos episodios en los que se observó un incremento igual o superior a tres veces entre las dos primeras cargas virales.

Cabe destacar que, a lo largo del periodo de seguimiento de los cuatro estudios, no fue necesario aplicar esta estrategia en ningún caso, ya que no se alcanzaron los criterios predefinidos en ninguno de los pacientes incluidos.

## **VI. Monitorización de la respuesta inmune específica frente a CMV**

Para la determinación en sangre total de los linfocitos T CD4+ y CD8+ productores de IFN- $\gamma$  específicos de CMV se hizo uso de técnicas de citometría de flujo mediante la plataforma FACSCalibur junto al Software CellQuest (BD Biosciences Immunocytometry Systems, San Jose, CA). El procedimiento se basó en la técnica de tinción de citoquinas intracelulares, utilizando el kit BD FastImmune (Becton, Dickinson and Company, San José, CA, EEUU), siguiendo una metodología previamente descrita en la literatura especializada (143)(144).

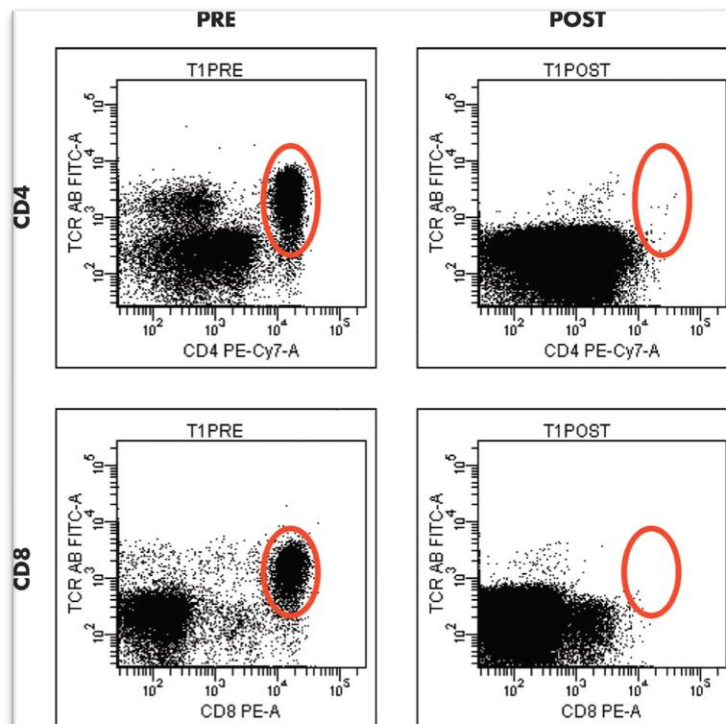
De forma general, el procedimiento puede resumirse del siguiente modo: empleando 500 µl de sangre total, anticoagulada con heparina sódica, los linfocitos T del paciente fueron estimulados mediante exposición a dos antígenos altamente inmunogénicos del CMV, pp65 e IE-1, a concentración de 1 µg/ml/péptido (JPT Peptide Technologies GmbH, Berlín, Alemania), en presencia de las moléculas CD28 (receptor coestimulador) y CD49 (molécula de adhesión), durante un período de 6 horas a 37°C. Este proceso se llevó a cabo en condiciones controladas, incluyendo la adición de Brefeldina A (eBioscience), un inhibidor del transporte intracelular de proteínas, con el fin de permitir la acumulación de citocinas en el interior celular.

Una vez completada la estimulación, los hematíes fueron lisados utilizando la solución FACS Lysing Solution 10x (BD-Becton Dickinson, San José, CA), y las muestras se conservaron a -80 °C hasta su análisis posterior. Antes de proceder a la tinción, las células fueron descongeladas, permeabilizadas con la solución Permeabilizing Solution 2 (BD-Becton Dickinson, San José, CA). y posteriormente marcadas mediante anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos específicos frente a CD3, CD8, CD4 e INF-γ.

Mediante citometría de flujo, se definieron regiones específicas de interés dentro de los diagramas de dispersión, empleando anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos específicos frente a determinadas proteínas intracelulares como, por ejemplo, TNF-α, IL-2, MIP1-β, CD107a, así como IFN-γ, o bien determinadas proteínas de superficie, como CD27, CD28, CCR7, CD62L. De esta forma, podía llegarse a la identificación de las diversas subpoblaciones linfocitarias, expresadas en % o en células/µl, como son las células CD3, CD4, CD8 y aquellas productoras de INF-γ. En primer lugar, y gracias a su forma y tamaño, se seleccionaron los linfocitos, a continuación, se identificaron las células positivas para CD3 y, subsiguientemente, CD8 o CD4. A continuación y a partir de éstas, se identificaron aquellas que expresaban INF-γ intracelular, lo cual permitió cuantificar la respuesta funcional específica frente a CMV.

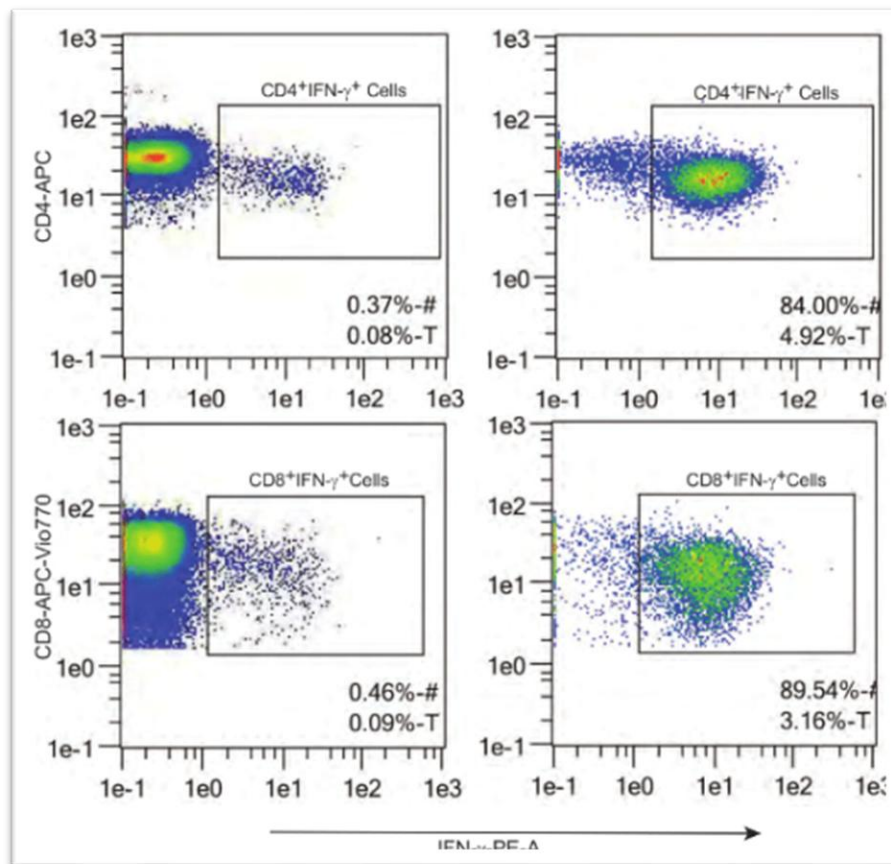
En este contexto, es fundamental distinguir entre los conceptos de plot y gating, ambos esenciales para el tratamiento e interpretación de los datos obtenidos (137).

El término plot hace referencia a la representación gráfica de los eventos celulares adquiridos, generalmente en forma de dot plots o histogramas, donde se visualiza la distribución de las células en función de uno o varios marcadores fluorocromados. Estos gráficos permiten observar las características fenotípicas y de las poblaciones celulares analizadas, como puede observarse en la figura IV-1, correspondiente a la imagen prototípica obtenida mediante esta imagen:



**Figura IV-2.** Diagrama de dispersión o *dot plot* mostrando la distribución de poblaciones celulares. Cada punto representa una célula individual y las distintas regiones indican diferentes subpoblaciones, quedando las células que expresan marcadores CD4 o CD8 en la región enmarcada por los círculos rojos.

Por su parte, el gating consiste en la aplicación de estrategias analíticas mediante las cuales se definen y seleccionan subpoblaciones celulares específicas dentro de los plots. Estas compuertas se establecen con base en parámetros como la dispersión de la luz [forward scatter component (FSC/ side scatter component (SSC)] y la expresión de moléculas de superficie o intracelulares, lo cual permite excluir eventos irrelevantes (como detritos, células muertas o dobletes) y focalizar el análisis en las poblaciones de interés, tales como los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> o aquellos productores de citoquinas específicas frente a CMV. La figura IV-3 ilustra dicha técnica:



**Figura IV-3.** Técnica de *gating* utilizada para la identificación secuencial de poblaciones celulares específicas. Los rectángulos o polígonos indican las regiones seleccionadas en cada paso, permitiendo excluir detritos, células muertas y seleccionar subpoblaciones de interés basadas en parámetros como FSC/SSC y expresión de marcadores fluorocromados

La combinación secuencial de plots y gating ha sido, por tanto, esencial para una caracterización precisa y reproducible de la inmunidad celular específica evaluada en este estudio.

El análisis se inicia eliminando los restos celulares o debris en el diagrama de puntos de FSC vs SSC y los dobletes en el diagrama de forward scatter component-height (FSC-H) vs forward scatter component-area (FSC-A). A continuación, se seleccionan los linfocitos T en el diagrama de CD3 vs SSC.

El número absoluto de linfocitos T CD8 productores de INF- $\gamma$  específico frente a CMV se obtuvo de la multiplicación del porcentaje de los linfocitos totales por el

número absoluto de linfocitos que expresaron CD3+, y seguidamente, del subtipo CD8+. Las respuestas específicas tras la sustracción del background fueron aquellas superiores al 0,1%.

## **VII. Definiciones**

Se consideró como episodio de ADNemia de CMV a la presencia de ADN viral a cualquier nivel en una o más muestras sanguíneas (plasma o sangre total) consecutivas. Fueron requeridos dos resultados de PCR negativos (ADN de CMV indetectable) para considerar como resuelta una ADNemia por CMV. Los episodios recurrentes de ADNemia fueron aquellos que ocurrieron al menos 15 días después del aclaramiento del episodio anterior. Se consideraron como blips aquellas determinaciones positivas aisladas de detección de ADN de CMV, es decir, sin que posteriormente se obtenga un resultado positivo en la prueba de seguimiento inmediata. Estos episodios son transitorios y no indican una infección sostenida o recurrente por el CMV, ya que se resuelven espontáneamente sin necesidad de tratamiento antiviral.

Los episodios caracterizados como clínicamente significativos fueron aquellos cuyos pacientes fueron tratados con antivirales como valganciclovir o foscarnet como tratamiento anticipado (PET), no necesitando dicho tratamiento ningún paciente incluido en nuestros estudios.

Para la consideración de enfermedad de órgano diana por CMV, se hizo uso de las definiciones incluidas en guías para el manejo de la infección por CMV, European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL7) (145).

Los patrones cinéticos de la carga viral de TTV establecidos en el cuarto artículo publicado (Solano de la Asunción, C. J Med Virol. 2023 Jul), fueron clasificados como ascendentes o descendentes en función de la variación de dicha carga entre las muestras previa y posterior al inicio del tratamiento con small molecular inhibitors. La variación mínima de la carga viral de TTV para establecer una cinética ascendente o descendente fue de  $> 0,5 \log_{10}$  copias/ml.

## **VIII. Recolección, almacenamiento y gestión de los datos**

Los datos referentes a los pacientes, así como los detalles del procedimiento, las complicaciones, la evolución y los datos de los diferentes laboratorios se recogieron de manera prospectiva. La información fue sistemáticamente introducida y actualizada periódicamente en una base de datos (Microsoft Office®) creada para este propósito. Los datos de interés para el propósito de esta tesis fueron seleccionados mediante una consulta SQL y exportados a SPSS® y GraphPad® para su análisis estadístico.

## **IX. Análisis estadístico**

Las comparaciones entre medias y medianas se realizaron utilizando la prueba de T-Student y U de Mann-Whitney, respectivamente. Para las muestras relacionadas hicimos uso del test de Wilcoxon. Para evaluar la relación entre variables cuantitativas continuas, se emplearon los coeficientes de correlación de Pearson o Spearman, seleccionados en función de la distribución de los datos, dependiendo de si esta era paramétrica o no paramétrica. La identificación de factores de riesgo asociados a determinados eventos clínicos se llevó a cabo mediante un análisis de regresión de Cox, tanto en su modalidad univariante como multivariante.

Las diferencias entre grupos en la incidencia acumulada se analizaron mediante la prueba de log-rank. Adicionalmente, el área bajo la curva (AUC) de los valores plasmáticos de ADN de TTV se determinó a través del método de los trapecios. Se reportaron valores de P bivariados, considerando estadísticamente significativos aquellos inferiores o iguales a 0,05. Todos los análisis estadísticos fueron efectuados con el software SPSS versión 20.0 (SPSS, Chicago, IL, EE. UU

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



Los resultados que se presentan a continuación se exponen, en la medida de lo posible, según el orden de publicación en el que se fueron obteniendo. La consecución de los dos primeros objetivos motivó la búsqueda de otras terapias innovadoras cuyos pacientes pudieran beneficiarse de la monitorización de la ADNemia por CMV, fijando nuestra atención para el tercer artículo en la terapia CAR-T, cuyo enfoque innovador ha revolucionado en los últimos tiempos el tratamiento de varias neoplasias hematológicas. Por último, la monitorización de la carga viral de TTV ha abierto un nuevo horizonte en la predicción de eventos adversos en el contexto del trasplante, tanto de órgano sólido como de progenitores hematopoyéticos, por lo cual decidimos investigar, en el cuarto artículo, su potencial utilidad predictiva, especialmente en cuanto a la reactivación del CMV y la enfermedad orgánica producida por el mismo.

### **I. Estudio de la dinámica de la ADNemia y respuesta inmune de células T frente al citomegalovirus y en pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC) en tratamiento con ibrutinib**

El conjunto de resultados que se exponen a continuación corresponde al primer trabajo publicado (Solano de la Asunción, C. Br J Haematol. 2021 Nov).

#### **I.1. Presencia e impacto de la ADNemia de CMV en pacientes con LLC en tratamiento con ibrutinib**

En este estudio observacional multicéntrico se evaluaron la tasa y la cinética de la ADNemia por CMV, así como la evolución prospectiva de la inmunidad mediada por células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicas frente a CMV, durante un periodo de seis meses en 23 pacientes adultos consecutivos con leucemia linfocítica crónica (LLC) seropositivos para CMV [edad media (rango), 69 (48–86) años; 16 varones] tratados con ibrutinib en monoterapia (Tabla V-1).

Se monitorizó la carga de CMV en plasma en el día 0 (inicio de tratamiento) y posteriormente en los días +15, +30, +45, +60, +75, +90, +120, +150 y +180. La ADNemia plasmática fue detectada en 7 de los 23 pacientes (30,4 %) entre los días 15 y 45 tras el inicio del tratamiento, con solo un caso detectable en el día 0. En 5 de estos 7 pacientes (71,4 %), la viremia correspondió a blips transitorios, sin que ninguna carga superara las 210 UI/ml.

Cabe destacar que la mayoría de los pacientes con ADNemia (7/8) no habían recibido quimioterapia previa. Todos los episodios se resolvieron espontáneamente, sin progresión a enfermedad por órgano diana ni recurrencias durante el seguimiento.

### **I.2. Respuesta inmune T-específica frente a CMV en pacientes con leucemia linfocítica crónica en tratamiento con ibrutinib**

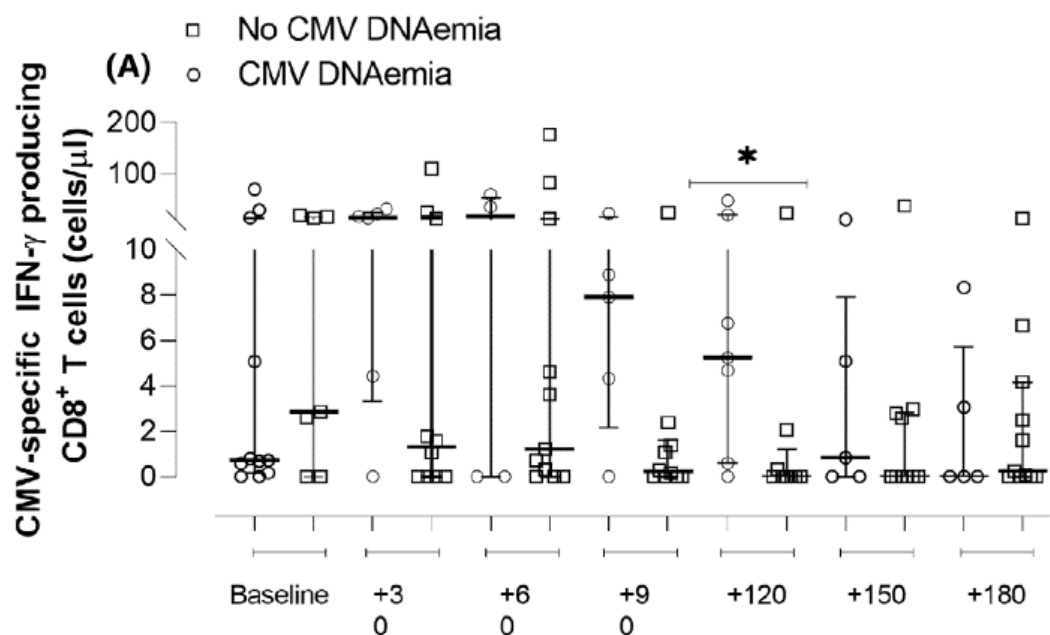
Acorde a lo esperable, en el punto inicial de seguimiento (día +0), 19 de los 23 pacientes presentaban inmunidad detectable de células T específicas frente a CMV (CD8+, CD4+ o ambas), una cifra cercana a la encontrada en individuos sanos seropositivos frente al CMV (59), lo que sugiere la existencia de una inmunidad T específica conservada frente al CMV en pacientes con LLC, en concordancia con estudios previos. La aparición de ADNemia por CMV, sin embargo, no pudo anticiparse sobre la base del recuento basal de células T específicas de CMV (la tasa y la magnitud de los dos subconjuntos de células T fueron similares en pacientes que desarrollaron o no ADNemia por CMV).

A pesar de las fluctuaciones observadas a lo largo del tiempo en el porcentaje de pacientes que presentaron respuestas detectables de células T específicas frente al CMV, dichas respuestas fueron consistentemente menores al final del periodo de seguimiento (Figuras V-1 y V-2). Los valores pico medianos de IFN- $\gamma$  en células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> específicas de CMV fueron más elevados en los pacientes que presentaron ADNemia previa por CMV, en comparación con aquellos en los que no se detectó replicación viral, aunque esta diferencia no alcanzó significación estadística. Además, se evidenció una expansión de células T CD8<sup>+</sup> específicas de CMV (y, en menor medida, de células T CD4<sup>+</sup>) tras la detección de ADNemia por CMV en seis de los ocho pacientes evaluados (Figura V-3).

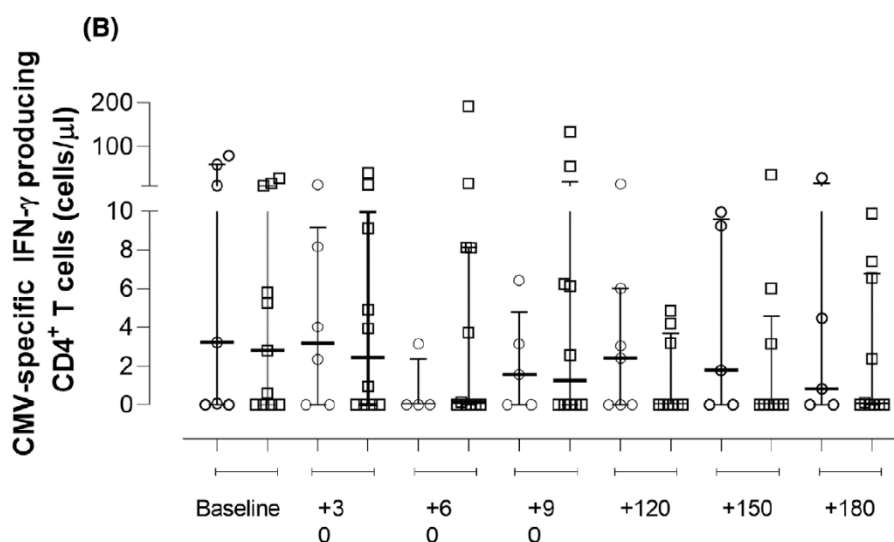
**Tabla V-1.** Características demográficas, clínicas, virológicas e inmunológicas de los pacientes incluidos en el estudio.

| Código del paciente | Edad, años | Sexo | Tratamiento previo                                                 | ADNemia por CMV (día de detección tras inicio de ibrutinib) | Carga máxima de CMV en UI/ml (día tras inicio de ibrutinib) | CMV blip | Recuento de células T-CD8 <sup>+</sup> en el día 0, células/ $\mu$ l | Recuento de células T-CD4 <sup>+</sup> en el día 0, células/ $\mu$ l |
|---------------------|------------|------|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|----------|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| 1                   | 83         | M    | Bendamustina                                                       | No                                                          |                                                             |          | 0.59                                                                 | 5.27                                                                 |
| 2                   | 57         | H    | No                                                                 | Sí (30)                                                     | 31 (30)                                                     | Sí       | 19.27                                                                | 0                                                                    |
| 3                   | 55         | M    | No                                                                 | No                                                          |                                                             |          |                                                                      |                                                                      |
| 4                   | 49         | H    | No                                                                 | No                                                          |                                                             |          |                                                                      |                                                                      |
| 5                   | 69         | H    | No                                                                 | Sí (45)                                                     | 31 (45)                                                     | Sí       | 15.93                                                                | 10.11                                                                |
| 6                   | 72         | H    | No                                                                 | No                                                          |                                                             |          | 0                                                                    | 0                                                                    |
| 7                   | 86         | H    | Clorambucilo + Bendamustina                                        | No                                                          |                                                             |          | 0.73                                                                 | 27.78                                                                |
| 8                   | 48         | H    | No                                                                 | No                                                          |                                                             |          |                                                                      |                                                                      |
| 9                   | 78         | M    | Ciclofosfamida + rituximab                                         | Sí (45)                                                     | 41 (45)                                                     | Sí       |                                                                      |                                                                      |
| 10                  | 55         | H    | Esquema R-CHOP/rituximab/clorambucilo + prednisona                 | No                                                          |                                                             |          | 0.80                                                                 | 15.61                                                                |
| 11                  | 69         | M    | Bendamustina/obinotuzumab                                          | No                                                          |                                                             |          |                                                                      |                                                                      |
| 12                  | 65         | H    | Fludarabina + ciclofosfamida + rituximab/bendamustina              | No                                                          |                                                             |          | 0                                                                    | 0                                                                    |
| 13                  | 66         | H    | No                                                                 | Sí (15)                                                     | 165 (15)                                                    | No       | 0                                                                    | 3.22                                                                 |
| 14                  | 84         | H    | No                                                                 | Sí (45)                                                     | 31 (45)                                                     | Sí       | 13.47                                                                | 59.18                                                                |
| 15                  | 76         | H    | Fludarabina + ciclofosfamida + rituximab/bendamustina/obinotuzumab | No                                                          |                                                             |          |                                                                      |                                                                      |
| 16                  | 68         | H    | No                                                                 | Sí (30)                                                     | 31 (30) y 206 (90)                                          | Sí/No    | 26.10                                                                | 0.07                                                                 |
| 17                  | 53         | H    | No                                                                 | No                                                          |                                                             |          | 69.97                                                                | 5.80                                                                 |
| 18                  | 84         | M    | No                                                                 | Sí (0)                                                      | 31 (0)                                                      | Sí       | 2.87                                                                 | 79.14                                                                |
| 19                  | 66         | H    | No                                                                 | No                                                          |                                                             |          | 14.20                                                                | 2.80                                                                 |
| 20                  | 76         | H    | No                                                                 | Sí (30)                                                     | 31 (30)                                                     | Sí       | 0                                                                    | 0                                                                    |
| 21                  | 82         | M    | Fludarabina + ciclofosfamida + rituximab                           | No                                                          |                                                             |          | 0.18                                                                 | 0.61                                                                 |
| 22                  | 73         | H    | Bendamustina/rituximab                                             | No                                                          |                                                             |          | 5.08                                                                 | 10.09                                                                |
| 23                  | 54         | M    | No                                                                 | No                                                          |                                                             |          | 29.57                                                                | 0                                                                    |

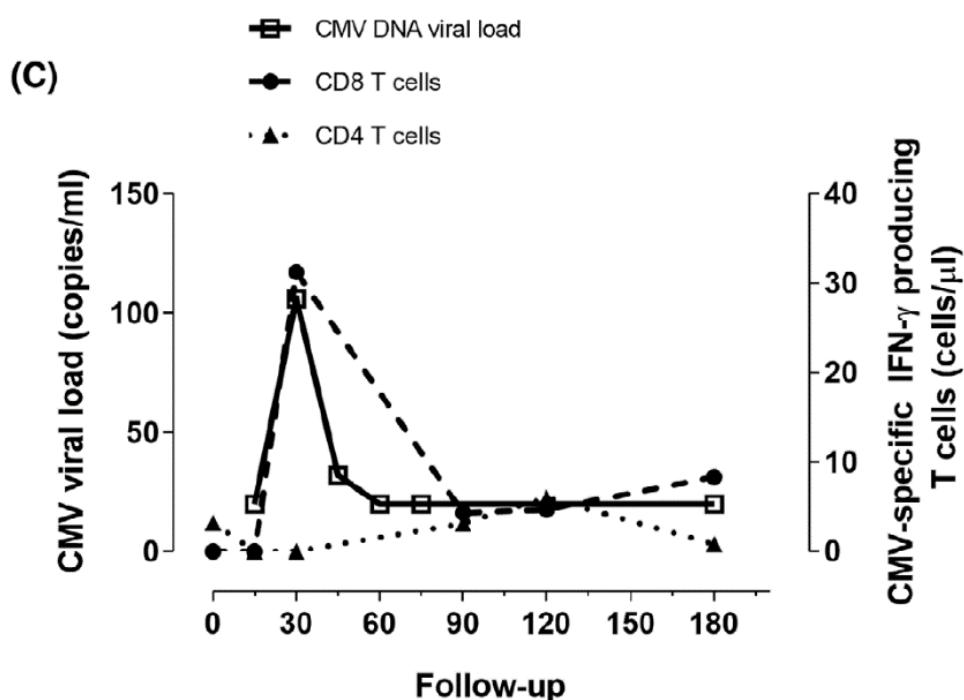
**Abreviaturas:** M, mujer; H, Hombre; CMV, citomegalovirus; UI, unidades internacionales; ml, mililitros.



**Figura V-1.** Linfocitos T-CD8<sup>+</sup> productores de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) específicos de citomegalovirus (CMV; pp65/IE-1) en nivel basal y en distintos momentos tras el inicio del tratamiento con ibrutinib.



**Figura V-2.** Linfocitos T-CD4<sup>+</sup> productores de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) específicos de citomegalovirus (CMV; pp65/IE-1) en nivel basal y en distintos momentos tras el inicio del tratamiento con ibrutinib.



**Figura V-3.** Relación entre la expansión de inmunidad T-específica frente a CMV, la carga viral por CMV y el seguimiento en el tiempo. Puede observarse en la imagen que la aparición de ADNemia por CMV se asoció con una expansión de células T específicas del CMV, que involucraron principalmente células T CD8+. Como hemos indicado previamente, solo se alcanzó significación estadística respecto a las diferencias entre las medianas para las células T CD8+ específicas del CMV enumeradas el día 120 después de la administración de ibrutinib.

### I.3. Discusión

Sobre la base de la ya establecida relación entre el tratamiento con ibrutinib y un incremento en la incidencia de infecciones oportunistas (especialmente en los meses 6 a 12 postrasplante)(146)(147)(148) quisimos investigar la biología del CMV y sus efectos deletéreos en estos pacientes. En nuestra opinión, este es un tema relevante para explorar a la luz de la, asimismo, bien establecida asociación entre la ADNemia del CMV y el aumento de la mortalidad general en los receptores de TPH alogénico (149), pudiendo ser de potencial utilidad en otros entornos clínicos

Mediante el uso de tinción de tetrámeros de péptidos de antígeno leucocitario humano (HLA) y estimulación con péptidos virales, logramos documentar una disminución en la frecuencia de células T específicas frente a CMV durante el tratamiento con ibrutinib, aunque la capacidad de las células T específicas del CMV para secretar IFN- $\gamma$  y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) tras estimulación antigénica pareció aumentar.

Los hallazgos presentados en este estudio se alinean parcialmente con los de investigaciones previas que han evaluado las respuestas inmunológicas frente al CMV en pacientes tratados con ibrutinib (150). Si bien nuestros datos actuales coinciden hasta cierto punto con los de este trabajo, el momento de la evaluación inmunológica tras el inicio de ibrutinib varió significativamente entre ambos estudios (dentro de los 6 meses en el nuestro, y en una mediana de 21 meses en el suyo). Además, no se informaron datos virológicos, por lo que en este aspecto nuestro estudio aporta una nueva perspectiva en cuanto al impacto potencial de la ADNemia por CMV en las respuestas de células T específicas del CMV.

Nuestro estudio presenta limitaciones que deben considerarse al interpretar los resultados. En primer lugar, el reducido tamaño muestral restringe la generalización de los hallazgos. En segundo lugar, la disponibilidad limitada de muestras en distintos momentos impidió una caracterización más dinámica de la evolución de la respuesta inmune durante el tratamiento.

En resumen, la ADNemia por CMV constituye un evento relativamente frecuente en pacientes con LLC tratados con ibrutinib, si bien resuelve espontáneamente sin necesidad de terapia antiviral, y no conduce a enfermedad en órganos diana, al menos en nuestra serie actual. Aunque es especulativa, este perfil puede no diferir sustancialmente de aquellas de pacientes con LLC tratados con quimioterapia convencional, dados los resultados de un estudio previo en el que el 17% de los pacientes padecían infección activa por CMV documentada mediante monitorización de antigenemia pp65 (203), un método notablemente menos sensible que la PCR en tiempo real utilizada en el presente estudio (204). Además, nuestros datos actuales sugieren que, a pesar de una disminución en la frecuencia de respuestas detectables de células T específicas de CMV durante los primeros 6 meses después del inicio del tratamiento con ibrutinib, los pacientes son capaces de

expandir la celularidad T funcional (IFN- $\gamma$ ) específica de CMV ante un estímulo antigénico, lo que probablemente explica la breve duración de los episodios de ADNemia de CMV.

## **II. Análisis del impacto de la ADNemia y la inmunidad T en pacientes con neoplasias hematológicas en tratamiento con small molecule inhibitors**

El conjunto de resultados que se exponen a continuación corresponde al segundo trabajo publicado (Solano de la Asunción, C. Br J Haematol. 2023 Mar).

### **II.1. Presencia e impacto de la ADNemia de CMV en pacientes con neoplasias hematológicas en tratamiento con nuevas terapias**

En este estudio observacional prospectivo multicéntrico, reclutamos a 36 pacientes adultos ( $\geq 18$  años) seropositivos al CMV con neoplasias hematológicas (Tabla V-2) a quienes se les administró venetoclax ( $n = 8$ ; grupo 1), TKI BCR-ABL1 ( $n = 7$ ; grupo 2) o ruxolitinib ( $n = 21$ ; grupo 3) como terapia de primera línea o tras quimioterapia convencional entre enero de 2019 y enero de 2022 en el Hospital Clínico Universitario de Valencia ( $n = 15$ ), Hospital Politécnico Universitario La Fe, Valencia ( $n = 9$ ), Hospital Ramón y Cajal, Madrid ( $n = 5$ ), Hospital Vall d'Hebrón, Barcelona ( $n = 5$ ) y Hospital Morales Meseguer, Murcia ( $n = 2$ ). El periodo de estudio comprendió los primeros 180 días posteriores al inicio del tratamiento con estas moléculas.

La monitorización de la carga viral de CMV se llevó a cabo cada dos semanas hasta el día +90 tras iniciar el tratamiento, y de forma mensual hasta el día +180 haciendo uso del ensayo CMV RealTime CMV polymerase. chain reaction (PCR) (Abbott Molecular). Un total de 20/36 pacientes (55%) desarrollaron uno ( $n = 12$ ) o dos (recurrencias;  $n = 8$ ) episodios de ADNemia por CMV dentro del periodo del estudio, el primero de los cuales se produjo en una mediana de 30 días después del inicio del tratamiento (rango, 0-150) (Tabla 1). Tres pacientes presentaron ADNemia por CMV al inicio del seguimiento.

**Tabla V-2. Características demográficas, clínicas y virológicas de los pacientes incluidos en el estudio.**

| Código del paciente | Edad (años), sexo | Tratamiento administrado | Enfermedad subyacente | Tratamiento previo                               | ADNemia por CMV (día de detección tras inicio del tratamiento) | Carga máxima de la ADNemia por CMV en UI/ml (día tras inicio del tratamiento) |
|---------------------|-------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| 8                   | 57, M             | Venetoclax               | LLC                   | Bendamustina–rituximab                           | No                                                             |                                                                               |
| 2                   | 48, M             | Venetoclax               | LLC                   | Bendamustina–rituximab, ciclofosfamida–rituximab | No                                                             |                                                                               |
| 3                   | 81, H             | Venetoclax               | LLC                   | No                                               | Sí (30)                                                        | 126 (120)                                                                     |
| 4                   | 74, H             | Venetoclax               | LLC                   | Bendamustina–rituximab                           | No                                                             |                                                                               |
| 5                   | 71, M             | Venetoclax               | LLC                   | Bendamustina–rituximab                           | No                                                             |                                                                               |
| 6                   | 75, H             | Venetoclax               | LLC                   | Bendamustina–rituximab                           | No                                                             |                                                                               |
| 7                   | 49, H             | Venetoclax               | LLC                   | FCM–rituximab, bendamustina–rituximab            | No                                                             |                                                                               |
| 8                   | 79, H             | Venetoclax               | LLC                   | Bendamustina–rituximab                           | No                                                             |                                                                               |
| 9                   | 62, H             | Dasatinib                | LMC                   | No                                               | Sí (75)                                                        | 30 (90)                                                                       |
| 10                  | 52, H             | Dasatinib                | LMC                   | Imatinib                                         | No                                                             |                                                                               |
| 11                  | 66, M             | Bosutinib                | LMC                   | No                                               | Sí (baseline)                                                  | 22 (15)                                                                       |
| 12                  | 69, H             | Ponatinib                | LMC                   | No                                               | No                                                             |                                                                               |
| 13                  | 71, M             | Nilotinib                | LMC                   | No                                               | Sí (150)                                                       | 98 (150)                                                                      |
| 14                  | 62, H             | Dasatinib                | LMC                   | No                                               | Sí (15)                                                        | 88 (45)                                                                       |
| 15                  | 44, M             | Bosutinib                | LMC                   | No                                               | Sí (150)                                                       | 15 (150)                                                                      |
| 16                  | 65, M             | Ruxolitinib              | MFP                   | No                                               | No                                                             |                                                                               |
| 17                  | 69, H             | Ruxolitinib              | SMD                   | No                                               | No                                                             |                                                                               |
| 18                  | 81, M             | Ruxolitinib              | SMD                   | No                                               | Sí (15)                                                        | 23 (75)                                                                       |
| 19                  | 65, H             | Ruxolitinib              | PV                    | No (hidroxiurea, danazol)                        | No                                                             |                                                                               |
| 20                  | 55, H             | Ruxolitinib              | MFP                   | No                                               | Sí (30)                                                        | 27 (30)                                                                       |
| 21                  | 72, H             | Ruxolitinib              | MFP                   | No                                               | Sí (45)                                                        | Sí (45)                                                                       |
| 22                  | 68, M             | Ruxolitinib              | SMD                   | No                                               | Sí (45)                                                        | 26 (45)                                                                       |
| 23                  | 93, H             | Ruxolitinib              | PV                    | No (hidroxiurea)                                 | Sí (45)                                                        |                                                                               |
| 24                  | 47, H             | Ruxolitinib              | PV                    | No                                               | No                                                             |                                                                               |
| 25                  | 22, M             | Ruxolitinib              | MFP                   | No                                               | No                                                             |                                                                               |
| 26                  | 61, H             | Ruxolitinib              | MFP                   | No                                               | Sí (baseline)                                                  | 52 (baseline)                                                                 |
| 27                  | 59, M             | Ruxolitinib              | SDM                   | No                                               | Sí (90)                                                        | 50 (90)                                                                       |
| 28                  | 85, M             | Ruxolitinib              | SDM                   | No (hidroxiurea)                                 | No                                                             |                                                                               |
| 29                  | 71, M             | Ruxolitinib              | SMD                   | No                                               | Sí (15)                                                        | 182 (15)                                                                      |
| 30                  | 55, H             | Ruxolitinib              | MFP                   | No                                               | No                                                             |                                                                               |
| 31                  | 59, H             | Ruxolitinib              | LMC                   | No (hidroxiurea, danazol)                        | No                                                             |                                                                               |
| 32                  | 71, M             | Ruxolitinib              | PV                    | No                                               | No                                                             |                                                                               |
| 33                  | 67, H             | Ruxolitinib              | MFP                   | No                                               | Sí (60)                                                        | 22 (120)                                                                      |
| 34                  | 65, H             | Ruxolitinib              | MFP                   | No                                               | Sí (30)                                                        | 41 (180)                                                                      |
| 35                  | 86, M             | Ruxolitinib              | SMD                   | No (hidroxiurea)                                 | Sí (60)                                                        | 15 (60)                                                                       |
| 36                  | 66, M             | Ruxolitinib              | SMD                   | No (hidroxiurea)                                 | Sí (baseline)                                                  | 21 (baseline)                                                                 |

**Abreviaturas:** LLC, leucemia linfocítica crónica; LMC, leucemia mieloide crónica; CMV, citomegalovirus; M, mujer; H, hombre; SMD, síndrome mielodisplásico; MFP, mielofibrosis primaria; PV, policitemia vera.

De los 28 episodios detectados de ADNemia por CMV, 14, desarrollados en 12 pacientes, fueron blips. Todos los episodios resolvieron de forma espontánea.

Los pacientes sometidos a tratamiento con TKI BCR-ABL1 (5/7) y ruxolitinib (12/21) mostraron una mayor incidencia de ADNemia por CMV que los que recibieron venetoclax (1/8) ( $p = 0,04$ ). La mediana de la carga viral máxima de CMV fue comparable entre los distintos grupos ( $p = 0,29$ ) y en ningún caso fue superior a 182 UI/ml. Asimismo, ningún paciente desarrolló enfermedad de órgano diana por CMV.

### **II.2. Evaluación de la respuesta T a la infección por CMV en pacientes con neoplasias hematológicas bajo tratamiento con small molecule inhibitors**

A continuación, analizamos la respuesta de las células T-CD8+ y CD4+ productoras de IFN- $\gamma$  reactivas pp65/IE-1 en sangre total mediante citometría de flujo con tinción de citocinas intracelulares (ICS) y, asimismo, cuantificamos las células T-regs en los días +0, +30, +60, +90, +120, +150 y +180 después del inicio del tratamiento (59)(151).

Al inicio del seguimiento pudimos detectar respuesta celular T (CD4+, CD8+ o ambas) en todos los pacientes ( $n = 32$ ) a excepción de uno de ellos. Asimismo, también fue posible registrar respuesta T específica frente al CMV a lo largo del periodo de estudio en 28 de 32 de estos sujetos (87,5%). Pudimos identificar dos patrones relativamente distintivos a pesar de las amplias variaciones observadas entre los individuos y las fluctuaciones en las células T CD4+ y CD8+ específicas de CMV (Tabla V-2), que parecieron ocurrir independientemente de la terapia recibida por los pacientes. En primer lugar, los pacientes que recibieron tratamiento con inhibidores de BCR-ABL1 TKI presentaron recuentos más bajos de células T CD4+ específicas para CMV en comparación con aquellos tratados con venetoclax o ruxolitinib. Estas diferencias alcanzaron significación estadística durante los primeros dos meses tras la administración de la terapia. En segundo lugar, en los pacientes tratados con venetoclax o ruxolitinib se observó una tendencia a la disminución progresiva en los recuentos de células T CD4+ y CD8+ específicas para CMV, un patrón que no se observó en los tratados con inhibidores de BCR-ABL1 TKI. Nos parece relevante mencionar que las medianas de células T CD4+ y CD8+ específicas para CMV, evaluadas en los días +30, +60, +90, +120, +150 y +180, no

mostraron diferencias significativas en comparación con los valores iniciales en ninguno de los grupos analizados.

Seguidamente, quisimos evaluar la posibilidad de predecir la aparición de ADNemia por CMV basándonos en los recuentos de células T específicas para CMV; siendo este análisis únicamente factible en aquellos pacientes tratados con ruxolitinib. Los datos mostraron que los recuentos de células T CD4+ y CD8+ específicas para CMV en el momento basal y el día +30 no presentaron diferencias significativas entre los pacientes con o sin ADNemia por CMV posterior. Se obtuvieron datos de células T-regs de 185 muestras de sangre correspondientes a 32 pacientes, detectándose niveles cuantificables en todos los casos excepto en siete. Independientemente del grupo de tratamiento al que pertenecían los pacientes, los niveles de T-regs en sangre periférica variaron a lo largo del tiempo sin mostrar una asociación evidente con el tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento (Tabla V-2). Además, los niveles de T-regs fueron comparables entre los grupos en todos los puntos temporales analizados. Esto concuerda con los datos reportados en estudios previos (152)(153). En general, los niveles de T-regs no mostraron correlación con los recuentos de células T CD4+ específicas para CMV ( $p = 0.049$ ;  $p = 0.51$ ) ni con los de células T CD8+ específicas ( $p = 0.020$ ;  $p = 0.79$ ).

En resumen, la ADNemia del CMV constituyó un evento frecuente en pacientes tratados con TKI BCR-ABL1 y con ruxolitinib, en particular durante los primeros dos meses tras el inicio del tratamiento. Por el contrario, se observó con menor frecuencia en aquellos tratados con venetoclax, lo que podría indicar un impacto más significativo de los dos primeros fármacos sobre las respuestas inmunitarias de las células T en comparación con el último. Aunque los TKI BCR-ABL1 y el ruxolitinib parecen tener un efecto adverso sobre las respuestas de las células T específicas para el CMV, este efecto aparenta no ser lo suficientemente fuerte como para impedir el control eventual de la replicación del virus. De hecho, ninguno de los pacientes de nuestra serie desarrolló enfermedad orgánica asociada al CMV. Asimismo, nuestros datos sobre la inmunidad específica de las células T frente al CMV respaldan esta hipótesis.

De manera coherente con estos resultados, un estudio previo encontró que aproximadamente el 50% de los pacientes tratados con ruxolitinib durante menos de

cinco años, y cerca del 90% de los tratados por más de cinco años, mostraron respuestas de células T específicas para el CMV (evaluadas mediante el ensayo ELISPOT para IFN- $\gamma$ ) por debajo del rango normal; sin embargo, menos del 10% de estos pacientes presentaron ADN del CMV detectable.

Este estudio cuenta con la limitación del tamaño reducido de la muestra, lo que otorga al estudio un carácter exploratorio. Además, no se evaluaron otras respuestas funcionales de las células T específicas para el CMV diferentes a las dirigidas contra IE1 y pp65, que conducen a la secreción de IFN- $\gamma$ . Por último, el esquema de monitorización de ADN del CMV y la falta de muestras disponibles en varios puntos temporales podrían haber llevado a que algunos episodios de ADN del CMV no fueran detectados.

Como conclusión, y especialmente desde una perspectiva clínica práctica, nuestros datos no justifican la monitorización sistemática del ADN del CMV en sangre en estos pacientes. Sin embargo, debería investigarse a fondo si la presencia de ADN del CMV en estos pacientes podría mediar efectos "indirectos", como los observados en el contexto del TPH alogénico.

### **II.3 Discusión**

A día de hoy contamos en el arsenal del tratamiento de diversas neoplasias hematológicas con una serie de medicamentos conocidos como small molecule inhibitors (154). Estas moléculas incluyen a los inhibidores de la proteína 2 del linfoma de células B antiapoptótico (venetoclax), los inhibidores múltiples de la tirosina quinasa (TKI) (por ejemplo, dasatinib) y los inhibidores de la vía del transductor de señales y activador de la transcripción (STAT) de la quinasa Janus (JAK) intracelular (es decir, ruxolitinib). Hasta la actualidad, se han reportado infecciones en frecuencias variables y por diversos microorganismos en pacientes tratados con estos fármacos (147). Sin embargo, existe escasa evidencia acerca de cómo estos tratamientos impactan en la inmunobiología de la infección por CMV. De esta forma, se han llegado a reportar, en este contexto, casos aislados de enfermedad por órgano diana, incluyendo retinitis, colitis y neumonitis (152)(153)(154).

En el contexto actual del tratamiento de las diversas neoplasias hematológicas, cada vez es más frecuente el uso de agentes inhibidores

moleculares, como el venetoclax, los inhibidores de la tirosina quinasa (TKI) BCR-ABL1 y el inhibidor de JAK, ruxolitinib. Estos fármacos, conocidos por su especificidad y potencia, han demostrado importantes beneficios terapéuticos. Sin embargo, su impacto en la inmunobiología de la infección por citomegalovirus (CMV) sigue siendo un área de investigación activa. En la realización de este estudio, tratamos de sintetizar los hallazgos de estudios recientes, para dilucidar los efectos de estos tratamientos en las respuestas inmunitarias específicas del CMV.

En nuestro estudio participaron 36 pacientes adultos seropositivos para el CMV con neoplasias hematológicas malignas, a quienes se les administró venetoclax, dasatinib o ruxolitinib. El objetivo principal fue observar la aparición de la anemia por CMV en los diferentes grupos de tratamiento. Se observó que los niveles de T-reg<sup>s</sup> fluctuaban con el tiempo sin que hubiera una asociación clara con el tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento, y estos niveles fueron comparables en todos los grupos.

De forma destacable, nuestro estudio pone de relieve que la ADNemia por CMV fue más frecuente en los pacientes tratados con los TKI BCR-ABL1 y con ruxolitinib, especialmente durante los dos primeros meses de tratamiento. Esto sugiere un efecto más pronunciado de estos fármacos sobre la respuesta inmunitaria de las células T en comparación con el venetoclax. A pesar de ello, la magnitud de este efecto fue insuficiente para impedir el control definitivo de la replicación del CMV, ya que ningún paciente desarrolló enfermedad por CMV.

Los resultados coinciden con investigaciones anteriores que indican que el ruxolitinib, usado durante períodos prolongados, puede provocar respuestas celular T específica de CMV por debajo del rango normal, si bien solo un pequeño porcentaje de pacientes presentó una ADNemia de CMV detectable. Esto subraya la profunda complejidad de los efectos inmunomoduladores de estos fármacos y la necesidad de seguir investigando para comprender sus implicaciones a largo plazo sobre las infecciones virales en pacientes inmunodeprimidos.

**Tabla V-3.** Cuantificación de células T CD4+ y CD8+ específicas del CMV y de células T reguladoras en pacientes en todos los grupos de tratamiento.

|                                   |                  | Células T CD4+ y CD8+ específicas del CMV y células T reguladoras al inicio y a lo largo del seguimiento. |          |                                     |          |                                     |          |                                     |          |                                     |          |                                     |          |                                     |          |
|-----------------------------------|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-------------------------------------|----------|-------------------------------------|----------|-------------------------------------|----------|-------------------------------------|----------|-------------------------------------|----------|-------------------------------------|----------|
| Parámetro inmunológico            | Grupo de estudio | Día +0                                                                                                    |          | Día +30                             |          | Día +60                             |          | Día +90                             |          | Día +120                            |          | Día +150                            |          | Día +180                            |          |
|                                   |                  | Mediana (rango) en células/ $\mu$ L                                                                       | <i>P</i> | Mediana (rango) en células/ $\mu$ L | <i>P</i> | Mediana (rango) en células/ $\mu$ L | <i>P</i> | Mediana (rango) en células/ $\mu$ L | <i>P</i> | Mediana (rango) en células/ $\mu$ L | <i>P</i> | Mediana (rango) en células/ $\mu$ L | <i>P</i> | Mediana (rango) en células/ $\mu$ L | <i>P</i> |
| Células T CD4+ específicas de CMV | Venetoclax       | 7.78 (0–118.2)                                                                                            |          | 8.78 (0.13–17.96)                   |          | 14.01 (1.47–113.0)                  |          | 1.64 (0.34–9.56)                    |          | 1.36 (0.25–63.04)                   |          | 1.61 (0–7.30)                       |          | 0.17 (0–9.88)                       |          |
|                                   | TKIs             | 0.10 (0–2.26)                                                                                             | 0.008    | 0.13 (0–4.04)                       | 0.03     | 0.13 (0–1.03)                       | 0.03     | 0.2 (0.07–0.55)                     | 0.10     | 0.27 (0–5.90)                       | 0.45     | 0 (0–0.24)                          | 0.08     | 0.50 (0–2.49)                       | 0.18     |
|                                   | Ruxolitinib      | 6.13 (0.07–78.06)                                                                                         |          | 3.37 (0–69.99)                      |          | 1.69 (0–123.22)                     |          | 2.93 (0–43.56)                      |          | 1.23 (0–66.09)                      |          | 1.07 (0–20.59)                      |          | 1.84 (0.38–23.1)                    |          |
| Células T CD8+ específicas de CMV | Venetoclax       | 4.41 (0.12–42.08)                                                                                         |          | 1.49 (0.02–14)                      |          | 4.02 (0.07–37.61)                   |          | 4.14 (0.15–14.43)                   |          | 2.25 (0.1–31.04)                    |          | 0.45 (0.31–22.71)                   |          | 0.87 (0.38–6.09)                    |          |
|                                   | TKIs             | 0.52 (0–2.64)                                                                                             | 0.43     | 0.17 (0–3.22)                       | 0.46     | 0.63 (0.1–1.82)                     | 0.69     | 0.06 (0–0.19)                       | 0.04     | 0.18 (0.5–2.8)                      | 0.16     | 0.11 (0.06–2.03)                    | 0.52     | 0.21 (0.03–1.24)                    | 0.26     |
|                                   | Ruxolitinib      | 0.88 (0–54.69)                                                                                            |          | 0.64 (0–35.55)                      |          | 0.45 (0–6.68)                       |          | 1.39 (0–23.19)                      |          | 0.81 (0.1–12.99)                    |          | 0.5 (0–13.03)                       |          | 0.28 (0–3.05)                       |          |
| Células T reguladoras             | Venetoclax       | 16.72 (6.87–183.14)                                                                                       |          | 15.56 (2.65–26.85)                  |          | 39.18 (8.05–169.5)                  |          | 28.84 (0.47–292.74)                 |          | 4.3 (1.02–468.33)                   |          | 17.1 (2.82–75.28)                   |          | 30.92 (4.76–66.3)                   |          |
|                                   | TKIs             | 12.68 (0–88.73)                                                                                           | 0.53     | 30.42 (7.44–47.76)                  | 0.49     | 11.98 (3.75–76.59)                  | 0.27     | 28.03 (17.82–36.16)                 | 0.59     | 23.85 (6.1–103.32)                  | 0.64     | 21.42 (0–37.12)                     | 0.98     | 14.1 (0.47–70.37)                   | 0.77     |
|                                   | Ruxolitinib      | 16.6 (0.79–340.43)                                                                                        |          | 8.84 (0.32–200.39)                  |          | 10.13 (0–93.8)                      |          | 9.38 (0–156.36)                     |          | 23.56 (0.39–125.68)                 |          | 12.83 (0.76–209.92)                 |          | 18.86 (0.6–250.26)                  |          |

**Abreviaturas:** CMV, citomegalovirus; TKIs, inhibidores de tirosín quinasa.

Desde un punto de vista clínico, nuestro estudio sugiere que la monitorización sistemática de la ADNemia por CMV en la sangre puede ser innecesaria en los pacientes sometidos a estos tratamientos, aunque la posibilidad de que se produzcan «efectos indirectos» similares a los observados en el tratamiento con alo-TPH justificaría una investigación más profunda. Las limitaciones del estudio, incluido el pequeño tamaño de la muestra y la falta de una evaluación exhaustiva de las respuestas funcionales de las células T específicas del CMV, destacan la necesidad de realizar estudios más amplios y detallados para confirmar estos hallazgos y guiar la práctica clínica.

En conclusión, si bien los agentes de direccionamiento molecular ofrecen vías terapéuticas prometedoras para las neoplasias hematológicas, su impacto en la inmunobiología del CMV presenta tanto desafíos como oportunidades para optimizar la atención a los pacientes. Las investigaciones futuras deberían tener como objetivo delinear los mecanismos subyacentes a estos efectos y desarrollar estrategias para mitigar los posibles riesgos asociados con la reactivación del CMV.

### **III. Monitorización sistemática de la ADNemia por CMV en terapia CAR-T en pacientes hematológicos: ¿una necesidad clínica?**

El conjunto de resultados que se exponen a continuación corresponden al tercer trabajo publicado (Solano de la Asunción, C. Clin Microbiol Infect. 2023 May).

#### **III.1. Presencia e impacto de la ADNemia de CMV en pacientes con neoplasias hematológicas en pacientes receptores de terapia CAR-T**

En este estudio retrospectivo de carácter observacional, se incluyeron 51 pacientes consecutivos seropositivos al CMV, con una edad promedio de 62 años (rango de 22 a 79 años; 26 hombres). Ninguno de los pacientes recibió profilaxis previa contra el CMV. Según las directrices locales, se estableció un protocolo de monitorización de la ADNemia de CMV en plasma los días 0, 7, 14, 21, 30, 60 y 90 posteriores a la infusión celular, empleando ensayos de PCR en tiempo real dentro de las primeras 24 horas tras la recolección, independientemente de la presencia inicial de ADNemia. Las características clínicodemográficas de los pacientes incluidos en el estudio se encuentran resumidas en la tabla V-4.

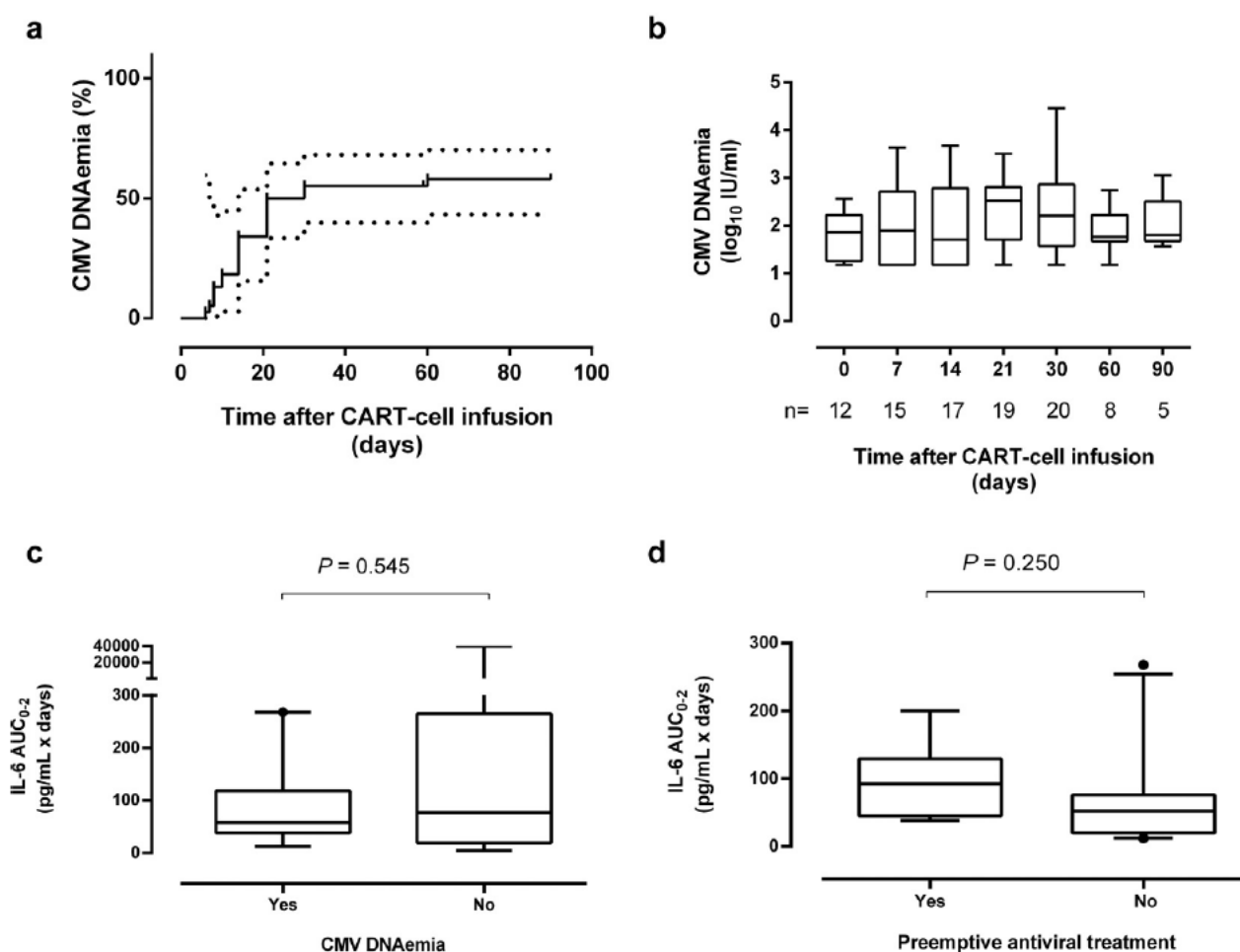
En ambos centros participantes, el tratamiento anticipado (PET) con (val)ganciclovir a dosis estándar se inició al detectar una carga de ADN de CMV igual o superior a 1.500 UI/ml, siguiendo los protocolos locales. El periodo de seguimiento del estudio abarcó los primeros 90 días tras la infusión de la terapia. En promedio, se analizaron seis muestras de plasma por paciente (rango de 2 a 7). De los 51 pacientes incluidos, 12 (24%) presentaron ADNemia detectable al inicio del seguimiento. De los 39 pacientes restantes, 22 (56,4%) desarrollaron ADNemia detectable en algún momento tras la infusión de células T CAR, lo que representa una incidencia acumulada del 57,9% [IC 95%, 43,2–70,2%; Fig. V-4a].

La mediana de tiempo hasta la primera detección de ADN de CMV en plasma fue de 14 días tras la infusión (rango de 7 a 60 días) (Fig. V-4b). La mediana del nivel máximo de ADN detectado fue de 96 UI/ml (rango de 15 a 28 887). De los 22 pacientes que desarrollaron ADNemia, tres (13,6%) recibieron tratamiento anticipado. Durante el periodo de seguimiento, todos los episodios iniciales de ADNemia por CMV se resolvieron espontáneamente, y no se documentaron casos de enfermedad asociada a órganos diana.

**Tabla V-4.** Características de los pacientes hematológicos en terapia con células CAR-T

| Parámetro                                                       | No. (%)         |
|-----------------------------------------------------------------|-----------------|
| <b>Hombre/Mujer</b>                                             | 26 (51)/25 (49) |
| <b>Enfermedad hematológica subyacente</b>                       |                 |
| LDCBG                                                           | 30 (58)         |
| LNH de alto grado                                               | 9 (18)          |
| LF transformado                                                 | 6 (12)          |
| LPM                                                             | 5 (10)          |
| LLA-B Philadelphia +                                            | 1 (2)           |
| <b>Linfoma agresivo</b>                                         | 11 (22)         |
| <b>Refractariedad primaria</b>                                  | 27 (53)         |
| <b>Trasplante previo</b>                                        |                 |
| Auto-TPH                                                        | 9 (17)          |
| Alo-TPH                                                         | 3 (7)           |
| No trasplantado                                                 | 39 (76)         |
| <b>Producto de células CAR-T</b>                                |                 |
| Tisa-cel                                                        | 27 (53)         |
| Axi-cel                                                         | 24 (47)         |
| <b>Índice Sorrow</b>                                            |                 |
| 0-1                                                             | 18 (35.3)       |
| 2                                                               | 16 (31.3)       |
| 3                                                               | 10 (19.6)       |
| ≥4                                                              | 7 (13.7)        |
| <b>Puntuación SLC (acorde a guía ASTCT)</b>                     |                 |
| 0                                                               | 10 (20)         |
| 1                                                               | 28 (56)         |
| 2                                                               | 8 (16)          |
| 3                                                               | 2 (4)           |
| 4                                                               | 2 (4)           |
| <b>Uso de esteroides para tratar CRS</b>                        | 9 (18.4)        |
| <b>Uso de tocilizumab para tratar CRS</b>                       | 24 (49)         |
| <b>Puntuación ICANS</b>                                         |                 |
| 0                                                               | 32 (64)         |
| 1                                                               | 4 (8)           |
| 2                                                               | 2 (4)           |
| 3                                                               | 8 (16)          |
| 4                                                               | 4 (8)           |
| <b>Uso de esteroides para tratar ICANS</b>                      | 18 (35)         |
| <b>Tratamientos previos a la terapia CAR-T, mediana (rango)</b> | 2 (2-11)        |
| <b>Necesidad de terapia puente, sí</b>                          | 17 (33%)        |
| <b>Respuesta a terapia CAR-T</b>                                |                 |
| Completa                                                        | 24 (46)         |
| Parcial                                                         | 8 (16)          |
| Refractaria                                                     | 18 (36)         |
| No definida                                                     | 1 (2)           |
| <b>Muerte durante el seguimiento</b>                            | 6 (12)          |

**Abreviaturas:** LDCBG, linfoma difuso de células B grandes; LNH, linfoma no Hodgkin; LF; linfoma folicular; LPM, linfoma primario mediastínico; LMA, leucemia linfoide aguda B; TPH, trasplante de progenitores hematopoyéticos; CAR-T, Chimeric Antigen Receptor T-cell; Tisa, tisagenlecleucel; Axi, axicabtagen ciloleucel; SLC, síndrome de liberación de citoquinas; ASTCT, American Society for Transplantation and Cellular Therapy; ICANS, immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome.



**Figura V-4.** Incidencia y características de la ADNemia por CMV en pacientes seropositivos para CMV en terapia CAR-T. (a) Incidencia acumulada de ADNemia por CMV desarrollada en los 90 días posteriores a la infusión del tratamiento. La variable muerte fue tratada como un evento de riesgo competitivo. (b) Cargas de ADN de CMV medidas en plasma en diferentes puntos temporales de monitorización. (c) Área bajo la curva (AUC) de IL-6 sérica entre los días +0 y 2 tras inicio de tratamiento (AUC<sub>0e2</sub>) y posterior aparición de ADNemia de CMV en cualquier nivel. (d) ADNemia de CMV (tanto detectada al inicio como después de la terapia con células T CAR) que alcanzó valores de ADN de CMV 1.500 UI/ml en HCUV (requiriendo terapia antiviral anticipada siguiendo las pautas locales).

**III.2. Discusión**

La incidencia de detección de ADNemia por CMV tras la administración de terapia CAR-T en el presente estudio muestra una notable similitud con lo reportado en investigaciones previas, situándose en torno al 45 % (105)(106). Esto ocurre a pesar de las variaciones metodológicas entre estudios, tales como la frecuencia de monitorización, los umbrales de detección en los ensayos de PCR utilizados, el tipo de muestra biológica analizada (plasma frente a sangre total) y el estado clínico basal de los pacientes.

En nuestra cohorte, únicamente el tratamiento con axi-cel se vinculó con la aparición de ADNemia por CMV tras la infusión de células CAR-T, con un cociente de riesgo ajustado de 2,83 (IC 95 %: 1,14-6,96;  $p = 0,024$ ). No obstante, al comparar a los pacientes tratados con axi-cel con aquellos que recibieron tisa-cel, no se observaron diferencias significativas en las variables clínicas relevantes antes o después de la infusión, con la excepción de la necesidad de terapia puente. Es relevante señalar que el uso de axi-cel ha sido previamente asociado con una mayor incidencia de CRS lo que podría suponer un incremento del riesgo de infecciones (155). Sin embargo, nuestros hallazgos difieren de lo descrito en estudios previos, lo que resalta la necesidad de futuras investigaciones.

A diferencia de lo previamente reportado, en nuestro análisis ni la edad avanzada ni el uso de corticosteroides (incluyendo la dosis acumulada total) o de tocilizumab para el manejo del CRS y/o del ICANS emergieron como factores de riesgo.

En cuanto a los 12 pacientes que presentaban ADNemia por CMV antes de la infusión de células CAR-T, cinco de ellos (41,6 %) iniciaron PET con una mediana de 30 días postinfusión (rango: 14-90 días). La mediana de la carga viral al inicio de la PET fue de 3.514 UI/ml (rango: 1.565-4.728 UI/ml). En línea con observaciones previas (106), la ADNemia de CMV preexistente se asoció de manera significativa con un riesgo aumentado de cargas virales elevadas en plasma ( $\geq 1.500$  UI/ml), hazard ratio (HR) de 29,71 (IC 95 %: 2,88-306,28;  $p = 0,004$ ). Finalmente, los pacientes con ADNemia previa a la infusión y aquellos que la desarrollaron posteriormente no mostraron diferencias en sus características clínicas basales.

Asimismo, en este contexto se ha identificado la inflamación como un factor clave en la reactivación del CMV, acorde a investigaciones previas (103). Decidimos entonces evaluar si los niveles tempranos de IL-6 tras la infusión de células T CAR, previos a la administración de tocilizumab (fármaco que puede influir en la concentración de IL-6) podrían predecir la aparición de ADNemia por CMV. Para ello, se calculó el área bajo la curva (AUC) de la carga de IL-6 entre los días 0 y 2 postinfusión (AUC 0-2). Los valores de AUC 0-2 no mostraron diferencias significativas entre los pacientes que desarrollaron ADNemia por CMV y aquellos que no la presentaron ( $p = 0,54$ ; Fig. 1C), ni entre los que alcanzaron niveles  $\geq 1.500$  UI/ml, requiriendo PET, y los que no ( $p = 0,25$ ; Fig. 1D). De manera consistente con estos resultados, no se observó una relación entre la presencia de CRS de alto grado o ICANS (156) y el riesgo posterior de ADNemia por CMV. Cabe señalar que existen estudios previos con resultados discordantes en este ámbito (105)(106), en los cuales sí se observó una asociación entre la aparición de CRS o ICANS y el desarrollo posterior de ADNemia por CMV.

El presente estudio tiene como principal limitación el tamaño muestral y su diseño retrospectivo, en el cual las pruebas fueron realizadas conforme a protocolos clínicos particulares de cada centro en lugar de aplicarse de manera homogénea en todos los participantes. Además, la periodicidad de la monitorización de ADN del CMV después del día 30 postinfusión (realizado con periodicidad mensual) pudo haber sido insuficiente para detectar todos los episodios de ADNemia. Asimismo, hemos de destacar el empleo de dos ensayos de PCR distintos, con variaciones en su desempeño analítico.

En síntesis, nuestro estudio concluye que la ADNemia por CMV fue un hallazgo frecuente en nuestra cohorte, aunque resolvió en todos los casos sin generar afectación en órganos diana. No obstante, es importante señalar que la población analizada incluyó solo un paciente con leucemia linfoblástica aguda y algunos con antecedente de alo-TPH, mientras que las tasas de CRS e ICANS clínicamente significativas fueron inferiores a las reportadas en ensayos clínicos previos. Con base en estos hallazgos, sugerimos que los pacientes seropositivos para CMV receptores de terapia CAR-T podrían beneficiarse de un seguimiento sistemático de la ADNemia, particularmente aquellos con detección basal del virus.

#### **IV. Valor predictivo de la carga de ADN del virus Torque Teno para la ADNemia por citomegalovirus en neoplasias hematológicas**

El conjunto de resultados que se exponen a continuación corresponde al primer trabajo publicado (Solano de la Asunción, C.J Med Virol. 2023 Jul).

##### **IV.1. Estudio de la cinética de la viremia por TTV en plasma de pacientes tratados con small molecule inhibitors**

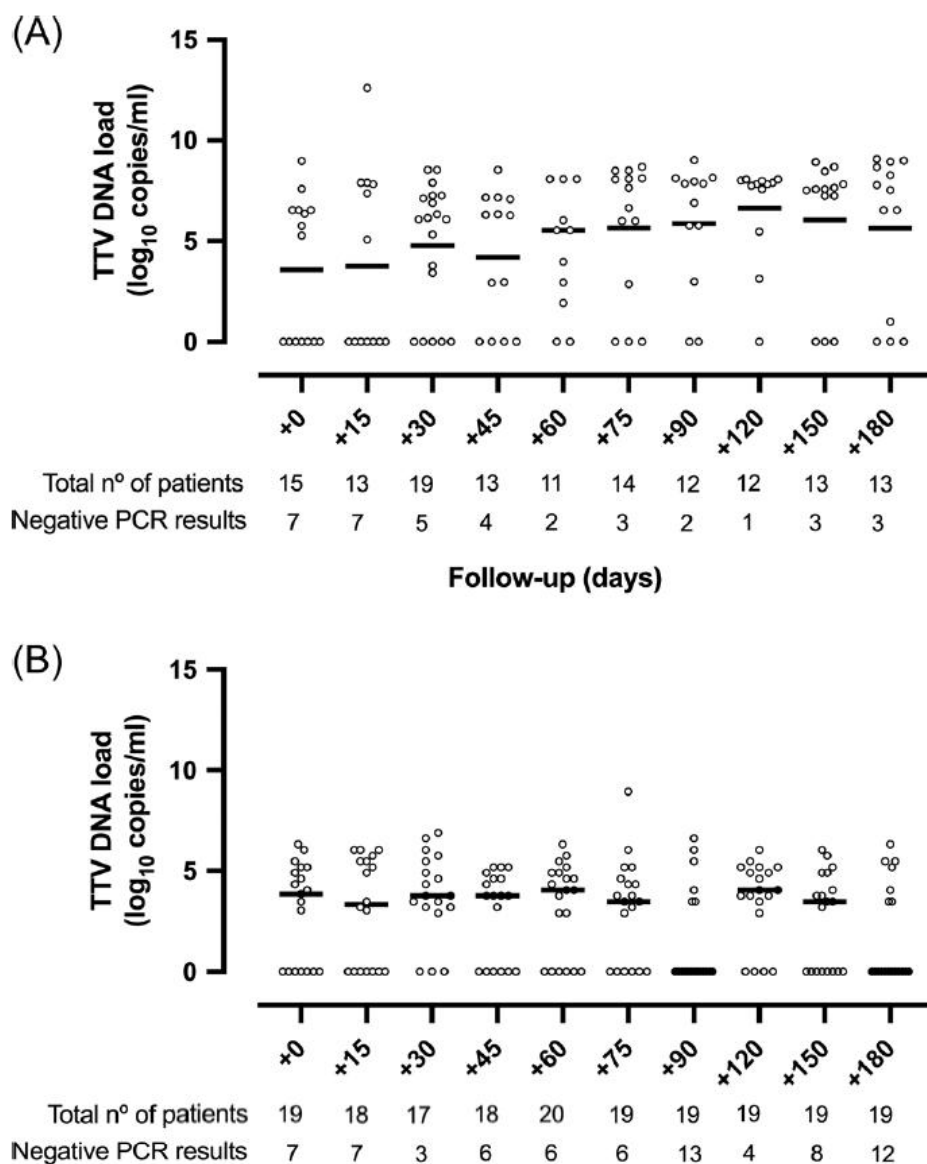
Se analizó un total de 135 muestras de plasma provenientes de pacientes bajo tratamiento con ibrutinib para la cuantificación del ADN del virus torque teno (TTV), con una mediana de ocho muestras por paciente (rango: 3-10). Las características clínicas y demográficas de los pacientes incluidos se encuentran resumidas en la Tabla V-5. La detección de ADN de TTV en al menos una muestra se observó en 17 de los 20 pacientes evaluados (85 %). La proporción de pacientes con ADN de TTV detectable mostró un incremento progresivo desde la evaluación basal hasta el día +120 (38,4 %-100 %), seguido de una ligera disminución en los días +150 y +180 (83,7 %) (Figura 1A). La carga inicial de ADN de TTV presentó una mediana de 5,27 log<sub>10</sub> copias/ml (rango: 0-6,54). A lo largo del seguimiento, se evidenció un aumento progresivo en la carga viral, con un pico registrado en el día +120 (mediana: 7,83 log<sub>10</sub> copias/ml; rango: 7,05-7,99), lo que representa una diferencia estadísticamente significativa respecto al valor basal ( $p = 0,025$ ) (Figura 1A).

Por otro lado, se analizaron 188 muestras de plasma de pacientes tratados con ruxolitinib, con una mediana de 10 muestras por paciente (rango: 3-10). En este grupo, todos los pacientes presentaron al menos una muestra con ADN de TTV detectable en algún momento del estudio. La proporción de muestras con resultado positivo en la PCR no mostró diferencias significativas entre la evaluación basal (63,1 %) y los distintos momentos de seguimiento, con un máximo en el día +120 (78,9 %) ( $p \geq 0,2$ ) (Figura 1B). La mediana de la carga viral inicial fue de 3,86 log<sub>10</sub> copias/ml (rango: 0-5,05), con variaciones leves a lo largo del estudio (Figura 1B). En términos generales, la carga máxima de ADN de TTV se registró en el día +60 (mediana: 4,05 log<sub>10</sub> copias/ml; rango: 0-4,91).

**Tabla V-5.** Características demográficas y clínicas de los pacientes incluidos en el estudio.

| <b>Parámetro</b>                                                                | <b>Número de pacientes (%)</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| <b>Tratados con Ibrutinib</b>                                                   |                                |
| <b>Sexo, hombre/mujer (%)</b>                                                   | 13/7 (65/35)                   |
| <b>Enfermedad de base</b>                                                       |                                |
| Leucemia linfocítica crónica                                                    | 20 (100)                       |
| <b>Primera línea, n (%)</b>                                                     | 11 (55)                        |
| <b>Tratamiento previo</b>                                                       | 9 (45)                         |
| Bendamustina ± Obinutuzumab, n (%)                                              | 2 (22)                         |
| Bendamustina + Rituximab, n (%)                                                 | 2 (22)                         |
| Bendamustina + Rituximab + Clorambucilo n (%)                                   | 1 (11)                         |
| Ciclofosfamida + Rituximab + Clorambucilo + Prednisona n (%)                    | 2 (22)                         |
| Fludarabina + Ciclofosfamida + Rituximab + (Bendamustina o Obinutuzumab), n (%) | 2 (22)                         |
| <b>Tratados con Ruxolitinib</b>                                                 |                                |
| <b>Sexo, hombre/mujer (%)</b>                                                   | 11/10 (52/48)                  |
| <b>Enfermedad de base</b>                                                       |                                |
| Mielofibrosis primaria (MP), n (%)                                              | 16 (76)                        |
| Policitemia vera (PV), n (%)                                                    | 4 (19)                         |
| Leucemia mielocítica crónica (LMC), n (%)                                       | 1 (5)                          |
| <b>Primera línea, n (%)</b>                                                     | 15 (71.4)                      |
| <b>Tratamiento previo, n (%)</b>                                                | 6 (28.6)                       |
| Hidroxiurea, n (%)                                                              | 4 (66.6)                       |
| Hidroxiurea + Danazol, n (%)                                                    | 2 (33.3)                       |

No obstante, los valores obtenidos en los diferentes puntos de seguimiento posteriores al inicio del tratamiento no mostraron diferencias significativas con respecto a la carga basal ( $p \geq 0,12$ ).

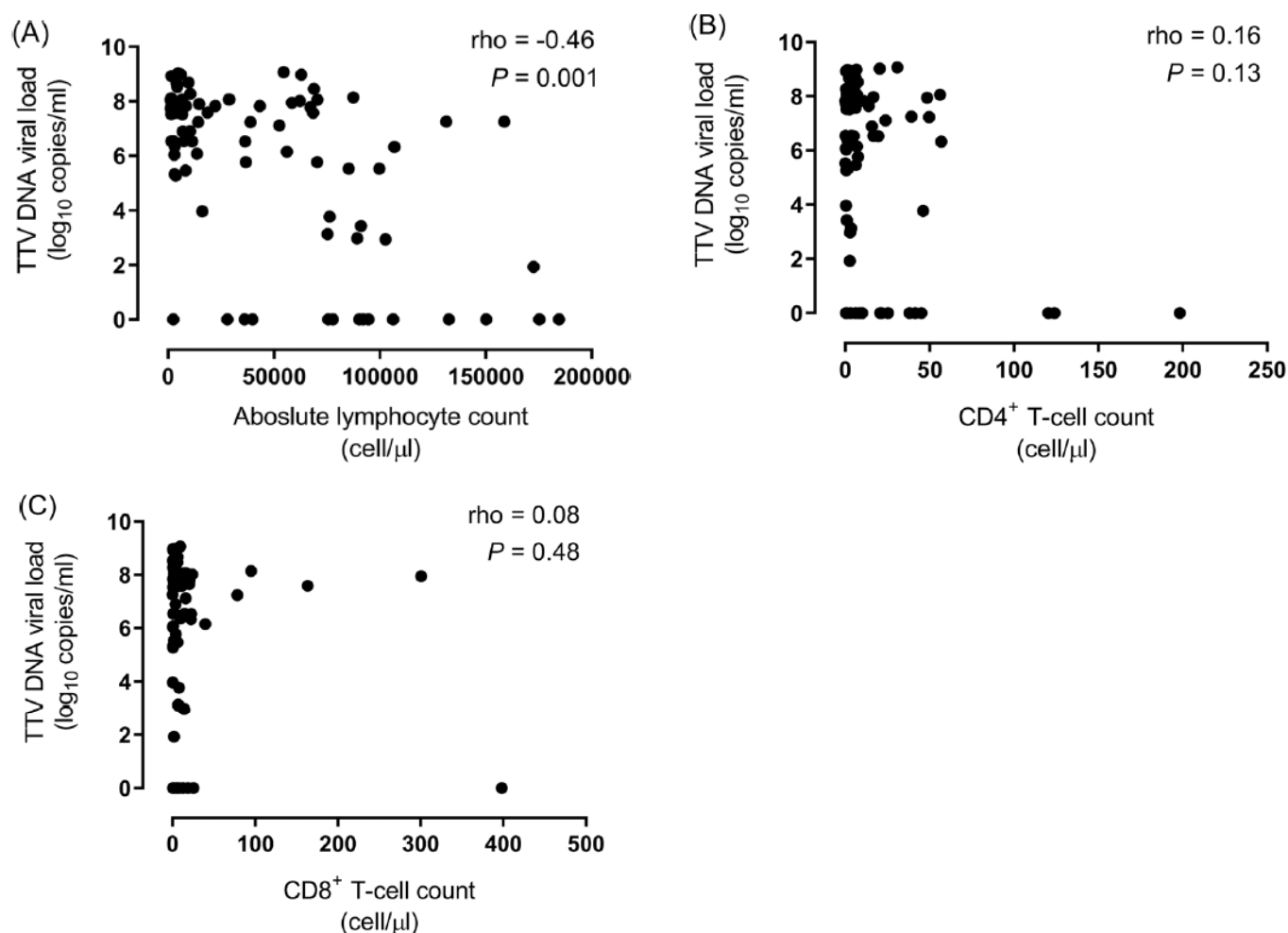


**Figura V-5.** Cinética de la ADNemia por TTV en plasma en pacientes tratados con ibrutinib ( $n = 20$ ) o ruxolitinib ( $n = 21$ ), en los paneles (A) y (B), respectivamente. Solo se muestran los datos de pacientes con al menos una muestra positiva durante el seguimiento. Las cargas de ADN de TTV se cuantificaron por PCR al inicio y en diferentes puntos temporales después de la administración del fármaco. Se indica el número de muestras disponibles para el análisis y el número de aquellas que arrojaron resultados negativos de PCR (indetectables) en cada momento de seguimiento. Las barras representan medianas.

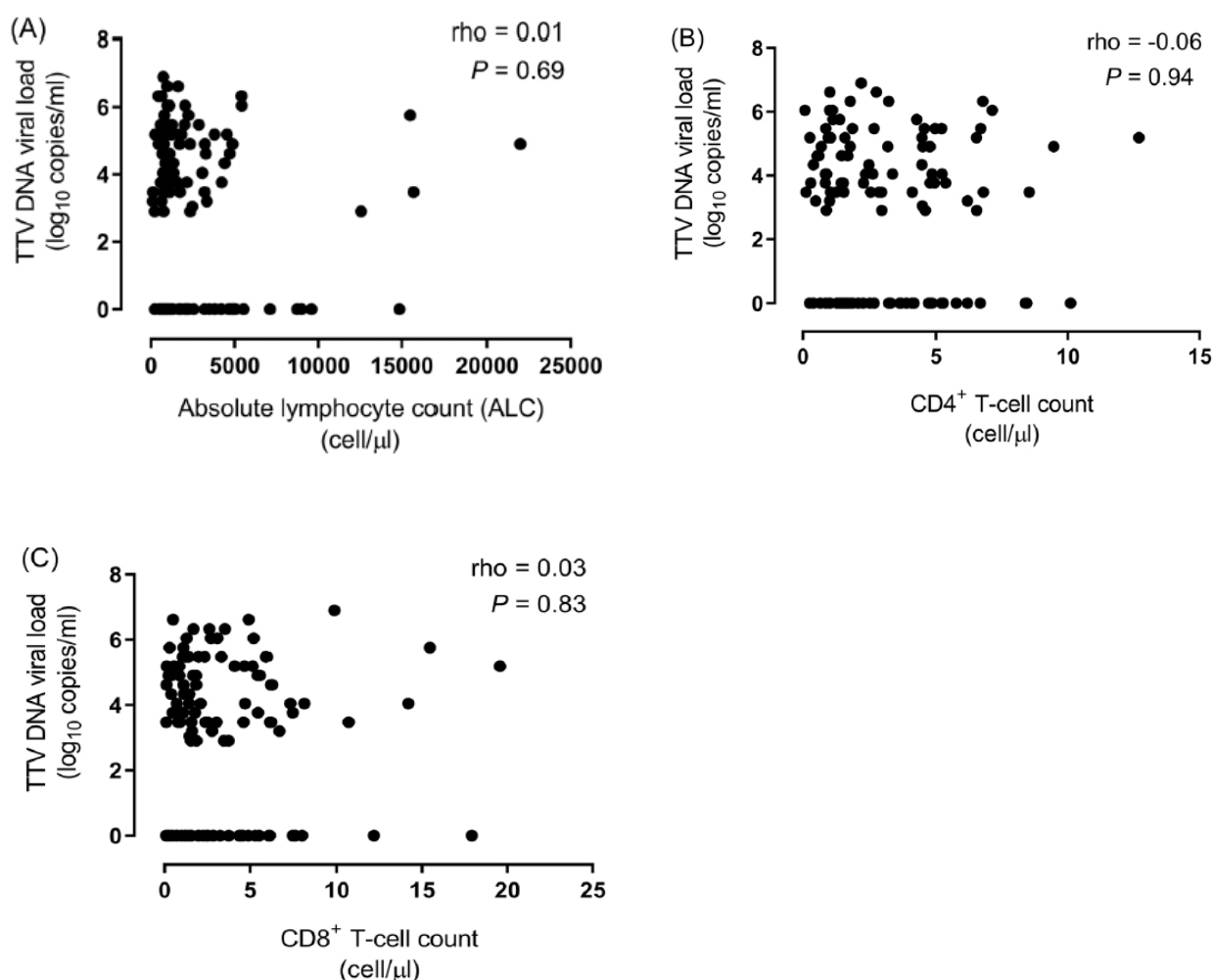
**IV.2. Estudio de la correlación entre las cargas de ADN de TTV y los recuentos de linfocitos absolutos y de células T CD4+ y CD8+ totales**

Se analizaron un total de 236 muestras pareadas obtenidas de pacientes en tratamiento con ibrutinib (n = 106) o ruxolitinib (n = 130) con el objetivo de evaluar la correlación global entre las cargas de ADN del TTV y los recuentos absolutos de linfocitos (ALC), así como los conteos totales de células T CD4+ y CD8+. Tal como se ilustra en la Figura V-6 (A), se identificó una correlación inversa de intensidad moderada entre la carga de ADN de TTV y el ALC en los pacientes que recibieron ibrutinib ( $Rho = -0,46$ ;  $p < 0,001$ ). En contraste, no se observó una correlación significativa entre los niveles de ADN de TTV y los recuentos totales de células T CD4+ (B) o CD8+ (C), lo que sugiere que la relación entre la carga viral y los parámetros inmunológicos podría ser específica para ciertos subgrupos celulares.

Asimismo, como se presenta en la Figura V-7, en los pacientes tratados con ruxolitinib no se detectó ninguna correlación entre la carga de ADN de TTV y los recuentos de ALC (A), CD4+ (B) o CD8+ (C), lo que indica que el impacto de este fármaco sobre los parámetros inmunológicos evaluados podría diferir del observado con ibrutinib.



**Figura V-6.** Correlación entre la carga viral del TTV en plasma y (A) recuentos absolutos de linfocitos (ALC), (B) recuentos totales de células T CD4+ y (C) recuentos totales de células T CD8+ en pacientes tratados con ibrutinib (n = 20), según lo determinado por la prueba de rangos de Spearman. Se muestran los valores de Rho y *p*.



**Figura V-7.** Correlación entre la carga viral de TTV en plasma y (A) recuentos absolutos de linfocitos (ALC), (B) recuentos totales de células T CD4<sup>+</sup> y (C) recuentos totales de células T CD8<sup>+</sup> en pacientes tratados con ruxolitinib (n = 21), según lo determinado por la prueba de rangos de Spearman. Se muestran los valores de Rho y *p*.

### IV.3. Monitorización de la carga de ADN TTV en plasma como predictor de ADNemia por citomegalovirus

De entre los 20 pacientes que recibieron tratamiento con ibrutinib, 7 desarrollaron ADNemia por CMV de bajo grado, con un nivel pico medio de 106 UI/ml, dentro de una mediana de 45 días posteriores al inicio de la terapia. Con el objetivo de evaluar una posible asociación entre la carga de ADN del TTV y el desarrollo de ADNemia por CMV, se compararon los valores cuantificados en el día +30 entre aquellos que posteriormente presentaron ADNemia por CMV (n = 4) y aquellos que no la desarrollaron (n = 12). El análisis reveló que no existía una

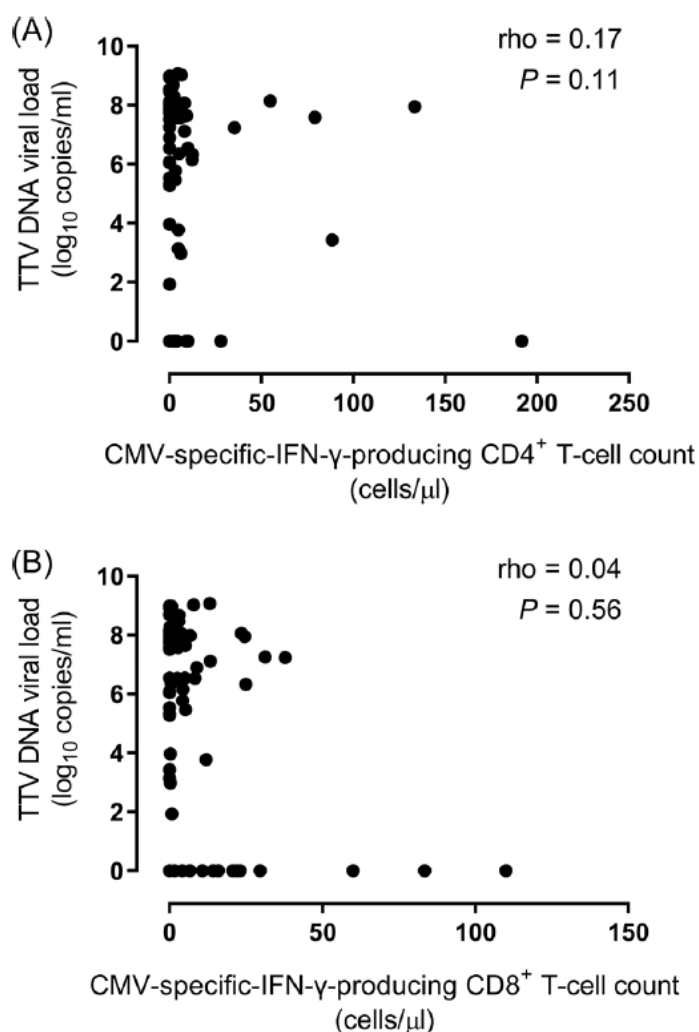
diferencia significativa entre ambos grupos, ya que la carga de ADN de TTV en los pacientes con ADNemia por CMV (mediana: 6,12 log10 copias/ml; rango: 3,04-6,64) resultó comparable ( $p = 0,77$ ) a la observada en quienes no presentaron ADNemia por CMV (mediana: 4,55 log10 copias/ml; rango: 0-6,79).

Por otra parte, entre los pacientes tratados con ruxolitinib, 16 de 21 (76 %) desarrollaron ADNemia por CMV, con una mediana de aparición a los 30 días tras el inicio del tratamiento. La carga máxima de ADN de CMV registrada en este grupo fue de 182 UI/ml (rango: 15-182). Al analizar la carga de ADN de TTV en el día +30, no se identificaron diferencias significativas entre los pacientes que desarrollaron ADNemia por CMV ( $n = 7$ ; mediana: 3,48 log10 copias/ml; RIC: 3,20-6,05) y aquellos que no la presentaron ( $n = 4$ ; mediana: 2,91 log10 copias/ml; rango: 0-4,91), con un valor de  $p = 0,30$ .

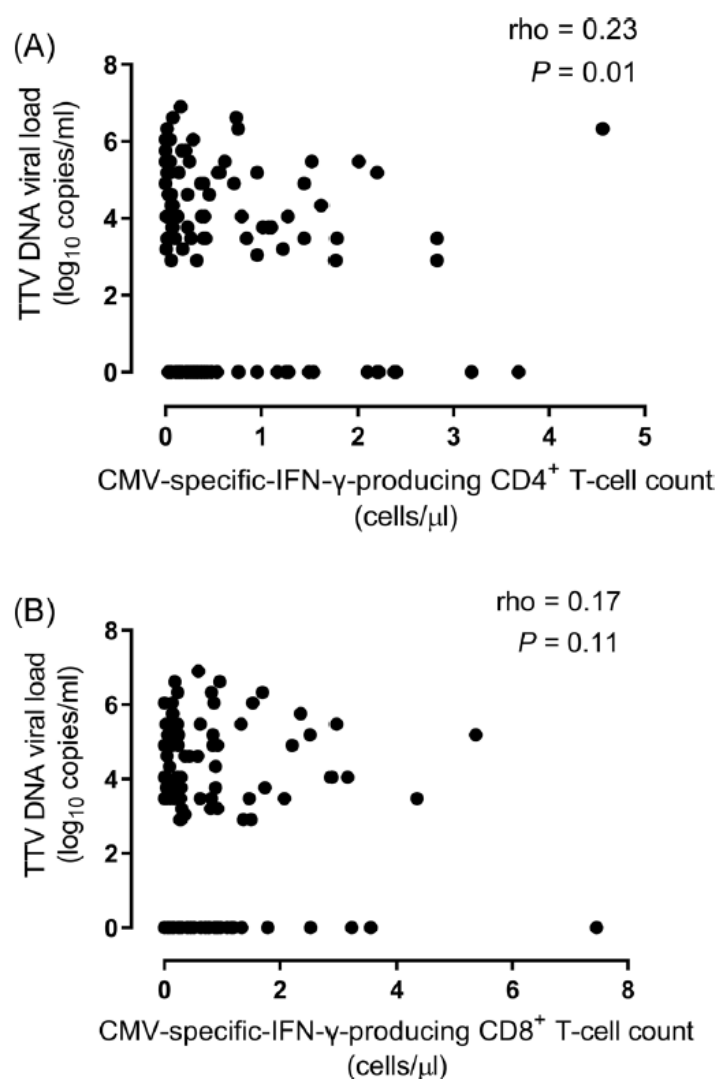
#### **IV.4. Correlación entre las cargas virales de TTV y las células T-CD8 + y CD4 + productoras de IFN- $\gamma$ específicos de CMV**

Para el análisis de la correlación entre las cargas de ADN del TTV y la respuesta de células T CD4+ y CD8+ productoras de IFN- $\gamma$  específicas para CMV, se hizo uso de un total de 236 muestras pareadas de pacientes en tratamiento con ibrutinib ( $n = 106$ ) o ruxolitinib ( $n = 130$ ).

Los resultados nos indicaron que la relación entre estos parámetros fue débil o inexistente en ambas cohortes. En los pacientes tratados con ibrutinib, no se identificó una asociación clara entre la carga de ADN de TTV y la respuesta de células T CD4+ o CD8+ específicas de CMV (Figura 4A y 4B, respectivamente). De manera similar, en aquellos que recibieron ruxolitinib, tampoco se evidenció una correlación significativa entre la carga viral y la actividad de células T CD4+ o CD8+ dirigidas contra CMV (Figura 5A y 5B, respectivamente).



**Figura V-8.** Correlación entre el ADN del virus Torque Teno (TTV) en el plasma y los recuentos de células T CD4<sup>+</sup> (A) y CD8<sup>+</sup> (B) productoras de citomegalovirus pp65/IE-1-IFN-γ en sangre total de pacientes tratados con ibrutinib, enumerados mediante citometría de flujo para tinción de citocinas intracelulares y evaluados mediante la prueba de rangos de Spearman. Se muestran los valores de Rho y p. IFN, interferón.



**Figura V-9.** Correlación entre el ADN del virus Torque Teno (TTV) en el plasma y los recuentos de células T CD4<sup>+</sup> (A) y CD8<sup>+</sup> (B) productoras de citomegalovirus pp65/IE-1-IFN-γ en sangre total de pacientes tratados con ruxolitinib, enumerados por citometría de flujo para tinción de citocinas intracelulares y evaluados por la prueba de rangos de Spearman. Se muestran los valores de Rho y P. IFN, interferón.

**IV.5. Discusión**

Un creciente cuerpo de evidencia experimental respalda la hipótesis de que la carga viral de ADN de TTV en sangre refleja el grado de inmunosupresión en diversos contextos clínicos (123)(126)(127). En particular, la monitorización de la carga viral de TTV se ha propuesto como un posible predictor de eventos infecciosos virales en el TOS, dado que niveles elevados o en ascenso tras el trasplante de riñón o hígado han sido asociados con la aparición de ADNemia por CMV o virus BK (157)(158). En el trasplante hematopoyético alogénico (TPH), el análisis de la cinética del ADN de TTV en plasma en el momento temprano postrasplante permitió identificar pacientes con mayor riesgo de desarrollar ADNemia de CMV de alto nivel que requerían terapia antiviral preventiva (133). Sin embargo, aún no se ha determinado si la monitorización de la carga de ADN de TTV podría ser útil para predecir infecciones en pacientes hematológicos tratados con inhibidores de moléculas pequeñas. En este estudio, se caracterizó la dinámica del ADN de TTV en pacientes bajo tratamiento con ibrutinib o ruxolitinib y se evaluó su posible valor predictivo para el desarrollo de ADNemia por CMV.

Los hallazgos principales de nuestro estudio fueron los siguientes: en primer lugar, se observó un incremento significativo a lo largo del seguimiento en la carga de ADN de TTV en pacientes tratados con ibrutinib, alcanzando un pico en el día +120. Esto sugiere un posible deterioro progresivo de la inmunidad mediada por células T, responsables del control de la replicación de TTV (122). Alternativamente, este fenómeno también podría estar relacionado con el aumento de los linfocitos absolutos (ALC) característico del tratamiento con inhibidores de la vía del receptor de células B, como es el ibrutinib (159)(160), favoreciendo entonces la replicación viral al ser precisamente los linfocitos T el principal nicho replicativo del TTV (117). En apoyo de esta última hipótesis, se encontró una correlación inversa moderada entre la carga de ADN de TTV y los ALC, aunque no con las células T CD4+ o CD8+.

En cuanto a los pacientes tratados con ruxolitinib, también se detectó una tendencia al alza en la carga de ADN de TTV, con un pico en el día +60; sin embargo, las diferencias en los niveles de las medianas no fueron estadísticamente significativas. Este hallazgo concuerda con el impacto conocido del ruxolitinib en la diferenciación y función de células dendríticas, lo que puede afectar la activación de

células T (117) y, en consecuencia, el control de la replicación de TTV. Otra posible explicación, con un enfoque menos marcado por la mutua exclusión, para la menor influencia del ruxolitinib en la cinética del ADN de TTV, en comparación con ibrutinib, podría estar relacionada con la estabilidad de los recuentos de ALC en este grupo de pacientes. En este sentido, no se halló correlación entre la carga de ADN de TTV y los recuentos de ALC, CD4+ y CD8+ en pacientes tratados con ruxolitinib.

Otro hallazgo relevante fue que la carga de ADN de TTV basal era significativamente mayor en pacientes que posteriormente recibieron ibrutinib en comparación con aquellos tratados con ruxolitinib (5.27 log<sub>10</sub> copies/ml vs. 3.86 log<sub>10</sub> copies/ml). Esta diferencia podría estar vinculada a la naturaleza de la enfermedad hematológica subyacente y a los tratamientos previos administrados en cada grupo, quedando esta reflexión en la especulación.

Además, como parte del estudio, se exploró la posibilidad de que la carga viral de TTV pueda predecir la aparición de ADNemia por CMV. Este estudio está enmarcado en previas investigaciones de nuestro grupo, donde demostramos que los pacientes hematológicos tratados con terapias dirigidas frente a dianas moleculares sufren un mayor riesgo de desarrollar ADNemias por CMV de bajo grado (161)(162). Dado que la ADNemia por CMV se detectó en una mediana de 45 y 30 días tras el inicio del tratamiento con ibrutinib y ruxolitinib, respectivamente, se analizó la carga de ADN de TTV en el día +30. No se encontró una asociación entre los niveles de ADN de TTV en este punto y el desarrollo posterior de ADNemia por CMV en ninguno de los grupos. Esta aparente falta de correlación entre la magnitud de la carga viral por TTV y la posterior aparición de ADNemia por CMV en ambos grupos de pacientes concuerda con la ausencia de asociación entre la carga de ADN de TTV y los niveles de células T CD8+ y CD4+ específicas de CMV productoras de IFN- $\gamma$ . Cabe destacar que, en este contexto, los niveles de células T específicas de CMV en sangre periférica han demostrado ser predictivos del riesgo de ADNemia por CMV en pacientes sometidos a TOS (163) o TPH alogénico (59), aunque no en aquellos tratados con inhibidores de moléculas pequeñas (161)(162).

Entre las limitaciones del estudio se encuentra el tamaño relativamente pequeño de la cohorte, lo que impidió evaluar si mediciones previas al día +30 podrían haber sido predictivas del desarrollo de ADNemia por CMV. Además, la

frecuencia de la monitorización de ADNemia por CMV pudo haber sido insuficiente, particularmente más allá del día +90, para detectar todos los episodios de viremia. Finalmente, solo se analizaron células T productoras de IFN- $\gamma$  específicas de CMV.

En resumen, la cinética de la carga de ADN de TTV puede diferir entre los pacientes tratados con ibrutinib y ruxolitinib. Además, nuestros datos sugieren que ni la aparición de ADNemia por CMV ni la magnitud de las respuestas de células T específicas del CMV podrían anticiparse o inferirse, respectivamente, en función de las mediciones de la carga de ADN de TTV después del inicio del tratamiento. Se necesitan estudios adicionales que involucren un mayor número de pacientes para determinar con mayor precisión la utilidad potencial de la monitorización seriada de la carga viral de TTV para anticipar el desarrollo no solo de la infección activa por CMV sino también de otras infecciones oportunistas en las que los pacientes tratados con ibrutinib y ruxolitinib tienen mayor riesgo de padecer.



## **CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

- I. La ADNemia por CMV constituye un evento frecuente en pacientes con LLC tratados con ibrutinib, pero tiende hacia la resolución espontánea sin conducir a enfermedad de órganos diana. Asimismo, los pacientes conservan la capacidad de expandir la respuesta T funcional, especialmente en el componente CD8+, pese a una reducción inicial en las células T específicas para CMV.
- II. En pacientes con neoplasias hematológicas tratados con small molecule inhibitors, la ADNemia por CMV se presenta de forma frecuente sin conllevar enfermedad de órgano diana. A pesar de las fluctuaciones en la respuesta específica de linfocitos T, estos pacientes conservan una capacidad efectiva para controlar la replicación viral.
- III. En pacientes CMV seropositivos en tratamiento con terapia CAR-T, la ADNemia por CMV se constata con regularidad y no desemboca en enfermedad de órgano diana. La detección basal de viremia puede asociarse a cargas virales más elevadas y, en algunos casos, a la necesidad de instaurar terapia PET, lo que podría justificar una monitorización sistemática.
- IV. La determinación de la carga de TTV en plasma no constituye un predictor fiable de la ADNemia por CMV en pacientes tratados con ibrutinib o ruxolitinib, ni se relaciona de forma determinante con la reconstitución de células T específicas para CMV.



## **BIBLIOGRAFÍA**



1. Neofytos D, van Delden C, Oriol M. Update on the management of cytomegalovirus infection in transplant recipients. *Rev Med Suisse*. 2023;19(822):726–30.
2. Ho M. The history of cytomegalovirus and its diseases. *Med Microbiol Immunol*. 2008;197(2):65–73.
3. Fons MP, Graves K, Carvallo T, Pollard R, Albrecht T. Human cytomegalovirus: development and progression of nuclear inclusions by primary clinical isolates and laboratory-adapted strains. *Soc Exp Biol Med*. 1986;422(42274):416–22.
4. Prichard MN, Penfold MET, Duke GM, Spaete RR, Kemble GW. A review of genetic differences between limited and extensively passaged human cytomegalovirus strains. *Rev Med Virol*. 2001;11(3):191–200.
5. Close WL, Anderson AN, Pellett PE. Betaherpesvirus virion assembly and egress. Vol. 1045, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2018. 167–207 p.
6. Charles OJ, Venturini C, Gantt S, Atkinson C, Griffiths P, Goldstein RA, et al. Genomic and geographical structure of human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci*. 2017;120:2017.
7. Gibson W. Structure and formation of the cytomegalovirus virion. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;325:187–204.
8. Muller C, Alain S, Gourin C, Baumert TF, Ligat G, Hantz S. New insights into human cytomegalovirus pul52 structure. *Viruses*. 2021;13(8):1–16.
9. Kalejta RF. Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2008;72(2):249–65.
10. Paul J, Iii T. Human cytomegalovirus tegument proteins Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Virol J*. 2012;9(1):22–30.
11. Fishman JA. Overview: Cytomegalovirus and the herpesviruses in transplantation. *Am J Transplant*. 2013;13(SUPPL. 3):1–8.
12. Gardner TJ, Tortorella D. Virion glycoprotein-mediated immune evasion by human cytomegalovirus: a sticky virus makes a slick getaway. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016;80(3):663–77.
13. Jean Beltran PM, Cristea IM. The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: Lessons from proteomics. *Expert Rev Proteomics*. 2014;11(6):697–711.
14. Gerna G, Revello MG, Baldanti F, Percivalle E, Lilleri D. The pentameric complex of human cytomegalovirus: Cell tropism, virus dissemination, immune response and vaccine development. *J Gen Virol*. 2017;98(9):2215–34.
15. Martí-Carreras J, Maes P. Human cytomegalovirus genomics and transcriptomics through the lens of next-generation sequencing: revision and future challenges. *Virus Genes*. 2019;55(2):138–64.
16. Noriega V, Redmann V, Gardner T, Tortorella D. Diverse immune evasion strategies by human cytomegalovirus. *Immunol Res*. 2012 Dec;54(1–3):140–51.
17. Brinkmann MM, Dağ F, Hengel H, Messerle M, Kalinke U, Čičin-Šain L. Cytomegalovirus immune evasion of myeloid lineage cells. *Med Microbiol Immunol*. 2015;204(3):367–82.

18. Nguyen CC, Kamil JP. Pathogen at the gates: human cytomegalovirus entry and cell tropism. *Viruses*. 2018 Dec;10(12).
19. Kotton CN, Torre-Cisneros J, Aguado JM, Alain S, Baldanti F, Baumann G, et al. Cytomegalovirus in the transplant setting: Where are we now and what happens next? A report from the International CMV Symposium 2021. *Transpl Infect Dis*. 2022;24(6):1–13.
20. Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev Med Virol*. 2010;20(4):202–13.
21. Zuhair M, Smit GSA, Wallis G, Jabbar F, Smith C, Devleesschauwer B, et al. Estimation of the worldwide seroprevalence of cytomegalovirus: A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol*. 2019;29(3):1–6.
22. Fowler K, Mucha J, Neumann M, Lewandowski W, Kaczanowska M, Grys M, et al. A systematic literature review of the global seroprevalence of cytomegalovirus: possible implications for treatment, screening, and vaccine development. *BMC Public Health*. 2022;22(1):1–15.
23. Kahn HS, Markus MB, Fincham JE. Transmission of cytomegalovirus. 2001;357:1799–800.
24. Santos CAQ. Cytomegalovirus and Other  $\beta$ -Herpesviruses. *Semin Nephrol*. 2016;36(5):351–61.
25. Fowler KB, Boppana SB. Congenital cytomegalovirus infection. *Semin Perinatol*. 2018;42(3):149–54.
26. Nigro G. Maternal-fetal cytomegalovirus infection: From diagnosis to therapy. *J Matern Neonatal Med*. 2009;22(2):169–74.
27. Davis NL, King CC, Kourtis AP. Cytomegalovirus infection in pregnancy. *Birth Defects Res*. 2017;109(5):336–46.
28. Sinclair J, Sissons P. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Gen Virol*. 2006;87(7):1763–79.
29. Prockop SE, Hasan A, Doubrovina E, Dahi PB, Rodriguez-Sanchez I, Curry M, et al. Third-party cytomegalovirus-specific T cells improved survival in refractory cytomegalovirus viremia after hematopoietic transplant. *J Clin Invest*. 2023;133(10):1–16.
30. Thomas H. Weller. The cytomegaloviruses: ubiquitous agents with protean clinical manifestations. *N Engl J Med*. 1971;24(2):203–14.
31. P.D. Griffiths, Grundy JE, Ali A, Swenty P, Trompeter RS. Cytomegalovirus matching in renal transplantation. *Lancet*. 1987;1987.
32. Pergam SA, Xie H, Sandhu R, Pollack M, Smith J, Stevens-Ayers T, et al. Efficiency and risk factors for CMV transmission in seronegative hematopoietic stem cell recipients. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18(9):1391–400.
33. Gerna G, Kabanova A, Lilleri D. Human cytomegalovirus cell tropism and host cell receptors. *Vaccines*. 2019;7(3):1–18.
34. Hetzenecker S, Helenius A, Krzyzaniak MA. HCMV induces macropinocytosis for host cell entry in fibroblasts. *Traffic*. 2016;17(4):351–68.
35. Tang J, Frascaroli G, Lebbink RJ, Ostermann E, Brune W. Human cytomegalovirus glycoprotein B variants affect viral entry, cell fusion, and genome stability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(36):18021–30.

36. Ryckman BJ, Jarvis MA, Drummond DD, Nelson JA, Johnson DC. Human cytomegalovirus entry into epithelial and endothelial cells depends on genes UL128 to UL150 and occurs by endocytosis and low-pH fusion. *J Virol*. 2006;80(2):710–22.
37. Tarrant-Elorza M, Rossetto CC, Pari GS. Maintenance and replication of the human cytomegalovirus genome during latency. *Cell Host Microbe*. 2014;16(1):43–54.
38. Reeves M, Sinclair J. Regulation of human cytomegalovirus transcription in latency: Beyond the major immediate-early promoter. *Viruses*. 2013;5(6):1395–413.
39. Razonable RR, Humar A. Cytomegalovirus in solid organ transplant recipients—Guidelines of the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clin Transplant*. 2019;33(9):1–23.
40. Ljungman P, Boeckh M, Hirsch HH, Josephson F, Lundgren J, Nichols G, et al. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant patients for use in clinical trials. *Clin Infect Dis*. 2017;64(1):87–91.
41. Price P. The Footprint of CMV Infection May Last a Lifetime. *Manifestations Cytomegalovirus Infect*. 2013;
42. Muñoz P, Leiro MGC. Profilaxis de la infección por citomegalovirus en el trasplante de corazón. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(SUPPL.6):52–5.
43. Crough T, Khanna R. Immunobiology of human cytomegalovirus: From bench to bedside. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(1):76–98.
44. Forte E, Zhang Z, Thorp EB, Hummel M. Cytomegalovirus Latency and Reactivation: An Intricate Interplay With the Host Immune Response. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10(March).
45. Weisblum Y, Panet A, Haimov-Kochman R, Wolf DG. Models of vertical cytomegalovirus (CMV) transmission and pathogenesis. *Semin Immunopathol*. 2014;36(6):615–25.
46. Eid AJ, Brown RA, Arthurs SK, Lahr BD, Eckel-Passow JE, Larson TS, et al. A prospective longitudinal analysis of cytomegalovirus (CMV)-specific CD4+ and CD8+ T cells in kidney allograft recipients at risk of CMV infection. *Transpl Int*. 2010;23(5):506–13.
47. Coppola T, Mangold JF, Cantrell S, Permar SR. Impact of maternal immunity on congenital cytomegalovirus birth prevalence and infant outcomes: A systematic review. *Vaccines*. 2019;7(4):1–13.
48. Reeves M, Sinclair J. Aspects of human cytomegalovirus latency and reactivation. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;325:297–313.
49. 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. *J Exp Med*. 2005;202(5):673–85.
50. Marchesi F, Pimpinelli F, Ensoli F, Mengarelli A. Cytomegalovirus infection in hematologic malignancy settings other than the allogeneic transplant. *Hematol Oncol*. 2018;36(2):381–91.
51. Piukovics K, Terhes G, Gurbity-Pálfi T, Bereczki Á, Rárosi F, Deák J, et al. Cytomegalovirus infection in patients with haematological diseases and after autologous stem cell transplantation as consolidation: a single-centre study. *Ann*

- Hematol. 2017;96(1):125–31.
52. Boeckh M, Nichols WG. The impact of cytomegalovirus serostatus of donor and recipient before hematopoietic stem cell transplantation in the era of antiviral prophylaxis and preemptive therapy. *Blood*. 2004;103(6):2003–8.
  53. Sato K, Igarashi S, Tsukada N, Inamura J, Yamamoto M, Shindo M, et al. Cytomegalovirus infection in patients with malignant lymphomas who have not received hematopoietic stem cell transplantation. *BMC Cancer*. 2022;22(1):1–9.
  54. Yang J, Kang CI, Lee YH, Ko JH, Huh K, Cho SY, et al. Risk factors and clinical outcomes of cytomegalovirus diseases in hematologic malignancy patients without hematopoietic stem-cell transplantation. *Support Care Cancer*. 2023;32(1):1–6.
  55. Özdemir E, Saliba RM, Champlin RE, Couriel DR, Giralt SA, de Lima M, et al. Risk factors associated with late cytomegalovirus reactivation after allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant*. 2007;40(2):125–36.
  56. Takenaka K, Nishida T, Asano-Mori Y, Oshima K, Ohashi K, Mori T, et al. Cytomegalovirus reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is associated with a reduced risk of relapse in patients with acute myeloid leukemia who survived to day 100 after transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(11):2008–16.
  57. Stern L, Withers B, Avdic S, Gottlieb D, Abendroth A, Blyth E, et al. Human cytomegalovirus latency and reactivation in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Front Microbiol*. 2019;10(MAY):1–13.
  58. Solano C, Navarro D. Clinical virology of cytomegalovirus infection following hematopoietic transplantation. *Future Virol*. 2010;5(1):111–24.
  59. Solano C, Benet I, Clari MA, Nieto J, De La Cámara R, López J, et al. Enumeration of cytomegalovirus-specific interferon CD8+ and CD4+ T cells early after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk of active cytomegalovirus infection. *Haematologica*. 2008;93(9):1434–6.
  60. Pérez-Romero P, Blanco P, Giménez E, Solano C, Navarro D. An update on the treatment of cytomegalovirus infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Rev Hematol*. 2015;12(11):937–45.
  61. Giménez E, Solano C, Azanza JR, Amat P, Navarro D. Monitoring of trough plasma ganciclovir levels and peripheral blood cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T cells to predict CMV DNAemia clearance in preemptively treated allogeneic stem cell transplant recipients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(9):5602–5.
  62. Tormo N, Solano C, Benet I, Nieto J, De La Cámara R, López J, et al. Reconstitution of CMV pp65 and IE-1-specific IFN- $\gamma$  CD8+ and CD4 + T-cell responses affording protection from CMV DNAemia following allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2011;46(11):1437–43.
  63. J. Fortún. Principales infecciones del paciente oncológico. *An Sist Saint Navar*. 2004;27:17–31.
  64. Mateos MC, Arguiñano JM, Ardaiz MA, Oyarzábal FJ. Infecciones en pacientes oncohematológicos no trasplantados. *An Sist Sanit Navar*. 2005;28(1):59–81.
  65. Xue C, Wang X, Zhang L, Qu Q, Zhang Q, Jiang Y. Ibrutinib in B-cell lymphoma: Single fighter might be enough? *Cancer Cell Int*. 2020;20(1).

66. Jones J, Mato A, Coutre S, Byrd JC, Furman RR, Hillmen P, et al. Evaluation of 230 patients with relapsed/refractory deletion 17p chronic lymphocytic leukaemia treated with ibrutinib from 3 clinical trials. *Br J Haematol*. 2018;182(4):504–12.
67. Burger JA, Tedeschi A, Barr PM, Robak T, Owen C, Ghia P, et al. Ibrutinib as initial therapy for patients with chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2015;373(25):2425–37.
68. Gayko U, Fung M, Clow F, Sun S, Faust E, Price S, et al. Development of the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib for B cell malignancies. *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1358(1):82–94.
69. Metzler JM, Burla L, Fink D, Imesch P. Ibrutinib in gynecological malignancies and breast cancer: A systematic review. *Int J Mol Sci*. 2020;21(11):1–17.
70. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol*. 2019;94(11):1266–87.
71. Puła B, Gołos A, Górniak P, Jamroziak K. Overcoming ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Cancers (Basel)*. 2019;11(12):1–24.
72. DiSogra KY, Tran T, Arnall JR, Janes A, Moore DC, Park SI. Ibrutinib treatment via alternative administration in a patient with chronic lymphocytic leukemia and dysphagia. *J Oncol Pharm Pract*. 2021;27(5):1265–9.
73. Pal Singh S, Dammeijer F, Hendriks RW. Role of Bruton's tyrosine kinase in B cells and malignancies. *Mol Cancer*. 2018;17(1):1–23.
74. Xu Y, Ye H. Progress in understanding the mechanisms of resistance to BCL-2 inhibitors. *Exp Hematol Oncol*. 2022;11(1):1–11.
75. Yu H, Wu S, Liu S, Li X, Gai Y, Lin H, et al. Venetoclax enhances DNA damage induced by XPO1 inhibitors: A novel mechanism underlying the synergistic antileukaemic effect in acute myeloid leukaemia. *J Cell Mol Med*. 2022;26(9):2646–57.
76. Mihalyova J, Jelinek T, Growkova K, Hrdinka M, Simicek M, Hajek R. Venetoclax: A new wave in hematocology. *Exp Hematol*. 2018;61:10–25.
77. Lochmann TL, Floros K V., Naseri M, Powell KM, Cook W, March RJ, et al. Venetoclax is effective in small-cell lung cancers with high BCL-2 expression. *Clin Cancer Res*. 2018;24(2):360–9.
78. Roberts AW, Stilgenbauer S, Seymour JF, Huang DCS. Venetoclax in patients with previously treated chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res*. 2017;23(16):4527–33.
79. Fan W, Guo J, Zhang Y, Zhang R, Lin B. Venetoclax dose adjustment due to drug-drug interactions: A case report and literature review. *Anticancer Drugs*. 2024;35(1):70–5.
80. Ong F, Kim K, Konopleva MY. Venetoclax resistance: Mechanistic insights and future strategies. *Cancer Drug Resist*. 2022;5(2):380–400.
81. Zhang M, Tian J, Wang R, Song M, Zhao R, Chen H, et al. Dasatinib inhibits lung cancer cell growth and patient derived tumor growth in mice by targeting LIMK1. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8(December):1–12.
82. Guignabert C, Phan C, Seferian A, Huertas A, Tu L, Thuillet R, et al. Dasatinib induces lung vascular toxicity and predisposes to pulmonary hypertension. *J Clin Invest*. 2016;126(9):3207–18.
83. McCormack PL, Keam SJ. Dasatinib: A review of its use in the treatment of

- chronic myeloid leukaemia and philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia. *Drugs*. 2011;71(13):1771–95.
84. McCormack PL, Keam SJ. Spotlight on dasatinib in chronic myeloid leukemia and philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *BioDrugs*. 2012;26(1):61–4.
  85. Keating GM. Dasatinib: A Review in Chronic Myeloid Leukaemia and Ph+ Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Drugs*. 2017;77(1):85–96.
  86. Phan C, Jutant EM, Tu L, Thuillet R, Seferian A, Montani D, et al. Dasatinib increases endothelial permeability leading to pleural effusion. *Eur Respir J*. 2018;51(1):1–14.
  87. Tobío A, Alfonso A, Botana LM. C-kit mutations determine dasatinib mechanism of action in HMC-1 neoplastic mast cells: Dasatinib differently regulates PKC $\delta$  translocation in HMC-1560 and HMC-1560,816 cell lines. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2015;37(4):380–7.
  88. Heo SK, Noh EK, Yoon DJ, Jo JC, Park JH, Kim H. Dasatinib accelerates valproic acid-induced acute myeloid leukemia cell death by regulation of differentiation capacity. *PLoS One*. 2014;9(6).
  89. McKeage K. Ruxolitinib: A review in polycythaemia vera. *Drugs*. 2015;75(15):1773–81.
  90. Yang S, Tang X, Wang L, Ni C, Wu Y, Zhou L, et al. Targeting TLR2/Rac1/cdc42/JNK pathway to reveal that ruxolitinib promotes thrombocytopoiesis. *Int J Mol Sci*. 2022;23(24):1–24.
  91. Ciechanowicz P, Rakowska A, Sikora M, Rudnicka L. JAK-inhibitors in dermatology: current evidence and future applications. *J Dermatolog Treat*. 2019;30(7):648–58.
  92. Jagasia M, Zeiser R, Arbushites M, Delaite P, Gadbaw B, Bubnoff N Von. Ruxolitinib for the treatment of patients with steroid-refractory GVHD: An introduction to the REACH trials. *Immunotherapy*. 2018;10(5):391–402.
  93. Mohny LA, Singh R, Feldman SR. Review of ruxolitinib in the treatment of atopic dermatitis. *Ann Pharmacother*. 2023;57(2):207–16.
  94. Chen H, Li M, Ng N, Yu E, Bujarski S, Yin Z, et al. Ruxolitinib reverses checkpoint inhibition by reducing programmed cell death ligand-1 (PD-L1) expression and increases anti-tumour effects of T cells in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2021;192(3):568–76.
  95. Deisseroth A, Kaminskas E, Grillo J, Chen W, Saber H, Lu HL, et al. U.S. Food and Drug Administration approval: Ruxolitinib for the treatment of patients with intermediate and high-risk myelofibrosis. *Clin Cancer Res*. 2012;18(12):3212–7.
  96. Mestre-Durán C, Martín-Cortázar C, García-Solís B, Pernas A, Pertíñez L, Galán V, et al. Ruxolitinib does not completely abrogate the functional capabilities of TLR4/9 ligand-activated NK cells. *Front Immunol*. 2023;13(January):1–15.
  97. Li X, Wang Z, Zhang S, Yao Q, Chen W, Liu F. Ruxolitinib induces apoptosis of human colorectal cancer cells by downregulating the JAK1/2-STAT1-Mcl-1 axis. *Oncol Lett*. 2021;21(5):1–14.
  98. Ryan MM, Patel M, Hogan K, Lipat AJ, Scandolara R, Das R, et al. Ruxolitinib inhibits IFN $\gamma$  licensing of human bone marrow derived mesenchymal stromal cells. *Transplant Cell Ther*. 2021;27(5):389.e1-389.e10.

99. Kong Y, Li J, Zhao X, Wu Y, Chen L. CAR-T cell therapy: developments, challenges and expanded applications from cancer to autoimmunity. *Front Immunol.* 2024;15(January):1–25.
100. Posey AD, Young RM, June CH. Future perspectives on engineered T cells for cancer. *Trends in Cancer.* 2024;10(8):687–95.
101. Hill JA, Li D, Hay KA, Green ML, Cherian S, Chen X, et al. Infectious complications of CD19-targeted chimeric antigen receptor-modified T-cell immunotherapy. *Blood.* 2018;131(1):121–30.
102. Fried S, Avigdor A, Bielorai B, Meir A, Besser MJ, Schachter J, et al. Early and late hematologic toxicity following CD19 CAR-T cells. *Bone Marrow Transplant.* 2019;54(10):1643–50.
103. Logue JM, Zucchetti E, Bachmeier CA, Krivenko GS, Larson V, Ninh D, et al. Immune reconstitution and associated infections following axicabtagene ciloleucel in relapsed or refractory large B-cell lymphoma. *Haematologica.* 2021;106(4):978–86.
104. Vora SB, Waghmare A, Englund JA, Qu P, Gardner RA, Hill JA. Infectious complications following CD19 chimeric antigen receptor t-cell therapy for children, adolescents, and young adults. *Open Forum Infect Dis.* 2020;7(5):1–9.
105. Chen G, Herr M, Nowak J, Ho C, Almyroudis N, Attwood K, et al. Cytomegalovirus reactivation after CD19 CAR T cell therapy is clinically significant. *Haematologica.* 2022;(February):615–20.
106. Márquez-Algaba E, Iacoboni G, Pernas B, Esperalba J, Los Arcos I, Navarro V, et al. Impact of Cytomegalovirus Replication in Patients with Aggressive B Cell Lymphoma Treated with Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy. *Transplant Cell Ther.* 2022;28(12):851.e1-851.e8.
107. Schett G, Mackensen A, Mougiakakos D. CAR T-cell therapy in autoimmune diseases. *Lancet.* 2023;402(10416):2034–44.
108. Ellebrecht CT, Bhoj VG, Nace A, Choi EJ, Mao X, Cho MJ, et al. Reengineering chimeric antigenreceptor T cells for targeted therapyof autoimmune disease. *Science (80- ).* 2017;353(6295):179–84.
109. Zhao Z, Chen Y, Francisco NM, Zhang Y, Wu M. The application of CAR-T cell therapy in hematological malignancies: advantages and challenges. *Acta Pharm Sin B.* 2018;8(4):539–51.
110. Huang J, Huang X, Huang J. CAR-T cell therapy for hematological malignancies: Limitations and optimization strategies. *Front Immunol.* 2022;13(September):1–20.
111. Lu J, Jiang G. The journey of CAR-T therapy in hematological malignancies. *Mol Cancer.* 2022;21(1):1–15.
112. JN B. Recent advances in CAR T-cell toxicity: Mechanisms, manifestations and management. *Blood Rev.* 2019;81–6.
113. Giménez E, Monzó C, Albert E, Fuentes-Trillo A, Seda E, Piñana JL, et al. Diversity and dynamic changes of anelloviruses in plasma following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Med Virol.* 2021;93(8):5167–72.
114. Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;241(1):92–7.

115. Varsani A, Opriessnig T, Celer V, Maggi F, Okamoto H, Blomström AL, et al. Taxonomic update for mammalian anelloviruses (family Anelloviridae). *Arch Virol.* 2021;166(10):2943–53.
116. Ninomiya M, Takahashi M, Nishizawa T, Shimosegawa T, Okamoto H. Development of PCR assays with nested primers specific for differential detection of three human anelloviruses and early acquisition of dual or triple infection during infancy. *J Clin Microbiol.* 2008;46(2):507–14.
117. Focosi D, Macera L, Boggi U, Nelli LC, Maggi F. Short-term kinetics of torque teno virus viraemia after induction immunosuppression confirm T lymphocytes as the main replication-competent cells. *J Gen Virol.* 2015;96(1):115–7.
118. Maggi F, Focosi D, Albani M, Lanini L, Vatteroni ML, Petrini M, et al. Role of hematopoietic cells in the maintenance of chronic human torquetenovirus plasma viremia. *J Virol.* 2010;84(13):6891–3.
119. Lin HH, Kao JH, Lee PI, Chen DS. Early acquisition of TT virus in infants: Possible minor role of maternal transmission. *J Med Virol.* 2002;66(2):285–90.
120. Chikasue K, Kimura M, Ikeda K, Ohnishi T, Kawanishi S, Iio T, et al. Detection of torque teno virus DNA in exhaled breath by polymerase chain reaction. *Acta Med Okayama.* 2012;66(5):387–97.
121. Okamoto H. History of discoveries and pathogenicity of TT viruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009;331:1–20.
122. Focosi D, Antonelli G, Pistello M, Maggi F. Torquetenovirus: the human virome from bench to bedside. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22(7):589–93.
123. Redondo N, Navarro D, Aguado JM, Fernández-Ruiz M. Viruses, friends, and foes: The case of Torque Teno Virus and the net state of immunosuppression. *Transpl Infect Dis.* 2022;24(2):1–15.
124. Rezahosseini O, Drabe CH, Sørensen SS, Rasmussen A, Perch M, Ostrowski SR, et al. Torque-Teno virus viral load as a potential endogenous marker of immune function in solid organ transplantation. *Transplant Rev.* 2019;33(3):137–44.
125. Kanate AS, Majhail NS, Savani BN, Bredeson C, Champlin RE, Crawford S, et al. Indications for hematopoietic cell transplantation and immune effector cell therapy: Guidelines from the American Society for Transplantation and Cellular Therapy. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2020 Jul;26(7):1247–56.
126. van Rijn AL, Roos R, Dekker FW, Rotmans JI, Feltkamp MCW. Torque teno virus load as marker of rejection and infection in solid organ transplantation – A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol.* 2023;33(1).
127. Jaksch P, Görzer I, Puchhammer-Stöckl E, Bond G. Integrated immunologic monitoring in solid organ transplantation: The road toward torque teno virus-guided immunosuppression. *Transplantation.* 2022;106(10):1940–51.
128. Gore EJ, Gard L, Niesters HGM, Van Leer Buter CC. Understanding torquetenovirus (TTV) as an immune marker. *Front Med.* 2023;10(June).
129. Zeng J, Tang Y, Lin T, Song T. Torque-teno virus for the prediction of graft rejection and infection disease after kidney transplantation: A systematic review and meta-analysis. *J Med Virol.* 2023;95(3).
130. Masouridi-Levrat S, Pradier A, Simonetta F, Kaiser L, Chalandon Y, Roosnek E. Torque teno virus in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant.*

2016;51(3):440–2.

131. Schmitz J, Kobbe G, Kondakci M, Schuler E, Magorsch M, Adams O. The value of Torque Teno Virus (TTV) as a marker for the degree of immunosuppression in adult patients after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). *Biol Blood Marrow Transplant*. 2020;26(4):643–50.
132. Gilles R, Herling M, Holtick U, Heger E, Awerkiew S, Fish I, et al. Dynamics of Torque Teno virus viremia could predict risk of complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Med Microbiol Immunol*. 2017;206(5):355–62.
133. Albert E, Solano C, Giménez E, Focosi D, Pérez A, Macera L, et al. The kinetics of torque teno virus plasma DNA load shortly after engraftment predicts the risk of high-level CMV DNAemia in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2018;53(2):180–7.
134. Mouton W, Conrad A, Bal A, Boccard M, Malcus C, Ducastelle-Lepretre S, et al. Torque teno virus viral load as a marker of immune function in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation recipients. *Viruses*. 2020;12(11).
135. Clari MÁ, Bravo D, Costa E, Muñoz-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. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013 Feb;75(2):207–9.
136. Shiraki K, Sato H, Yoshida Y, Yamamura JI, Tsurita M, Kurokawa M, et al. TT virus (TTV) loads associated with different peripheral blood cell types and evidence for TTV replication in activated mononuclear cells. *J Med Virol*. 2001;64(2):190–4.
137. Maggi F, Fornai C, Vatteroni ML, Siciliano G, Menichetti F, Tascini C, et al. Low prevalence of TT virus in the cerebrospinal fluid of viremic patients with central nervous system disorders. *J Med Virol*. 2001 Oct;65(2):418–22.
138. Pistello M, Morrica A, Maggi F, Vatteroni ML, Freer G, Fornai C, et al. TT virus levels in the plasma of infected individuals with different hepatic and extrahepatic pathology. *J Med Virol*. 2001 Feb;63(2):189–95.
139. Maggi F, Pifferi M, Fornai C, Andreoli E, Tempestini E, Vatteroni M, et al. TT virus in the nasal secretions of children with acute respiratory diseases: relations to viremia and disease severity. *J Virol*. 2003 Feb;77(4):2418–25.
140. Solano C, Muñoz-Cobo B, Giménez E, Remigia MJ, Amat P, Clari MA, et al. Pre-emptive antiviral therapy for active CMV infection in adult allo-SCT patients guided by plasma CMV DNAemia quantitation using a real-time PCR assay: Clinical experience at a single center. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48(7):1010–2.
141. Giménez E, Muñoz-Cobo B, Solano C, Amat P, Navarro D. Early kinetics of plasma cytomegalovirus DNA load in allogeneic stem cell transplant recipients in the era of highly sensitive real-time PCR assays: Does it have any clinical value? *J Clin Microbiol*. 2014;52(2):654–6.
142. Solano C, Giménez E, Piñana JL, Vinuesa V, Poujois S, Zaragoza S, et al. Preemptive antiviral therapy for CMV infection in allogeneic stem cell transplant recipients guided by the viral doubling time in the blood. *Bone Marrow Transplant*. 2016;51(5):718–21.
143. Solano C, Benet I, Clari MA, Nieto J, de la Cámara R, López J, et al. Enumeration of cytomegalovirus-specific interferongamma CD8+ and CD4+ T cells early after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk

- of active cytomegalovirus infection. Vol. 93, Haematologica. Italy; 2008. p. 1434–6.
144. Tormo N, Solano C, Benet I, Nieto J, de la Cámara R, López J, et al. Reconstitution of CMV pp65 and IE-1-specific IFN- $\gamma$  CD8(+) and CD4(+) T-cell responses affording protection from CMV DNAemia following allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2011 Nov;46(11):1437–43.
  145. Ljungman P, de la Camara R, Robin C, Crocchiolo R, Einsele H, Hill JA, et al. Guidelines for the management of cytomegalovirus infection in patients with haematological malignancies and after stem cell transplantation from the 2017 European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL 7). *Lancet Infect Dis*. 2019;19(8):e260–72.
  146. Varughese T, Taur Y, Cohen N, Palomba ML, Seo SK, Hohl TM, et al. Serious Infections in Patients Receiving Ibrutinib for Treatment of Lymphoid Cancer. *Clin Infect Dis*. 2018;67(5):687–92.
  147. Ruiz-Camps I, Aguilar-Company J. Risk of infection associated with targeted therapies for solid organ and hematological malignancies. *Ther Adv Infect Dis*. 2021;8:1–15.
  148. Tillman BF, Pauff JM, Satyanarayana G, Talbott M, Warner JL. Systematic review of infectious events with the Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib in the treatment of hematologic malignancies. *Eur J Haematol*. 2018;100(4):325–34.
  149. Giménez E, Torres I, Albert E, Piñana JL, Hernández-Boluda JC, Solano C, et al. Cytomegalovirus (CMV) infection and risk of mortality in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (Allo-HSCT): A systematic review, meta-analysis, and meta-regression analysis. *Am J Transplant*. 2019;19(9):2479–94.
  150. Parry HM, Mirajkar N, Cutmore N, Zuo J, Long H, Kwok M, et al. Long-term ibrutinib therapy reverses CD8+ t cell exhaustion in B cell chronic lymphocytic leukaemia. *Front Immunol*. 2019;10(December):1–7.
  151. Huntley D, Giménez E, Pascual MJ, Vázquez L, Amat P, Remigia MJ, et al. Peripheral blood regulatory T cells and occurrence of Cytomegalovirus DNAemia after unmanipulated haploidentical allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with posttransplant cyclophosphamide. *Bone Marrow Transplant*. 2020;55(7):1493–6.
  152. Wei X, He L, Wang X, Lin M, Dai J. Effects of dasatinib on CD8+T, Th1, and Treg cells in patients with chronic myeloid leukemia. *J Int Med Res*. 2019;48(2).
  153. Fei F, Yu Y, Schmitt A, Rojewski MT, Chen B, Greiner J, et al. Effects of nilotinib on regulatory T cells: The dose matters. *Mol Cancer*. 2010;9:1–10.
  154. Sochacka-ćwikła A, Mączyński M, Regiec A. Fda-approved drugs for hematological malignancies—the last decade review. *Cancers (Basel)*. 2022;14(1).
  155. Meir J, Abid MA, Abid MB. State of the CAR-T: Risk of infections with Chimeric Antigen Receptor T-Cell therapy and determinants of SARS-CoV-2 vaccine responses. *Transpl Cell Ther*. 2021;(December).
  156. Lee DW, Santomasso BD, Locke FL, Ghobadi A, Turtle CJ, Brudno JN, et al. ASTCT consensus grading for cytokine release syndrome and neurologic toxicity associated with immune effector cells. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019;25(4):625–38.
  157. Maggi F, Focosi D, Statzu M, Bianco G, Costa C, Macera L, et al. Early Post-

- Transplant Torquetenovirus Viremia Predicts Cytomegalovirus Reactivations In Solid Organ Transplant Recipients. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1):6–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-33909-7>
158. Fernández-Ruiz M, Albert E, Giménez E, Ruiz-Merlo T, Parra P, López-Medrano F, et al. Monitoring of alphatorquevirus DNA levels for the prediction of immunosuppression-related complications after kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2019;19(4):1139–49.
  159. Herman SEM, Niemann CU, Farooqui M, Jones J, Mustafa RZ, Lipsky A, et al. Ibrutinib-induced lymphocytosis in patients with chronic lymphocytic leukemia: correlative analyses from a phase II study. *Leukemia*. 2014;28(11):2188–96.
  160. Barrientos JC, Burger JA, Byrd JC, Hillmen P, Zhou C, Ninomoto J, et al. Characterizing the kinetics of lymphocytosis in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with single-agent ibrutinib. *Leuk Lymphoma*. 2019;60(4):1000–5.
  161. Solano de la Asunción C, Terol MJ, Saus A, Olea B, Giménez E, Albert E, et al. Cytomegalovirus-specific T-cell immunity and DNAemia in patients with chronic lymphocytic leukaemia undergoing treatment with ibrutinib. *Br J Haematol*. 2021;195(4):637–41.
  162. Solano de la Asunción C, Giménez E, Hernández-Boluda JC, Terol MJ, Albert E, López-Jiménez J, et al. Immunobiology of cytomegalovirus infection in patients with haematological malignancies undergoing treatment with small molecule inhibitors. *Br J Haematol*. 2023;200(6):e58–61.
  163. Fernández-Ruiz M, Giménez E, Vinuesa V, Ruiz-Merlo T, Parra P, Amat P, et al. Regular monitoring of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity in intermediate-risk kidney transplant recipients: predictive value of the immediate post-transplant assessment. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(3):381.e1-381.e10.



## **ANEXOS**



## **Escrito del director de la Tesis Doctoral sobre el Factor de Impacto de las publicaciones que se recogen en la Tesis Doctoral**

### **Primer artículo**

Cytomegalovirus-specific T-cell immunity and DNAemia in patients with chronic lymphocytic leukaemia undergoing treatment with ibrutinib. *Br J Haematol.* 2021 Nov;195(4):637-641. doi: 10.1111/bjh.17732

Carlos Solano de la Asunción <sup>1</sup>, María José Terol <sup>2 3</sup>, Ana Saus <sup>2</sup>, Beatriz Olea <sup>1</sup>, Estela Giménez <sup>1</sup>, Eliseo Albert <sup>1</sup>, Javier López-Jiménez <sup>4</sup>, Rafael Andreu <sup>5</sup>, Dolores García <sup>6</sup>, Laura Fox <sup>7</sup>, María José Remigia <sup>2</sup>, Paula Amat <sup>2 3</sup>, Carlos Solano <sup>2 3</sup>, David Navarro <sup>1 8</sup>.

- 1- Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, INCLIVA Research Institute, Valencia, Spain.
- 2- Hematology Service, Hospital Clínico Universitario, INCLIVA Research Institute, Valencia, Spain.
- 3- Department of Medicine, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain.
- 4- Hematology Service, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain.
- 5- Hematology Service, Hospital Universitario Politécnico "La Fe", Valencia, Spain.
- 6- Hematology Service, Hospital Morales Meseguer, Murcia, Spain.
- 7- Hematology Service, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.
- 8- Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain.

### **Contribución del aspirante:**

Carlos Solano de la Asunción se encargó de la recopilación de las muestras, realizó la mayor parte de los aspectos analíticos, asistió en el análisis de los datos, la interpretación de los resultados y revisó el texto definitivo.

### **Factor impacto de la revista**

8,615

## Segundo artículo

Immunobiology of cytomegalovirus infection in patients with haematological malignancies undergoing treatment with small molecule inhibitors. Br J Haematol. 2023 Mar;200(6):e58-e61. doi: 10.1111/bjh.18655

Carlos Solano de la Asunción <sup>1</sup>, Estela Giménez <sup>1</sup>, Juan Carlos Hernández-Boluda <sup>2</sup>, María José Terol <sup>2 3</sup>, Eliseo Albert <sup>1</sup>, Javier López-Jiménez <sup>4</sup>, Valentín García-Gutiérrez <sup>4</sup>, Rafael Andreu <sup>5</sup>, Dolores García <sup>6</sup>, María Laura Fox <sup>7</sup>, María José Remigia <sup>2</sup>, Paula Amat <sup>2</sup>, Carlos Solano <sup>2 3</sup>, David Navarro <sup>1 8 9</sup>.

- 1- Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, INCLIVA Research Institute, Valencia, Spain.
- 2- Hematology Service, Hospital Clínico Universitario, INCLIVA Research Institute, Valencia, Spain.
- 3- Department of Medicine, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain.
- 4- Hematology Service, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain.
- 5- Hematology Service, Hospital Universitario Politécnico "La Fe", Valencia, Spain.
- 6- Hematology Service, Hospital Morales Meseguer, Murcia, Spain.
- 7- Department of Hematology, Vall d'Hebron Institute of Oncology (VHIO), Vall d'Hebron Hospital Universitari, Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus, Barcelona, Spain.
- 8- Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain.
- 9- Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

### Contribución del aspirante:

Carlos Solano de la Asunción se encargó del diseño de la base de datos, de la recogida de muestras llevó a cabo la mayor parte del trabajo analítico, y colaboró en el análisis de los datos, la interpretación de los resultados y la revisión final del texto.

### Factor impacto de la revista

5,1

## Tercer artículo

Cytomegalovirus DNAemia in haematological patients undergoing CD19-directed chimeric antigen receptor T-cell therapy: should it be systematically monitored? Clin Microbiol Infect. 2023 Aug;29(8):1093-1095. doi: 10.1016/j.cmi.2023.05.010

Carlos Solano de la Asunción <sup>1</sup>, Rafael Hernani <sup>2</sup>, Eliseo Albert <sup>1</sup>, María Dolores Gómez <sup>3</sup>, Estela Giménez <sup>4</sup>, Ana Benzaquén <sup>2</sup>, Eva María González-Barberá <sup>3</sup>, Juan Carlos Hernández-Boluda <sup>5</sup>, Ariadna Pérez <sup>2</sup>, José Luis Piñana <sup>2</sup>, Pedro Choro <sup>6</sup>, Manuel Guerreiro <sup>6</sup>, Juan Montoro <sup>6</sup>, Jaime Sanz <sup>6</sup>, Carlos Solano <sup>5</sup>, David Navarro <sup>7</sup>.

- 1- Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Instituto De Investigación Sanitaria (INCLIVA Health Research Institute), Valencia, Spain.
- 2- Hematology Service, Hospital Clínico Universitario, Instituto De Investigación Sanitaria (INCLIVA Health Research Institute), Valencia, Spain.
- 3- Microbiology Service, Hospital Universitario y Politécnico "La Fe", Valencia, Spain.
- 4- Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Instituto De Investigación Sanitaria (INCLIVA Health Research Institute), Valencia, Spain; Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.
- 5- Hematology Service, Hospital Clínico Universitario, Instituto De Investigación Sanitaria (INCLIVA Health Research Institute), Valencia, Spain; Department of Medicine, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain.
- 6- Hematology Service, Hospital Universitario y Politécnico "La Fe", Valencia, Spain.
- 7- Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Instituto De Investigación Sanitaria (INCLIVA Health Research Institute), Valencia, Spain; Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain.

## Contribución del aspirante:

Carlos Solano de la Asunción desarrolló el componente analítico del trabajo, participó activamente en el procesamiento de los datos, en la discusión de los hallazgos y en la corrección del manuscrito final.

## Factor impacto de la revista

10,9

## Cuarto artículo

Assessment of the potential value of plasma Torque Teno virus DNA load monitoring to predict citomegalovirus DNAemia in patients with hematological malignancies treated with small molecule inhibitors: A proof-of-concept study. J Med Virol. 2023 Jul;95(7):e28933. doi: 10.1002/jmv.28933

Carlos Solano de la Asunción 1, Estela Giménez 1 2, Juan Carlos Hernández-Boluda 3, María José Terol 3 4, Eliseo Albert 1, Javier López 5, Valentín García-Gutiérrez 5, Rafael Andreu 6, María Dolores García Malo 7, María Laura Fox 8, María José Remigia 3, Paula Amat 3, Carlos Solano 3 4, David Navarro 1 2 9.

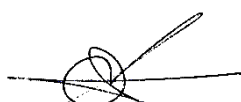
- 1- Microbiology Service, INCLIVA Research Institute, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain.
- 2- Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.
- 3- Hematology Service, INCLIVA Research Institute, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain.
- 4- Department of Medicine, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain.
- 5- Hematology Service, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain.
- 6- Hematology Service, Hospital Universitario Politécnico "La Fe", Valencia, Spain.
- 7- Hematology Service, Hospital Morales Meseguer, Murcia, Spain.
- 8- Department of Hematology, Vall d'Hebron Institute of Oncology (VHIO), Vall d'Hebron Hospital Universitari, Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus, Barcelona, Spain.
- 9- Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain.

## Contribución del aspirante:

Carlos Solano de la Asunción se encargó de la recogida de muestras, asumió gran parte del análisis técnico, colaboró en la interpretación de los resultados, en el tratamiento de los datos y participó en la revisión final del documento.

## Factor impacto de la revista

6,8



Fdo. Eliseo Albert Vicent

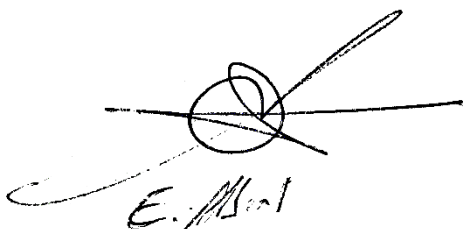


Fdo. David Navarro Ortega

## **Informe del director y codirector de la Tesis Doctoral sobre la coautoría de las publicaciones compendiadas en Tesis Doctoral**

En virtud del artículo 8.1.a del Reglamento sobre depósito, evaluación y defensa de la Tesis Doctoral de la Universidad de Valencia, vigente desde el 11 de febrero de 2012, se presenta el presente documento con el propósito de dejar constancia de que el doctorando, Carlos Solano de la Asunción, ha llevado a cabo la mayor parte de los trabajos analíticos incluidos en esta tesis doctoral, ha participado activamente en los análisis estadísticos y ha revisado y aprobado los textos finales.

Asimismo, se certifica que ni el doctorando, Carlos Solano de la Asunción, ni ninguno de los coautores ha empleado, de manera implícita o explícitamente, los artículos recopilados en esta tesis para la elaboración de otras tesis doctorales.

A handwritten signature in black ink, featuring a large, stylized 'E' and 'A' intertwined, with a horizontal line crossing through the middle.

Fdo. Eliseo Albert Vicent

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, bold 'D' with a vertical line through its center, followed by a long, sweeping horizontal stroke.

Fdo. David Navarro Ortega



## **TRABAJOS PUBLICADOS O ACEPTADOS**



## Cytomegalovirus-specific T-cell immunity and DNAemia in patients with chronic lymphocytic leukaemia undergoing treatment with ibrutinib

Ibrutinib has become standard of care for treatment of high-risk and relapsed refractory chronic lymphocytic leukaemia (CLL).<sup>1</sup> Ibrutinib targets Bruton tyrosine kinase (BTK), which plays a major role in B- and T-cell proliferation and survival<sup>2</sup> and recognition of infectious agents by the innate immune system.<sup>3</sup> Ibrutinib therapy has been associated with an increased incidence of several opportunistic infections, especially in the first 6–12 months after therapy initiation,<sup>4–7</sup> among which cytomegalovirus (CMV) end-organ disease has been anecdotally reported.<sup>8</sup> Nevertheless, little is known about the biology of CMV in ibrutinib-treated patients. In our opinion, this is a relevant topic to explore in light of the well-established association between the CMV DNAemia and increased overall mortality in allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients,<sup>9</sup> which may potentially stand in other clinical settings. In the present multicentre observational study, we evaluated the rate and kinetics of CMV DNAemia and prospectively assessed CMV-specific functional cluster of differentiation 8 (CD8)<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-cell immunity over a 6-month period in 23 consecutive adult patients with CMV-seropositive CLL [median (range) age, 69 (48–86) years; 16 males; Table I] treated with ibrutinib in monotherapy. Ibrutinib treatment was initiated as first-line therapy in 14 patients. The remaining nine patients had been treated with one or more chemotherapy schemes, developed relapsed/refractory disease, and were subsequently started on ibrutinib therapy (Table I). As detailed below, immunological assays were performed within a week prior to ibrutinib initiation (baseline) and on days 30, 60, 90, 120, 150 and 180 afterwards. CMV DNA monitoring in plasma was performed at baseline and on days 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150 and 180 after starting ibrutinib using a highly-sensitive (limit of detection 31 iu/ml) real-time polymerase chain reaction (PCR) for CMV (RealTime CMV PCR; Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA).<sup>10</sup> We detected plasma CMV DNAemia in seven of 23 patients (30.4%) within days 15–45 after ibrutinib initiation (Table I). One patient had CMV DNAemia at baseline. In most cases (five of seven; 71.4%) episodes of CMV DNAemia were blips (a single PCR-positive plasma specimen). The remaining two patients had three or four consecutive plasma specimens with detectable CMV DNA. The plasma CMV DNA peak load was <210 iu/ml in all patients. Most patients with CMV DNAemia (seven of eight) had not been previously treated with chemotherapy regimens. All CMV

DNAemia episodes cleared spontaneously, and no patients developed either recurrent CMV DNAemia or CMV end-organ disease within the study period.

The CMV-specific interferon-gamma (IFN- $\gamma$ )-producing CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells were enumerated by flow cytometry for intracellular cytokine staining as previously described.<sup>11</sup> Two sets of 15-mer overlapping peptides encompassing the whole sequence of CMV pp65 and IE-1 proteins were used in combination for stimulation. Negative (dimethyl sulfoxide/phosphate-buffered saline) and positive (phytohemagglutinin, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) controls were run in all experiments. The total number of CD69<sup>+</sup>-expressing, IFN- $\gamma$ -producing CMV-specific CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells was calculated by multiplying the corresponding percentage of CMV-specific T cells (after background subtraction) by the absolute number of CD8<sup>+</sup> T and CD4<sup>+</sup> T cells. Specific (detectable) responses were those >0.1% for each population. At baseline, >80% of patients had detectable CMV-specific T-cell immunity (CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> or both), a figure close to that found in healthy CMV-seropositive individuals,<sup>11</sup> suggesting conserved CMV-specific T-cell immunity in patients with CLL, in line with previous findings.<sup>12</sup> CMV DNAemia occurrence could not be anticipated on the basis of baseline CMV-specific T-cell count (the rate and magnitude of the two T-cell subsets were similar across patients who did or did not go on to develop CMV DNAemia). Overall, the percentage of patients displaying detectable CMV-specific T-cell responses fluctuated over time, but was consistently lower by the end of the study period (Fig 1A,B, and Table SI). Occurrence of CMV DNAemia appeared to directly impact on detectable CMV-specific CD8<sup>+</sup> T-cell response rate, but not on the rate of CD4<sup>+</sup> T-cell responses (Table SI). The median CMV-specific IFN- $\gamma$  CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-cell peak values were higher, yet not significantly different, in patients with previous CMV DNAemia than in patients in whom viral DNAemia was not detected (Fig 1). Moreover, expansion of CMV-specific CD8<sup>+</sup> T cells, and to a lesser extent CMV-specific CD4<sup>+</sup> T cells, following detection of CMV DNAemia was demonstrated in six of the eight patients (Fig 1C for a representative example).

To our knowledge, only one study has been published assessing CMV-specific T-cell responses in patients ( $n = 12$ ) treated with ibrutinib.<sup>13</sup> By using human leucocyte antigen (HLA)-peptide tetramer staining and viral peptide

Table 1. Study patients' demographic, clinical, virological, and immunological characteristics.

| Patient code | Age, years | Sex | Prior treatment                                                      | CMV DNAemia (day of detection after ibrutinib initiation) | CMV DNA peak load in iu/ml (day after ibrutinib initiation) | CMV Blip | Baseline CMV-specific CD8 <sup>+</sup> T cells, cells/ $\mu$ l | Baseline CMV-specific CD4 <sup>+</sup> T cells, cells/ $\mu$ l |
|--------------|------------|-----|----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|----------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| 1            | 83         | F   | Bendamustine                                                         | No                                                        |                                                             |          | 0.59                                                           | 5.27                                                           |
| 2            | 57         | M   | No                                                                   | Yes (30)                                                  | 31 (30)                                                     | Yes      | 19.27                                                          | 0                                                              |
| 3            | 55         | F   | No                                                                   | No                                                        |                                                             |          |                                                                |                                                                |
| 4            | 49         | M   | No                                                                   | No                                                        |                                                             |          |                                                                |                                                                |
| 5            | 69         | M   | No                                                                   | Yes (45)                                                  | 31 (45)                                                     | Yes      | 15.93                                                          | 10.11                                                          |
| 6            | 72         | M   | No                                                                   | No                                                        |                                                             |          | 0                                                              | 0                                                              |
| 7            | 86         | M   | Chlorambucil + rituximab/bendamustine                                | No                                                        |                                                             |          | 0.73                                                           | 27.78                                                          |
| 8            | 48         | M   | No                                                                   | No                                                        |                                                             |          |                                                                |                                                                |
| 9            | 78         | F   | Cyclophosphamide + rituximab                                         | Yes (45)                                                  | 41 (45)                                                     | Yes      |                                                                |                                                                |
| 10           | 55         | M   | R-CHOP scheme/rituximab/chlorambucil + prednisone                    | No                                                        |                                                             |          | 0.80                                                           | 15.61                                                          |
| 11           | 69         | F   | Bendamustine/obinutuzumab                                            | No                                                        |                                                             |          |                                                                |                                                                |
| 12           | 65         | M   | Fludarabine + cyclophosphamide + rituximab/bendamustine              | No                                                        |                                                             |          | 0                                                              | 0                                                              |
| 13           | 66         | M   | No                                                                   | Yes (15)                                                  | 165 (15)                                                    | No       | 0                                                              | 3.22                                                           |
| 14           | 84         | M   | No                                                                   | Yes (45)                                                  | 31 (45)                                                     | Yes      | 13.47                                                          | 59.18                                                          |
| 15           | 76         | M   | Fludarabine + cyclophosphamide + rituximab/bendamustine/obinutuzumab | No                                                        |                                                             |          | 0                                                              | 0                                                              |
| 16           | 68         | M   | No                                                                   | Yes (30)                                                  | 31 (30) and 206 (90)                                        | Yes/No   | 26.1                                                           | 0.07                                                           |
| 17           | 53         | M   | No                                                                   | No                                                        |                                                             |          | 69.97                                                          | 5.80                                                           |
| 18           | 84         | F   | No                                                                   | Yes (baseline)                                            | 31 (baseline)                                               | Yes      | 2.87                                                           | 79.14                                                          |
| 19           | 66         | M   | No                                                                   | No                                                        |                                                             |          | 14.20                                                          | 2.80                                                           |
| 20           | 76         | M   | No                                                                   | Yes (30)                                                  | 31 (30)                                                     | Yes      | 0                                                              | 0                                                              |
| 21           | 82         | F   | Fludarabine + cyclophosphamide + rituximab                           | No                                                        |                                                             |          | 0.18                                                           | 0.61                                                           |
| 22           | 73         | M   | Bendamustine/rituximab                                               | No                                                        |                                                             |          | 5.08                                                           | 10.09                                                          |
| 23           | 54         | F   | No                                                                   | No                                                        |                                                             |          | 29.57                                                          | 0                                                              |

CMV, cytomegalovirus; F, female; M, male.

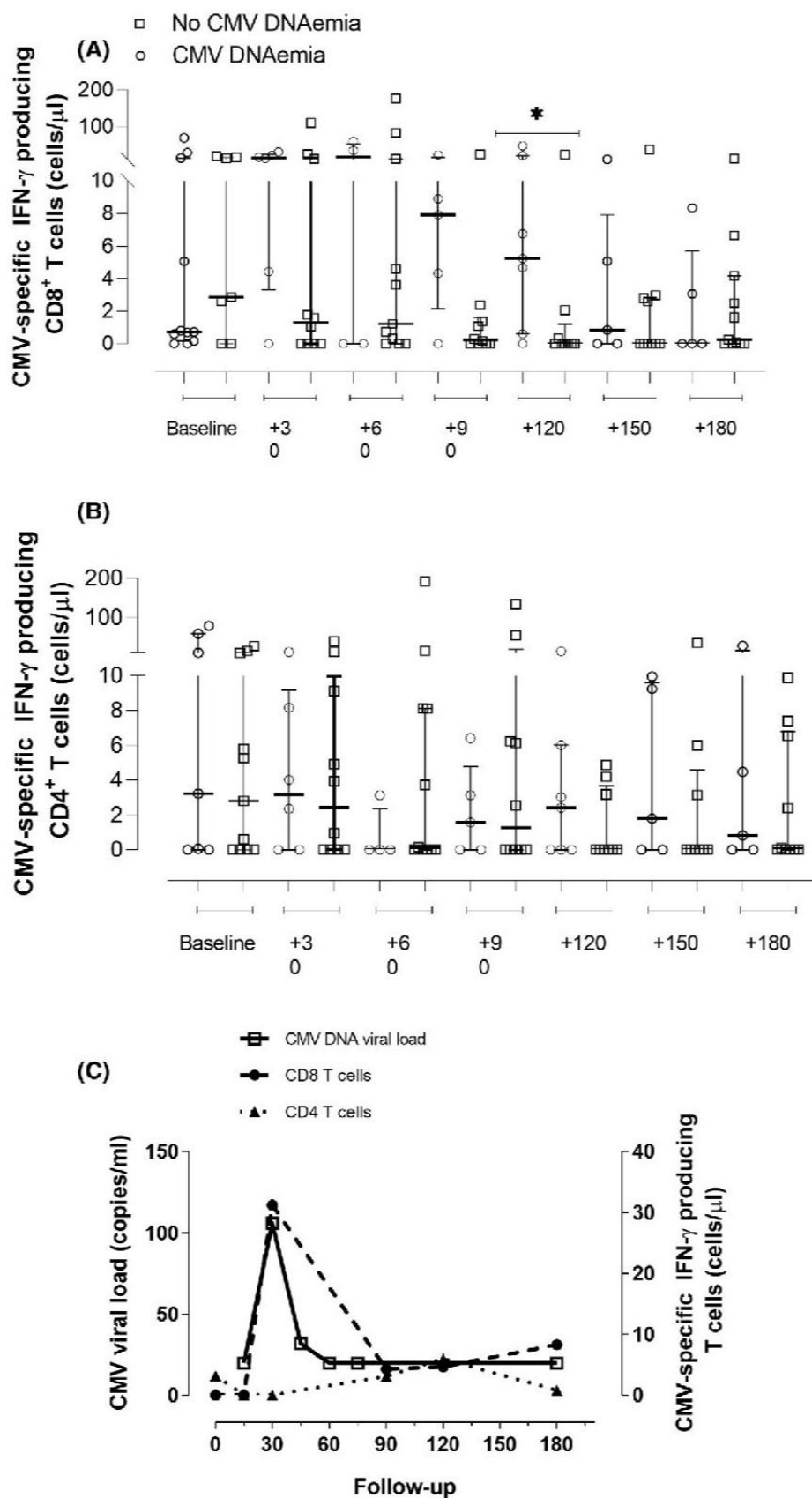


Fig 1. Cytomegalovirus (CMV; pp65/IE-1)-specific CD69<sup>+</sup>/interferon-gamma (IFN- $\gamma$ )-producing CD8<sup>+</sup> (A) and CD4<sup>+</sup> (B) T cells at baseline and at different time points after ibrutinib initiation in patients with CLL with or without documented CMV DNAemia. Differences between medians (for unpaired data) were compared using the Mann-Whitney *U*-test. A *P* < 0.05 was considered statistically significant. As indicated, differences between medians only reached statistical significance for CMV-specific CD8<sup>+</sup> T cells enumerated by day 120 after ibrutinib administration. Occurrence of CMV DNAemia was associated with an expansion of CMV-specific T cells, mostly involving CD8<sup>+</sup> T cells (C).

stimulation, the authors documented a decrease in the frequency of CMV-specific T cells during ibrutinib treatment, although the ability of CMV-specific T cells to secrete IFN- $\gamma$  and tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) upon antigenic stimulation appeared to increase.<sup>13</sup> Although our present data partly concur with the above-mentioned study,<sup>13</sup> the timing of immunological assessment after ibrutinib initiation varied significantly between studies (within 6 months in ours and at a median of 21 months in theirs). In addition, no virological data were reported,<sup>3</sup> so the potential impact of CMV DNAemia on CMV-specific T-cell responses could not be gauged.

The present study has two major limitations: first, its small sample size, and second, the lack of available specimens at different scheduled time points.

In summary, CMV DNAemia is a relatively frequent event in patients with CLL treated with ibrutinib, although it resolves spontaneously without the need for antiviral therapy, and does not lead to end-organ disease, at least in our present series. Although speculative, this figure may not differ substantially from those in patients with CLL undergoing conventional chemotherapy, given a previous study in which 17% of patients had active CMV infection documented by pp65 antigenemia assay,<sup>14</sup> a notably less sensitive method than the real-time PCR used in the present study.<sup>15</sup> Furthermore, our present data suggest that despite a decrease in the frequency of detectable CMV-specific T-cell responses during the first 6 months after ibrutinib inception, patients are capable of expanding functional (IFN- $\gamma$ ) CMV-specific T cells upon antigenic stimulus, which likely accounts for the short duration of CMV DNAemia episodes.

## Funding information

This research was supported by grant from the Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain (FIS PI18/00127).

## Acknowledgements

David Navarro and María José Terol conceived of the presented idea. María José Terol, Ana Saus, Javier López-Jiménez, Rafael Andreu, Dolores García and Laura Fox attended the patients and contributed to the correct handling and shipment of samples. María José Remigia, Paula Amat, Carlos Solano de la Asunción, María José Terol and Estela Giménez carried out the experiments. Carlos Solano, Eliseo Albert, Carlos Solano de la Asunción and Estela Giménez analysed the data. Carlos Solano de la Asunción and David Navarro wrote the draft of the manuscript and all the authors contributed to the final version of the manuscript. Estela Giménez holds a Juan Rodés research contract from the Carlos III Health Institute (Ref.JR18/00053). Eliseo Albert holds a Río Hortega research contract from the Carlos III Health Institute (Ref.CM18/00221).

Carlos Solano de la Asunción<sup>1</sup>

María José Terol<sup>2,3</sup>

Ana Saus<sup>2</sup>

Beatriz Olea<sup>1</sup>

Estela Giménez<sup>1</sup>

Eliseo Albert<sup>1</sup>

Javier López-Jiménez<sup>4</sup>

Rafael Andreu<sup>5</sup>

Dolores García<sup>6</sup>

Laura Fox<sup>7</sup>

María José Remigia<sup>2</sup>

Paula Amat<sup>2,3</sup>

Carlos Solano<sup>2,3</sup> 

David Navarro<sup>1,8</sup> 

<sup>1</sup>Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, INCLIVA Research Institute, <sup>2</sup>Hematology Service, Hospital Clínico Universitario, INCLIVA Research Institute, <sup>3</sup>Department of Medicine, School of Medicine, University of Valencia, <sup>4</sup>Hematology Service, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, <sup>5</sup>Hematology Service, Hospital Universitario Politécnico "La Fe", Valencia, <sup>6</sup>Hematology Service, Hospital Morales Meseguer, Murcia, <sup>7</sup>Hematology Service, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona and <sup>8</sup>Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain.

E-mail: david.navarro@uv.es

**Keywords:** CMV, CMV DNAemia, CMV CD8<sup>+</sup> T cells, CMV CD4<sup>+</sup> T cells, chronic lymphocytic leukaemia, ibrutinib

## Supporting Information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

**Table S1.** Enumeration of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells in patients undergoing treatment with ibrutinib either with or without detectable CMV DNAemia.

## References

1. Brown JR. How I treat CLL patients with ibrutinib. *Blood*. 2018;131:379–86.
2. Wen T, Wang J, Shi Y, Qian H, Liu P. Inhibitors targeting Bruton's tyrosine kinase in cancers: drug development advances. *Leukemia*. 2021;35:312–32.
3. Weber AN, Bittner Z, Liu X, Dang TM, Radsak MP, Brunner C. Bruton's tyrosine kinase: an emerging key player in innate immunity. *Front Immunol*. 2017;8:1454.
4. Varughese T, Taur Y, Cohen N, Palomba ML, Seo SK, Hohl TM, et al. Serious infections in patients receiving ibrutinib for treatment of lymphoid cancer. *Clin Infect Dis*. 2018;67:687–92.
5. Ruiz-Camps I, Aguilar-Company J. Risk of infection associated with targeted therapies for solid organ and hematological malignancies. *Ther Adv Infect Dis*. 2021;8:2049936121989548.
6. Tillman BF, Pauff JM, Satyanarayana G, Talbott M, Warner JL. Systematic review of infectious events with the Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib in the treatment of hematologic malignancies. *Eur J Haematol*. 2018;100:325–34.

7. Ball S, Das A, Vutthikraivit W, Edwards PJ, Hardwicke F, Short NJ, Borthakur G, Maiti A. Risk of infection associated with ibrutinib in patients with B-cell malignancies: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2020;**20**:87–97.e5.
8. Reddy Y, Baig M, Kalva N, Puli S, Dhillon S. Cytomegalovirus proctitis in a patient with chronic lymphocytic leukemia on ibrutinib therapy: a case report. *Cureus*. 2020;**12**:e7837.
9. Giménez E, Torres I, Albert E, Piñana JL, Hernández-Boluda JC, Solano C, et al. Cytomegalovirus (CMV) infection and risk of mortality in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (Allo-HSCT): a systematic review, meta-analysis, and meta-regression analysis. *Am J Transplant*. 2019;**9**:2479–94.
10. Clari MA, Bravo D, Costa E, Muñoz-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. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;**75**:207–9.
11. Solano C, Benet I, Clari MA, Nieto J, de la Cámara R, López J, et al. Enumeration of cytomegalovirus-specific interferon- $\gamma$  CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells early after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk of active cytomegalovirus infection. *Haematologica*. 2008;**93**:1434–6.
12. te Raa GD, Pascutti MF, García-Vallejo JJ, Reinen E, Remmerswaal EB, ten Berge IJ, et al. CMV-specific CD8<sup>+</sup> T-cell function is not impaired in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014;**123**:717–24.
13. Parry HM, Mirajkar N, Cutmore N, Zuo J, Long H, Kwok M, et al. Long-Term Ibrutinib therapy reverses CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion in B cell chronic lymphocytic leukaemia. *Front Immunol*. 2019;**10**:2832.
14. Han XY. Epidemiologic analysis of reactivated cytomegalovirus antigenemia in patients with cancer. *J Clin Microbiol*. 2007;**45**:1126–32.
15. Gimeno C, Solano C, Latorre JC, Hernández-Boluda JC, Clari MA, Remigia MJ, et al. Quantification of DNA in plasma by an automated real-time PCR assay (cytomegalovirus PCR kit) for surveillance of active cytomegalovirus infection and guidance of preemptive therapy for allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *J Clin Microbiol*. 2008;**46**:3311–8.

## LETTER TO THE EDITOR

# Immunobiology of cytomegalovirus infection in patients with haematological malignancies undergoing treatment with small molecule inhibitors

Molecular targeting agents comprising highly specific small molecules such as antiapoptotic B-cell lymphoma 2 protein inhibitors (venetoclax), multiple tyrosine kinase inhibitors (TKI) (i.e. dasatinib) and intracellular Janus kinase (JAK) signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway inhibitors (i.e. ruxolitinib) are potent drugs currently used to treat a number of haematological malignancies.<sup>1</sup> Infections of any grade due to a variety of microorganisms have been documented to occur at variable frequencies in patients treated with these drugs.<sup>2</sup> In this context, cytomegalovirus (CMV) end-organ diseases, including retinitis, pneumonitis and colitis, has been anecdotally reported.<sup>3–5</sup> Nevertheless, there is scarce information as to how these treatments impact on the immunobiology of CMV infection,<sup>6</sup> a plausible line of research given their pleiotropic effects on B- and T-cell-mediated immunity.<sup>2</sup> In this context, dasatinib-induced T-cell or NK-cell large granular lymphocyte (LGL) expansions, which appear to associate with long-lasting therapeutic responses in patients with advanced leukaemia, were reported to be linked with CMV reactivation and high frequencies of CMV-specific T cells targeting an immunodominant epitope on CMV pp65.<sup>7</sup> To further address this issue, in this multicentre, prospective, observational study, we enrolled 36 adult ( $\geq 18$  years old) CMV-seropositive patients (at baseline) with haematologic malignancies (Table 1) who were administered venetoclax ( $n = 8$ ; group 1), BCR-ABL1 TKIs ( $n = 7$ ; group 2) or ruxolitinib ( $n = 21$ ; group 3) as first-line therapy or after conventional chemotherapy between January 2019 and January 2022 at Hospital Clínico Universitario of Valencia ( $n = 15$ ), Hospital Politécnico Universitario La Fe, Valencia ( $n = 9$ ), Hospital Ramón y Cajal, Madrid ( $n = 5$ ), Hospital Vall d'Hebrón, Barcelona ( $n = 5$ ) and Hospital Morales Meseguer, Murcia ( $n = 2$ ), all in Spain. The study period comprised the first 180 days after treatment initiation. The current study was approved by the respective Clinical Research Ethics Committees (CEIC) of the participating centres. Informed consent was obtained from all participants.

Monitoring of plasma CMV DNA load was conducted on a biweekly basis until day 90+ after treatment initiation and monthly from day +90 until day +180 by the CMV RealTime CMV polymerase chain reaction (PCR) (Abbott Molecular). As per local guidelines, no patient testing positive for CMV

DNA in plasma was started on pre-emptive antiviral therapy. A total of 20/36 patients (55%) developed one ( $n = 12$ ) or two (recurrences;  $n = 8$ ) episodes of CMV DNAemia within the study period, the initial one occurring at a median of 30 days after treatment initiation (range, 0–150) (Table 1). Three patients had CMV DNAemia at baseline. Of the 28 detected episodes of CMV DNAemia, 14, developing in 12 patients, were blips (single positive PCR result). All episodes cleared spontaneously. Patients undergoing treatment with BCR-ABL1 TKI (5/7) and ruxolitinib (12/21) had a higher incidence of CMV DNAemia than those receiving venetoclax (1/8) ( $p = 0.04$ ; chi-squared test). Median CMV DNA peak load was comparable across groups ( $p = 0.29$ ; Wilcoxon test) and in no case was higher than 182 iu/ml (Figure S1). No patient developed CMV end-organ disease. We next enumerated pp65/IE-1-reactive IFN $\gamma$ -producing CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells in whole blood by flow cytometry with intracellular cytokine staining (ICS), and quantified Tregs by days +30, +60, +90, +120, +150, and +180 after treatment initiation (Supplementary Material).<sup>8,9</sup>

As shown in Supplementary Table S1, at baseline, all but one patient with specimen available ( $n = 32$ ) had detectable CMV-specific CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> T cells or both. Furthermore, most patients had detectable CMV-specific T-cell responses over the study period. From a quantitative standpoint (Table 2), although both CMV-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells tended to fluctuate regardless of the therapy the patients received and varied widely across individuals, two relatively distinctive patterns were identified. First, patients undergoing treatment with BCR-ABL1 TKI appeared to display lower CMV-specific CD4<sup>+</sup> T-cell counts at all time points compared to those in patients treated with venetoclax or ruxolitinib, the differences reaching statistical significance over the first two months of treatment. Second, a trend towards decreasing CMV-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell counts over time was evident in patients treated with venetoclax or ruxolitinib, but not with BCR-ABL1 TKI. Importantly, median CMV-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells measured by days +30, +60, +90, +120, +150, and +180 did not differ significantly from those quantified at baseline in any study group (Supplementary Table S2).

We next assessed whether the occurrence of CMV DNAemia could be predicted on the basis of CMV-specific

TABLE 1 Demographic, clinical and virological features of patients

| Patient code | Age (years), sex | Infused drug | Underlying disease | Prior treatment                                    | CMV DNAemia (day of detection after treatment initiation) | CMV DNA peak load in iu/ml (day after treatment initiation) |
|--------------|------------------|--------------|--------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| 1            | 57, F            | Venetoclax   | CLL-B              | Bendamustine-rituximab                             | No                                                        |                                                             |
| 2            | 48, F            | Venetoclax   | CLL-B              | Bendamustine-rituximab, cyclophosphamide-rituximab | No                                                        |                                                             |
| 3            | 81, M            | Venetoclax   | CLL-B              | No                                                 | Yes (30)                                                  | 126 (120)                                                   |
| 4            | 74, M            | Venetoclax   | CLL-B              | Bendamustine-rituximab                             | No                                                        |                                                             |
| 5            | 71, F            | Venetoclax   | CLL-B              | Bendamustine-rituximab                             | No                                                        |                                                             |
| 6            | 75, M            | Venetoclax   | CLL-B              | Bendamustine-rituximab                             | No                                                        |                                                             |
| 7            | 49, M            | Venetoclax   | CLL-B              | FCM-rituximab, bendamustine-rituximab              | No                                                        |                                                             |
| 8            | 79, M            | Venetoclax   | CLL-B              | Bendamustine-rituximab                             | No                                                        |                                                             |
| 9            | 62, M            | Dasatinib    | CML                | No                                                 | Yes (75)                                                  | 30 (90)                                                     |
| 10           | 52, M            | Dasatinib    | CML                | Imatinib                                           | No                                                        |                                                             |
| 11           | 66, F            | Bosutinib    | CML                | No                                                 | Yes (baseline)                                            | 22 (15)                                                     |
| 12           | 69, M            | Ponatinib    | CML                | No                                                 | No                                                        |                                                             |
| 13           | 71, F            | Nilotinib    | CML                | No                                                 | Yes (150)                                                 | 98 (150)                                                    |
| 14           | 62, M            | Dasatinib    | CML                | No                                                 | Yes (15)                                                  | 88 (45)                                                     |
| 15           | 44, F            | Bosutinib    | CML                | No                                                 | Yes (150)                                                 | 15 (150)                                                    |
| 16           | 65, F            | Ruxolitinib  | PMF                | No                                                 | No                                                        |                                                             |
| 17           | 69, M            | Ruxolitinib  | MDS                | No                                                 | No                                                        |                                                             |
| 18           | 81, F            | Ruxolitinib  | MDS                | No                                                 | Yes (15)                                                  | 23 (75)                                                     |
| 19           | 65, M            | Ruxolitinib  | PV                 | No (hydroxyurea <sup>a</sup> , danazol)            | No                                                        |                                                             |
| 20           | 55, M            | Ruxolitinib  | PMF                | No                                                 | Yes (30)                                                  | 27 (30)                                                     |
| 21           | 72, M            | Ruxolitinib  | PMF                | No                                                 | Yes (45)                                                  | Yes (45)                                                    |
| 22           | 68, F            | Ruxolitinib  | MDS                | No                                                 | Yes (45)                                                  | 26 (45)                                                     |
| 23           | 93, M            | Ruxolitinib  | PV                 | No (hydroxyurea <sup>a</sup> )                     | Yes (45)                                                  |                                                             |
| 24           | 47, M            | Ruxolitinib  | PV                 | No                                                 | No                                                        |                                                             |
| 25           | 22, F            | Ruxolitinib  | PMF                | No                                                 | No                                                        |                                                             |
| 26           | 61, M            | Ruxolitinib  | PMF                | No                                                 | Yes (baseline)                                            | 52 (baseline)                                               |
| 27           | 59, F            | Ruxolitinib  | MDS                | No                                                 | Yes (90)                                                  | 50 (90)                                                     |
| 28           | 85, F            | Ruxolitinib  | MDS                | No (hydroxyurea <sup>a</sup> )                     | No                                                        |                                                             |
| 29           | 71, F            | Ruxolitinib  | MDS                | No                                                 | Yes (15)                                                  | 182 (15)                                                    |
| 30           | 55, M            | Ruxolitinib  | PMF                | No                                                 | No                                                        |                                                             |
| 31           | 59, M            | Ruxolitinib  | CML                | No (hydroxyurea <sup>a</sup> , danazol)            | No                                                        |                                                             |
| 32           | 71, F            | Ruxolitinib  | PV                 | No                                                 | No                                                        |                                                             |
| 33           | 67, M            | Ruxolitinib  | PMF                | No                                                 | Yes (60)                                                  | 22 (120)                                                    |
| 34           | 65, M            | Ruxolitinib  | PMF                | No                                                 | Yes (30)                                                  | 41 (180)                                                    |
| 35           | 86, F            | Ruxolitinib  | MDS                | No (hydroxyurea <sup>a</sup> )                     | Yes (60)                                                  | 15 (60)                                                     |
| 36           | 66, F            | Ruxolitinib  | MDS                | No (hydroxyurea <sup>a</sup> )                     | Yes (baseline)                                            | 21 (baseline)                                               |

Abbreviations: B-CLL, B-cell chronic lymphocytic leukaemia; CML, chronic myelocytic leukaemia; CMV, cytomegalovirus; F, female; M, male; MDS, myelodysplastic syndrome; PMF, primary myelofibrosis; PV, polycythaemia vera.

<sup>a</sup>Hydroxycarbamide.

T-cell counts; this could only be reasonably investigated in patients receiving ruxolitinib. Data are shown in Supplementary Table S3 and indicated that CMV-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell counts at baseline and day +30 were not significantly

different in patients with or without subsequent CMV DNAemia.

Treg counts were available from 185 blood samples from 32 patients, showing detectable levels in all but seven.

**TABLE 2** Enumeration of CMV-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells and regulatory T cells in patients across therapy groups

| CMV-specific CD4+ T cells and regulatory T cells at baseline and at follow-up |             |                              |         |                              |         |                              |         |                              |         |                              |         |                              |         |                              |         |
|-------------------------------------------------------------------------------|-------------|------------------------------|---------|------------------------------|---------|------------------------------|---------|------------------------------|---------|------------------------------|---------|------------------------------|---------|------------------------------|---------|
| Immunological parameter                                                       | Study group | Baseline                     |         | Day +30                      |         | Day +60                      |         | Day +90                      |         | Day +120                     |         | Day +150                     |         | Day +180                     |         |
|                                                                               |             | Median (range) in cell(s)/μL | p value | Median (range) in cell(s)/μL | p value | Median (range) in cell(s)/μL | p value | Median (range) in cell(s)/μL | p value | Median (range) in cell(s)/μL | p value | Median (range) in cell(s)/μL | p value | Median (range) in cell(s)/μL | p value |
| CMV-specific CD4+ T cells                                                     | Venetoclax  | 7.78 (0–118.2)               | 0.008   | 8.78 (0.13–17.96)            | 0.03    | 14.01 (1.47–113.0)           | 0.03    | 1.64 (0.34–9.56)             | 0.10    | 1.36 (0.25–63.04)            | 0.45    | 1.61 (0–7.30)                | 0.08    | 0.17 (0–9.88)                | 0.18    |
|                                                                               | TKIs        | 0.10 (0–2.26)                |         | 0.13 (0–4.04)                |         | 0.13 (0–1.03)                |         | 0.2 (0.07–0.55)              |         | 0.27 (0–5.90)                |         | 0 (0–0.24)                   |         | 0.50 (0–2.49)                |         |
|                                                                               | Ruxolitinib | 6.13 (0.07–78.06)            |         | 3.37 (0–69.99)               |         | 1.69 (0–123.22)              |         | 2.93 (0–43.56)               |         | 1.23 (0–66.09)               |         | 1.07 (0–20.59)               |         | 1.84 (0.38–23.1)             |         |
| CMV-specific CD8+ T cells                                                     | Venetoclax  | 4.41 (0.12–42.08)            | 0.43    | 1.49 (0.02–14)               | 0.46    | 4.02 (0.07–37.61)            | 0.69    | 4.14 (0.15–14.43)            | 0.04    | 2.25 (0.1–31.04)             | 0.16    | 0.45 (0.31–22.71)            | 0.52    | 0.87 (0.38–6.09)             | 0.26    |
|                                                                               | TKIs        | 0.52 (0–2.64)                |         | 0.17 (0–3.22)                |         | 0.63 (0.1–1.82)              |         | 0.06 (0–0.19)                |         | 0.18 (0.5–2.8)               |         | 0.11 (0.06–2.03)             |         | 0.21 (0.03–1.24)             |         |
|                                                                               | Ruxolitinib | 0.88 (0–54.69)               |         | 0.64 (0–35.55)               |         | 0.45 (0–6.68)                |         | 1.39 (0–23.19)               |         | 0.81 (0.1 (12.99)            |         | 0.5 (0–13.03)                |         | 0.28 (0–3.05)                |         |
| Regulatory T cells                                                            | Venetoclax  | 16.72 (6.87–183.14)          | 0.53    | 15.56 (2.65–26.85)           | 0.49    | 39.18 (8.05–169.5)           | 0.27    | 28.84 (0.47–292.74)          | 0.59    | 4.3 (1.02–468.33)            | 0.64    | 17.1 (2.82–75.28)            | 0.98    | 30.92 (4.76–66.3)            | 0.77    |
|                                                                               | TKIs        | 12.68 (0–88.73)              |         | 30.42 (7.44–47.76)           |         | 11.98 (3.75–76.59)           |         | 28.03 (17.82–36.16)          |         | 23.85 (6.1–103.32)           |         | 21.42 (0–37.12)              |         | 14.1 (0.47–70.37)            |         |
|                                                                               | Ruxolitinib | 16.6 (0.79–340.43)           |         | 8.84 (0.32–200.39)           |         | 10.13 (0–93.8)               |         | 9.38 (0–156.36)              |         | 23.56 (0.39–125.68)          |         | 12.83 (0.76–209.92)          |         | 18.86 (0.6–250.26)           |         |

Abbreviations: CMV, cytomegalovirus; TKI, tyrosine kinase inhibitors.

Regardless of the treatment group to which the patients belonged, Treg peripheral blood levels fluctuated over time, with no apparent association with time elapsed since treatment initiation (Table 2). Moreover, Treg levels were comparable across groups at all time points explored. This is consistent with data reported in previous studies.<sup>10,11</sup> Overall, Treg levels did not correlate with either CMV-specific CD4<sup>+</sup> (Spearman's rank test,  $\rho = -0.049$ ;  $p = 0.51$ ), or CD8<sup>+</sup> ( $\rho = -0.020$ ;  $p = 0.79$ ) T-cell counts.

In summary, CMV DNAemia occurred frequently in patients treated with BCR-ABL1 TKI and ruxolitinib mostly within the first two months after treatment initiation, and less commonly in patients treated with venetoclax, perhaps reflecting a more pronounced effect of the former two drugs on T-cell immune responses compared to the latter; thus, although BCR-ABL1 TKI and ruxolitinib may have a detrimental effect on CMV-specific T-cell responses, the magnitude of this effect is insufficient to prevent ultimate control of CMV replication. In fact, no patient in our series developed CMV end-organ disease. Our data on CMV-specific T-cell immunity seem to support this assumption. In line with our data, a previous study found that almost 50% and around 90% of patients treated with ruxolitinib for less or more than five years, respectively, displayed CMV-specific T-cell responses (measured by IFN- $\gamma$  ELISPOT assay) below the normal range, yet less than 10% of patients had detectable CMV DNAemia.<sup>6</sup>

The current study has a major limitation: its small sample size, which makes it merely exploratory. Furthermore, CMV-specific functional T-cell responses other than those targeting IE1 and pp65 and resulting in the secretion of IFN- $\gamma$  were not assessed. Lastly, given the CMV DNA monitoring schedule and the lack of available samples at several time points, some episodes of CMV DNAemia may have been overlooked. From a practical clinical view, our data do not support systematic CMV DNA monitoring in blood in these patients. Whether CMV DNAemia in these patients may mediate 'indirect effects' as seen in the allo-HSCT setting<sup>12,13</sup> should be thoroughly investigated.

## KEYWORDS

BCL-2 inhibitors, BCR-ABL1 inhibitors, CMV, CMV DNAemia, CMV T cells, PI-3K inhibitors

## ACKNOWLEDGEMENTS

Estela Giménez and Eliseo Albert hold a Juan Rodés research contract from the Carlos III Health Institute. Juan Carlos Hernández-Boluda, María José Terol, Carlos Solano and David Navarro designed the research and interpreted the data. Solano de la Asunción Carlos, Estela Giménez and Eliseo Albert, María José Remigia and Paula Amat performed analytical determinations. Solano de la Asunción Carlos and Eliseo Albert performed statistical analyses. Javier López-Jiménez, Rafael Andreu, Dolores García, and Laura Fox contributed to data collection and analysis. David Navarro wrote the manuscript. All authors reviewed and approved the final version of the manuscript.

## FUNDING INFORMATION

This research was supported by a grant from FIS PI18/00127 (Fondo de Investigaciones Sanitarias), Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain.

## CONFLICTS OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The anonymized dataset is available upon request.

## PATIENT CONSENT STATEMENT

Informed consent was obtained from all participants.

Solano de la Asunción Carlos<sup>1</sup>  
 Estela Giménez<sup>1</sup>  
 Juan Carlos Hernández-Boluda<sup>2,3</sup>  
 María José Terol<sup>2,3</sup>  
 Eliseo Albert<sup>1</sup>  
 Javier López-Jiménez<sup>4</sup>  
 Valentín García-Gutiérrez<sup>4</sup>  
 Rafael Andreu<sup>5</sup>  
 Dolores García<sup>6</sup>  
 María Laura Fox<sup>7</sup>  
 María José Remigia<sup>2</sup>  
 Paula Amat<sup>2</sup>  
 Carlos Solano<sup>2,3</sup>  
 David Navarro<sup>1,8,9</sup>

<sup>1</sup>Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, INCLIVA Research Institute, Valencia, Spain

<sup>2</sup>Hematology Service, Hospital Clínico Universitario, INCLIVA Research Institute, Valencia, Spain

<sup>3</sup>Department of Medicine, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

<sup>4</sup>Hematology Service, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain

<sup>5</sup>Hematology Service, Hospital Universitario Politécnico "La Fe", Valencia, Spain

<sup>6</sup>Hematology Service, Hospital Morales Meseguer, Murcia, Spain

<sup>7</sup>Department of Hematology, Vall d'Hebron Institute of Oncology (VHIO), Vall d'Hebron Hospital Universitari, Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus, Barcelona, Spain

<sup>8</sup>Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

<sup>9</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

## Correspondence

David Navarro, Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, and Department of Microbiology, School of Medicine, Av. Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia, Spain.  
 Email: david.navarro@uv.es

## ORCID

Juan Carlos Hernández-Boluda  <https://orcid.org/0000-0002-4289-3113>

Carlos Solano  <https://orcid.org/0000-0003-3702-0817>

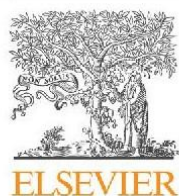
David Navarro  <https://orcid.org/0000-0003-3010-4110>

## REFERENCES

- Sochacka-Ćwikła A, Mączyński M, Regiec A. FDA-approved drugs for hematological malignancies-the last decade review. *Cancers* (Basel). 2021;14(1):87.
- Ruiz-Camps I, Aguilar-Company J. Risk of infection associated with targeted therapies for solid organ and hematological malignancies. *Ther Adv Infect Dis*. 2021;8:2049936121989548.
- Knoll BM, Seiter K. Infections in patients on BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor therapy: cases and review of the literature. *Infection*. 2018;46(3):409–18.
- von Hofsten J, Johnsson Forsberg M, Zetterberg M. Cytomegalovirus retinitis in patient who received Ruxolitinib. *N Engl J Med*. 2016;374(3):296–7.
- Yamauchi K, Inaba T, Colvin HS, Sakakihara I, Yamamoto K, Izumikawa K, et al. Dasatinib-induced colitis: clinical, endoscopic and histological findings. *Scand J Gastroenterol*. 2022;57(4):449–56.
- Rumi E, Sant'Antonio E, Cavalloni C, Comolli G, Ferretti VV, Cassaniti I, et al. Impaired virus-specific T cell responses in patients with myeloproliferative neoplasms treated with ruxolitinib. *Hematol Oncol*. 2020;38(4):554–9.
- Kreutzman A, Ladell K, Koehel C, Gostick E, Ekblom M, Stenke L, et al. Expansion of highly differentiated CD8+ T-cells or NK-cells in patients treated with dasatinib is associated with cytomegalovirus re-activation. *Leukemia*. 2011;25(10):1587–97.
- Solano C, Benet I, Clari MA, Nieto J, de la Cámara R, López J, et al. Enumeration of cytomegalovirus-specific interferongamma CD8+ and CD4+ T cells early after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk of active cytomegalovirus infection. *Haematologica*. 2008;93(9):1434–6.
- Huntley D, Giménez E, Pascual MJ, Vázquez L, Amat P, Remigia MJ, et al. Peripheral blood regulatory T cells and occurrence of cytomegalovirus DNAemia after unmanipulated haploidentical allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with posttransplant cyclophosphamide. *Bone Marrow Transplant*. 2020;55(7):1493–6.
- Wei X, He L, Wang X, Lin M, Dai J. Effects of dasatinib on CD8+T, Th1, and Treg cells in patients with chronic myeloid leukemia. *J Int Med Res*. 2020;48(2):300060519877321.
- Fei F, Yu Y, Schmitt A, Rojewski MT, Chen B, Greiner J, et al. Effects of nilotinib on regulatory T cells: the dose matters. *Mol Cancer*. 2010;9:22.
- Green ML, Leisenring W, Xie H, Mast TC, Cui Y, Sandmaier BM, et al. Cytomegalovirus viral load and mortality after haemopoietic stem cell transplantation in the era of pre-emptive therapy: a retrospective cohort study. *Lancet Haematol*. 2016;3(3):e119–27.
- Solano C, Vázquez L, Giménez E, de la Cámara R, Albert E, Rovira M, et al. Cytomegalovirus DNAemia and risk of mortality in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: analysis from the Spanish hematopoietic transplantation and cell therapy group. *Am J Transplant*. 2021;21(1):258–71.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.



## Letter to the Editor

## Cytomegalovirus DNAemia in haematological patients undergoing CD19-directed chimeric antigen receptor T-cell therapy: should it be systematically monitored?

Carlos Solano de la Asunción<sup>1</sup>, Rafael Hernani<sup>2</sup>, Eliseo Albert<sup>1</sup>, María Dolores Gómez<sup>3</sup>, Estela Giménez<sup>1,4</sup>, Ana Benzaquén<sup>2</sup>, Eva María González-Barberá<sup>3</sup>, Juan Carlos Hernández-Boluda<sup>2,5</sup>, Ariadna Pérez<sup>2</sup>, José Luis Piñana<sup>2</sup>, Pedro Chorao<sup>6</sup>, Manuel Guerreiro<sup>6</sup>, Juan Montoro<sup>6</sup>, Jaime Sanz<sup>6</sup>, Carlos Solano<sup>2,5</sup>, David Navarro<sup>1,4,7,\*</sup>

<sup>1</sup> Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Instituto De Investigación Sanitaria (INCLIVA Health Research Institute), Valencia, Spain

<sup>2</sup> Hematology Service, Hospital Clínico Universitario, Instituto De Investigación Sanitaria (INCLIVA Health Research Institute), Valencia, Spain

<sup>3</sup> Microbiology Service, Hospital Universitario y Politécnico "La Fe", Valencia, Spain

<sup>4</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>5</sup> Department of Medicine, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

<sup>6</sup> Hematology Service, Hospital Universitario y Politécnico "La Fe", Valencia, Spain

<sup>7</sup> Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 19 January 2023

Received in revised form

16 April 2023

Accepted 6 May 2023

Available online 13 May 2023

Editor: R. Chemaly

## Keywords:

B-cell lymphoma

CD19 CAR T-cell therapy

CMV DNAemia

CMV end-organ disease

Cytomegalovirus (CMV)

## To the editor,

Cytomegalovirus (CMV) DNAemia may develop in a large percentage (up to 45%) of CMV-seropositive patients undergoing CD19-directed chimeric antigen receptor T-cell therapy [1,2] and may contribute to worsen clinical outcomes [1]. Here by not administering preemptive antiviral therapy (PET) at low plasma

CMV DNA loads (<1500 IU/mL, following local standard practice guidelines) we could gain a further insight on the kinetics of CMV DNAemia in these patients. In this retrospective, observational study, 51 consecutive CMV-seropositive patients (median age, 62 years; range, 22–79; 26 male) were included (Table S1). This study was approved by the respective research ethics committees, and informed consent was obtained from participants.

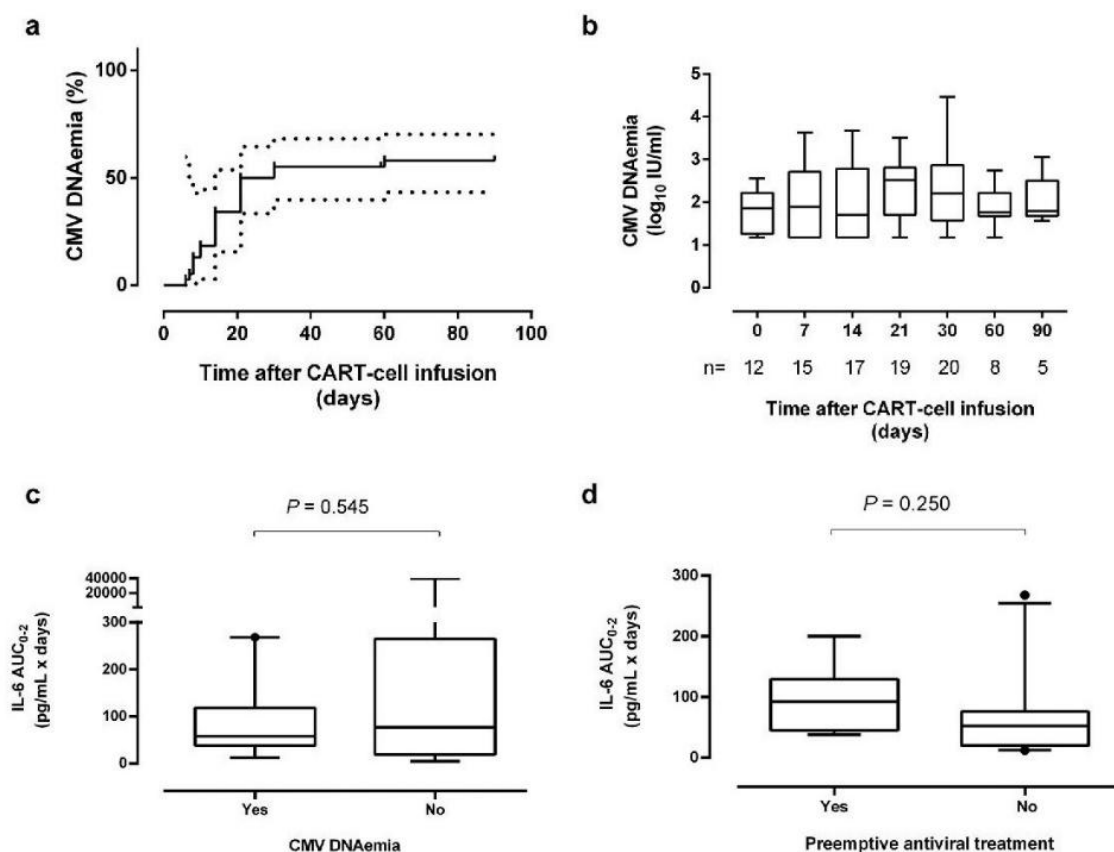
No patient in this series underwent anti-CMV prophylaxis. According to local guidelines, CMV DNAemia in plasma was planned to be monitored by days 0, 7, 14, 21, 30, 60, and 90 after cell infusion within 24 hrs after collection using real-time PCR assays, regardless of whether CMV DNAemia was detected or not. At both centres, PET with (val)ganciclovir at conventional doses was started on detection of CMV DNA load  $\geq 1500$  IU/mL, also following local protocols. The study period comprised the first 90 days after cell infusion.

A median of six plasma samples/patient (range, 2–7) were finally collected. Of the 51 patients, 12 (24%) displayed detectable CMV DNAemia at baseline; of the remaining 39 patients, 22 (56.4%) developed CMV DNAemia (at any level) after CAR T-cell infusion (cumulative incidence, 57.9%; 95% CI, 43.2–70.2%; Fig. 1(a)). Overall, median time to first detection of CMV DNA in plasma since CAR T-cell infusion was 14 days (range, 7–60; Fig. 1(b)), and median CMV DNA peak level was 96 IU/mL (range, 15–28887). Three out of 22 patients (13.6%) received PET. All initial CMV DNAemia episodes resolved within the study period. There were no diagnosed cases of CMV end-organ disease.

The frequency of CMV DNAemia detection post-CAR T cell reported herein is remarkably similar to that found in previous studies (around 45%) [1,2], despite between-study differences (i.e. monitoring frequency, limit of detection of the PCR assays

\* Corresponding author. David Navarro, Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario and Department of Microbiology, School of Medicine, Av. Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia, Spain.

E-mail address: [david.navarro@uv.es](mailto:david.navarro@uv.es) (D. Navarro).



**Fig. 1.** Incidence and features of CMV DNAemia in CMV-seropositive patients undergoing CD19 CAR T-cell therapy. Availability of at least two plasma samples for CMV DNAemia detection/quantitation drawn within 90 days after infusion was the only inclusion criterium. All 51 patients but one had three or more specimens collected. A median of six plasma samples/patient (range, 2–7) were finally collected. The real-time CMV PCR (Abbott Molecular) analyzed on an m2000rt platform was used at HCUV. The Argene CMV-R GENE (Biomerieux) run on StepOne, Rotor-Gene Q, CFX96 (BioRad) was employed at HUPLF. The limit of detection of the assays (in plasma) was 31.2 IU/mL for the Abbott assay and 190 IU/mL for the Biomerieux assay. A total of 18 out of 34 patients at Hospital Clínico Universitario de Valencia and four of 17 patients at Hospital Universitario Politécnico “La Fe” of Valencia developed CMV DNAemia (at any level) after CAR T-cell infusion (a) Cumulative incidence of CMV DNAemia developing within 90 days after CAR T-cell infusion was estimated using the statistical software R (<http://www.r-project.org/>). Death was treated as a competing risk event (b) CMV DNA loads measured in plasma at different monitoring time points. (c) Serum interleukin-6 (IL-6) area under a curve (AUC) between days 0 (baseline) and 2 after CAR T-cell infusion ( $AUC_{0-2}$ ) and subsequent occurrence of CMV DNAemia at any level in both participating centres. Medical charts were reviewed to gather patient laboratory data. All patients had at least three samples available for AUC calculations. (d) CMV DNAemia (both detected at baseline or after CAR T-cell therapy) reaching CMV DNA values  $\geq 1500$  IU/mL at HCUV (requiring preemptive antiviral therapy following local guidelines). AUC was calculated following the linear trapezoidal rule method with the aid of the STATGRAPHIC Centurion XVII statistics package (Statpoint Technologies, Inc). Medians were compared using the Mann-Whitney U test. Two-sided exact p-values are reported. A p-value  $<0.05$  was considered statistically significant. These analyses were performed using SPSS version 20.0 (SPSS). CAR, chimeric antigen receptors; CMV, cytomegalovirus; HCUV, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Spain; HUPLF, Hospital Universitario Politécnico La Fe Valencia Spain; SPSS, Statistical Package for the Social Sciences.

employed, the matrix used for CMV DNA monitoring—plasma vs. whole blood, and baseline patient's clinical condition). In our series, only axi-cel use was associated with CMV DNAemia occurring after CAR T-cell infusion (adjusted hazard ratio, 2.83; 95% CI, 1.14–6.96;  $p$  0.024; Table S2). Importantly, no significant differences regarding relevant pre- or post-CAR T-cell infusion characteristics were observed across patients treated either with axi-cel or tisa-cel, except for the need of bridging therapy (Table S3). The use of axi-cel has been associated with increased risk of cytokine release syndrome (CRS) resulting in a higher risk of infection [3]. Nevertheless, our observation is discrepant from data in previous studies [1,2] and thus warrants further investigation. In contrast to previous findings [1,2], neither advanced age nor use of corticosteroids (or total cumulative dose) or tocilizumab for treatment of CRS and/or immune effector cell-mediated neurotoxicity syndrome (ICANS) were identified as risk factors.

Among the 12 patients experiencing CMV DNAemia prior to CAR T-cell infusion, five (41.6%) were started on PET at a

median of 30 days (range, 14–90) after cell infusion. Median CMV DNA load at PET inception was 3514 IU/mL (range, 1565–4728). In line with previous findings [2], baseline CMV DNAemia was significantly associated with increased risk (hazard ratio, 29.71; 95% CI, 2.88–306.28;  $p$  0.004) of high plasma CMV DNA loads ( $\geq 1500$  IU/mL). Of note, patients experiencing CMV DNAemia prior to CAR T-cell infusion and those displaying it after infusion did not differ in baseline clinical characteristics (Table S4).

Inflammation triggers CMV reactivation [4]; we investigated whether IL-6 levels early after CAR T-cell infusion, before inception of tocilizumab, which may impact on IL-6 levels, could anticipate the occurrence of CMV DNAemia. To this end, we used the IL-6 load area under a curve (AUC) between days 0 and 2 ( $AUC_{0-2}$ ).  $AUC_{0-2}$  was comparable among patients developing or not developing CMV DNAemia at any level ( $p$  0.54; Fig. 1(c)) or  $\geq 1500$  IU/mL—requiring PET- (Fig. 1(d);  $p$  0.25). Consistent with these findings, high-grade CRS and ICANS [5] were not associated with an increased risk of

subsequent CMV DNAemia (Table S2). Discrepant results have been published on this issue [1,2].

The main limitation of the current study is its sample size and its retrospective design, with testing being performed according to clinical protocols and not consistently in all study participants. In addition, the frequency of CMV DNA monitoring beyond day 30 after cell infusion (once a month) was likely insufficient to capture all episodes of CMV DNAemia. Finally, two different PCR assays with distinct analytical performances were used.

In summary, CMV DNAemia occurred frequently in our patients, but resolved and did not lead to end-organ disease; nevertheless, it must be stressed that our cohort only included one patient with acute lymphoblastic leukaemia and a few patients with prior allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT), and the rates of clinically actionable CRS and ICANS were below what those reported in pivotal trials. According to our data, CMV-seropositive CAR T cell patients may benefit from systematic CMV DNAemia monitoring, in particular patients with CMV DNAemia detected at baseline.

#### Author contributions

CSdLA, RH, CS, and DN designed the study. CSdLA, RH, EG, EA, AB, JCH-B, AP, JLP, PCH, MG, JM, JS, and CS, collected and analysed the data. CSdLA, EA, and EG performed cytomegalovirus PCR assays at Hospital Clínico Universitario of Valencia; MDG and EMG-B performed cytomegalovirus PCR assays at Hospital Universitario Politécnico La Fe, Valencia. DN wrote the paper. All authors approved the final version of the manuscript.

#### Data sharing

For original, anonymized data, please contact the corresponding author (David.navarro@uv.es).

#### Transparency declaration

The authors declare that they have no conflicts of interest. This review and its authors received no funding support from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

#### Acknowledgements

Eliseo Albert (Juan Rodés Contract; JR20/00011) and Estela Giménez (Juan Rodés Contract, JR18/00053) hold contracts funded by the Health Institute Carlos III (co-financed by the European Regional Development Fund, ERDF/FEDER).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2023.05.010>.

#### References

- [1] Chen G, Herr M, Nowak J, Ho C, Almyroudis N, Attwood K, et al. Cytomegalovirus reactivation after CD19 CAR T-cell therapy is clinically significant. *Haematologica* 2023;108:615–20. <https://doi.org/10.3324/haematol.2022.281719>.
- [2] Márquez-Algaba E, Iacoboni G, Pernas B, Esperalba J, Los Arcos I, Navarro V, et al. Impact of cytomegalovirus replication in patients with aggressive B cell lymphoma treated with chimeric antigen receptor T cell therapy. *Transplant Cell Ther* 2022;28:851.e1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2022.09.007>.
- [3] Meir J, Abid MA, Abid MB. State of the CAR-T: risk of infections with chimeric antigen receptor T-cell therapy and determinants of SARS-CoV-2 vaccine responses. *Transplant Cell Ther* 2021;27:973–87. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2021.09.016>.
- [4] Humar A, St Louis P, Mazzulli T, McGeer A, Lipton J, Messner H, et al. Elevated serum cytokines are associated with cytomegalovirus infection and disease in bone marrow transplant recipients. *J Infect Dis* 1999;179:484–8. <https://doi.org/10.1086/314602>.
- [5] Lee DW, Santomasso BD, Locke FL, Ghobadi A, Turtle CJ, Brudno JN, et al. ASTCT consensus grading for cytokine release syndrome and neurologic toxicity associated with immune effector cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2019;25:625–38. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.12.758>.

# Assessment of the potential value of plasma Torque Teno virus DNA load monitoring to predict cytomegalovirus DNAemia in patients with hematological malignancies treated with small molecule inhibitors: A proof-of-concept study

Carlos Solano de la Asunción<sup>1</sup> | Estela Giménez<sup>1,2</sup> | Juan Carlos Hernández-Boluda<sup>3</sup> | María José Terol<sup>3,4</sup> | Eliseo Albert<sup>1</sup> | Javier López<sup>5</sup> | Valentín García-Gutiérrez<sup>5</sup> | Rafael Andreu<sup>6</sup> | María Dolores García Malo<sup>7</sup> | María Laura Fox<sup>8</sup> | María José Remigia<sup>3</sup> | Paula Amat<sup>3</sup> | Carlos Solano<sup>3,4</sup> | David Navarro<sup>1,2,9</sup> 

<sup>1</sup>Microbiology Service, INCLIVA Research Institute, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain

<sup>2</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>3</sup>Hematology Service, INCLIVA Research Institute, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain

<sup>4</sup>Department of Medicine, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

<sup>5</sup>Hematology Service, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain

<sup>6</sup>Hematology Service, Hospital Universitario Politécnico "La Fe", Valencia, Spain

<sup>7</sup>Hematology Service, Hospital Morales Meseguer, Murcia, Spain

<sup>8</sup>Department of Hematology, Vall d'Hebron Institute of Oncology (VHIO), Vall d'Hebron Hospital Universitari, Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus, Barcelona, Spain

<sup>9</sup>Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

## Correspondence

David Navarro, Department of Microbiology, Microbiology Service, School of Medicine, Hospital Clínico Universitario, Av. Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia, Spain.  
Email: david.navarro@uv.es

## Abstract

It is unknown whether Torque Teno virus (TTV) DNA load monitoring could anticipate the development of infectious events in hematological patients undergoing treatment with small molecular targeting agents. We characterized the kinetics of plasma TTV DNA in patients treated with ibrutinib or ruxolitinib and assessed whether TTV DNA load monitoring could predict the occurrence of Cytomegalovirus (CMV) DNAemia or the magnitude of CMV-specific T-cell responses. Multicenter, retrospective, observational study, recruiting 20 patients treated with ibrutinib and 21 with ruxolitinib. Plasma TTV and CMV DNA loads were quantified by real-time PCR at baseline and days +15, +30, +45, +60, +75, +90, +120, +150, and +180 after treatment inception. Enumeration of CMV-specific interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )-producing CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-cells in whole blood was performed by flow cytometry. Median TTV DNA load in ibrutinib-treated patients increased significantly ( $p = 0.025$ ) from baseline (median: 5.76 log<sub>10</sub> copies/mL) to day +120 (median: 7.83 log<sub>10</sub> copies/mL). A moderate inverse correlation ( $Rho = -0.46$ ;  $p < 0.001$ ) was found between TTV DNA load and absolute lymphocyte count. In ruxolitinib-treated patients, TTV DNA load quantified at baseline was not significantly different from that measured after treatment inception ( $p \geq 0.12$ ). TTV DNA load was not predictive of the subsequent occurrence of CMV DNAemia in either patient group. No correlation was observed between TTV DNA loads and CMV-specific IFN- $\gamma$ -producing CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-cell counts in either patient group. The data did not support the hypothesis that TTV DNA load monitoring in hematological patients treated with ibrutinib or ruxolitinib could be useful to predict either the

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

© 2023 The Authors. *Journal of Medical Virology* published by Wiley Periodicals LLC.

**Funding information**

This research was supported by a grant from FIS PI18/00127 (Fondo de Investigaciones Sanitarias), Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain)

occurrence of CMV DNAemia or the level of CMV-specific T-cell reconstitution; nevertheless, due to the small sample size, further studies involving larger cohorts are warranted to elucidate this issue.

**KEYWORDS**

CMV, CMV DNAemia, CMV-specific T-cells, Ibrutinib, ruxolitinib, TTV DNA load

## 1 | INTRODUCTION

Torque Teno viruses (TTV), first discovered in 1997,<sup>1</sup> are small, nonenveloped, circular, single-stranded negative-sense DNA viruses that belong to the *Anelloviridae* family.<sup>2</sup> TTV are seemingly apathogenic and represent a major component of the human blood virome,<sup>2–5</sup> which remains relatively stable over time in the immunocompetent host.<sup>6</sup> The TTV DNA load in the systemic compartment behaved as a surrogate marker of the net state of immunosuppression in a pivotal study recruiting solid organ transplant recipients (SOT),<sup>4</sup> which largely reflected the crucial role of adaptive T-cell immunity in the ultimate control of TTV replication.<sup>2</sup> A large body of experimental evidence gathered in the SOT setting supports the assumption that either high or increasing blood TTV DNA levels after transplantation associate with the occurrence of certain infectious events, whereas the opposite holds true for acute rejection.<sup>7–9</sup> In the allogeneic hematopoietic stem cell transplantation setting (allo-HSCT), the plasma TTV DNA load appears to correlate with the degree of T-cell reconstitution early after transplantation (<day 100), whereas it correlates with the level of immunosuppression afterward.<sup>10–12</sup> The potential utility of TTV DNA monitoring in blood to predict the occurrence of a variety of clinical events, including infections, response to vaccination, or mortality, has been suggested in settings other than transplantation, such as COVID-19 or patients with chronic arthritis undergoing biologic therapies.<sup>13–15</sup> Molecular targeting agents including Bruton Tyrosine Kinase inhibitors (i.e., ibrutinib) and intracellular Janus kinase (JAK) signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway inhibitors (i.e., ruxolitinib) are current first-line drugs used to treat several hematological malignancies.<sup>16</sup> Both drug types have a deleterious impact on immune system homeostasis, which appears to account for the increased incidence of opportunistic infections.<sup>17</sup> To our knowledge, there is no published information regarding the potential clinical value of TTV DNA load monitoring to anticipate the development of infectious events in patients treated with molecular targeting agents. Here, we profiled plasma TTV DNA load kinetics in hematological patients treated with ibrutinib or ruxolitinib and assessed whether TTV DNA load monitoring in these patients could predict the occurrence of Cytomegalovirus (CMV) DNAemia, an event frequently developed in these patients,<sup>18,19</sup> as may be the case in SOT and allo-HSCT recipients.<sup>12,20</sup>

## 2 | PATIENTS AND METHODS

### 2.1 | Patients

In this multicenter, retrospective, observational study, we enrolled 41 adult ( $\geq 18$  years old) patients between January 2019 and January 2022 at Hospital Clínico Universitario of Valencia ( $n = 23$ ), Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia ( $n = 9$ ), Hospital Ramón y Cajal, Madrid ( $n = 5$ ), Hospital Vall d'Hebrón, Barcelona ( $n = 3$ ), and Hospital Morales Meseguer, Murcia ( $n = 1$ ), all in Spain. All patients were CMV-seropositive (at baseline) with hematologic malignancies that were treated with ibrutinib ( $n = 20$ , all with B cell chronic lymphocytic leukemia; median age: 70 years; range: 48–86) or ruxolitinib ( $n = 21$ ; median age: 65 years; range: 22–93) as first-line therapy or after conventional chemotherapy. Relevant patient characteristics were previously reported<sup>18,19</sup> and are summarized in Table 1. The study period comprised the first 180 days after treatment initiation. This study was approved by the respective Clinical Research Ethics Committees (CEIC) of the participating centers. Informed consent was obtained from all participants.

### 2.2 | TTV and CMV DNA load monitoring

The plasma TTV DNA load was quantified via an “in-house” TaqMan real-time PCR assay that amplifies a highly conserved segment of the untranslated region of the viral genome, as previously reported.<sup>11,12</sup> Specimens with undetectable TTV DNA were assigned a value of 0 for analysis purposes. All samples from each patient were assayed simultaneously in singlets. Plasma CMV DNA load monitoring was conducted via RealTime CMV PCR (Abbott Molecular). Viral load monitoring was performed at baseline (before treatment inception) and at days +15, +30, +45, +60, +75, +90, +120, +150, and +180 after initiation of treatment. As per local guidelines, no patient with detectable CMV DNA in plasma was given preemptive antiviral therapy. Moreover, no patient received antiviral prophylaxis against CMV.

### 2.3 | Enumeration of CMV-specific T cells

Enumeration of CMV-specific interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )-producing CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-cell responses in whole blood was performed by flow

**TABLE 1** Demographic and clinical characteristics of the patients included in the study.

| Parameter                                                                                 | No. of patients (%) |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| <b>Treatment with Ibrutinib</b>                                                           |                     |
| Gender, male/female (%)                                                                   | 13/7 (65/35)        |
| Underlying disease                                                                        |                     |
| Chronic lymphocytic Leukemia                                                              | 20 (100)            |
| First-line, <i>n</i> (%)                                                                  | 11 (55)             |
| Prior treatment                                                                           | 9 (45)              |
| Bendamustine ± Obinutuzumab, <i>n</i> (%)                                                 | 2 (22)              |
| Bendamustine + Rituximab, <i>n</i> (%)                                                    | 2 (22)              |
| Bendamustine + Rituximab + Chlorambucil, <i>n</i> (%)                                     | 1 (11)              |
| Cyclophosphamide + Rituximab + Chlorambucil + Prednisone, <i>n</i> (%)                    | 2 (22)              |
| Fludarabine + Cyclophosphamide + Rituximab + (Bendamustine or Obinutuzumab), <i>n</i> (%) | 2 (22)              |
| <b>Treatment with Ruxolitinib</b>                                                         |                     |
| Gender, male/female (%)                                                                   | 11/10 (52/48)       |
| Underlying disease                                                                        |                     |
| Primary myelofibrosis, <i>n</i> (%)                                                       | 16 (76)             |
| Polycythemia vera, <i>n</i> (%)                                                           | 4 (19)              |
| Chronic myelocytic leukemia, <i>n</i> (%)                                                 | 1 (5)               |
| First-line, <i>n</i> (%)                                                                  | 15 (71.4)           |
| Prior treatment, <i>n</i> (%)                                                             | 6 (28.6)            |
| Hydroxyurea, <i>n</i> (%)                                                                 | 4 (66.6)            |
| Hydroxyurea + Danazol, <i>n</i> (%)                                                       | 2 (33.3)            |

cytometry for intracellular cytokine staining (BD FastImmune, BD-Beckton Dickinson and Company-Biosciences), as previously reported.<sup>21</sup> Briefly, two sets of 15-mer overlapping peptides encompassing the entire sequence of CMV pp65 and IE-1 proteins were used in combination for stimulation. A negative control (absence of peptide stimulation) was run in all experiments. The total number of CMV-specific CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-cells was calculated by multiplying the corresponding percentage of CMV-specific T-cells (after background subtraction) by the absolute number of CD8<sup>+</sup> or CD4<sup>+</sup> T-cells. Responses >0.1% for each population were considered specific (detectable). Immunological monitoring was conducted at baseline and days +30, +60, +90, +120, +150, and +180 after treatment initiation.

## 2.4 | Statistical analyses

Frequency comparisons for categorical variables were carried out using the chi-square test or Fisher's exact test, as appropriate. Differences between medians (for unpaired data) were compared using the Mann-Whitney *U*-test (two independent variables). Correlation between continuous variables was carried out via Spearman's Rank test. Two-sided exact *p* values are reported,

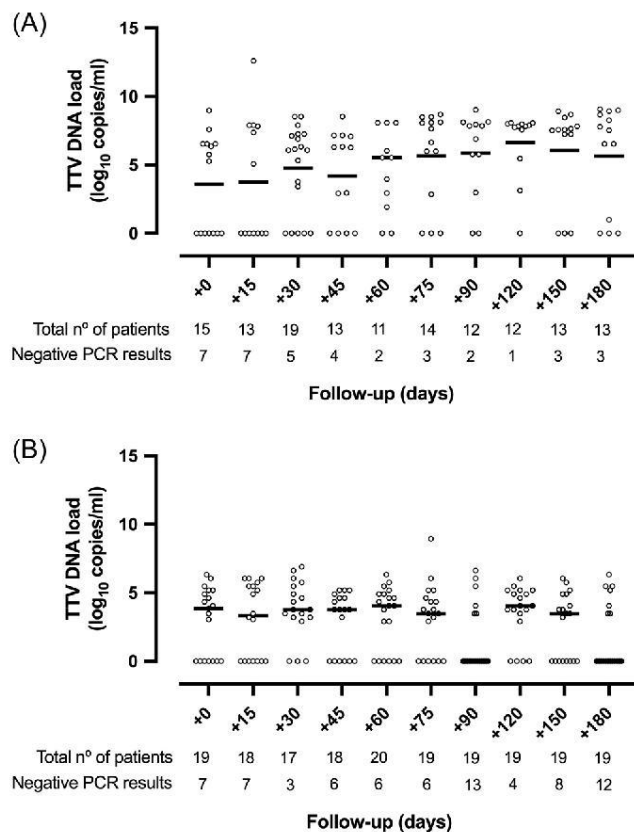
considering a *p* < 0.05 statistically significant. Analyses were performed using SPSS version 26.0 (SPSS).

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Plasma TTV DNA load kinetics

A total of 135 plasma samples were available from patients treated with ibrutinib for TTV DNA quantitation, a median of eight plasma specimens (range: 3–10) per patient. TTV DNA was detectable in at least one sample from 17/20 patients (85%). The number of patients with detectable TTV DNA increased from baseline to day +120 (38.4%–100%), and slightly decreased afterwards (83.7% at days +150 and +180) (Figure 1A). The median TTV DNA load at baseline was 5.27 log<sub>10</sub> copies/mL (interquartile range [IQR]: 0–6.54); overall, the viral load increased over the follow-up, the TTV DNA peak being reached by day +120 (median, 7.83 log<sub>10</sub> copies/mL; IQR: 7.05–7.99; *p* = 0.025 compared with baseline) (Figure 1A).

In turn, 188 plasma specimens were available from ruxolitinib-treated patients, a median of 10 samples (range: 3–10) per patient. All patients had at least one plasma specimen with detectable TTV DNA

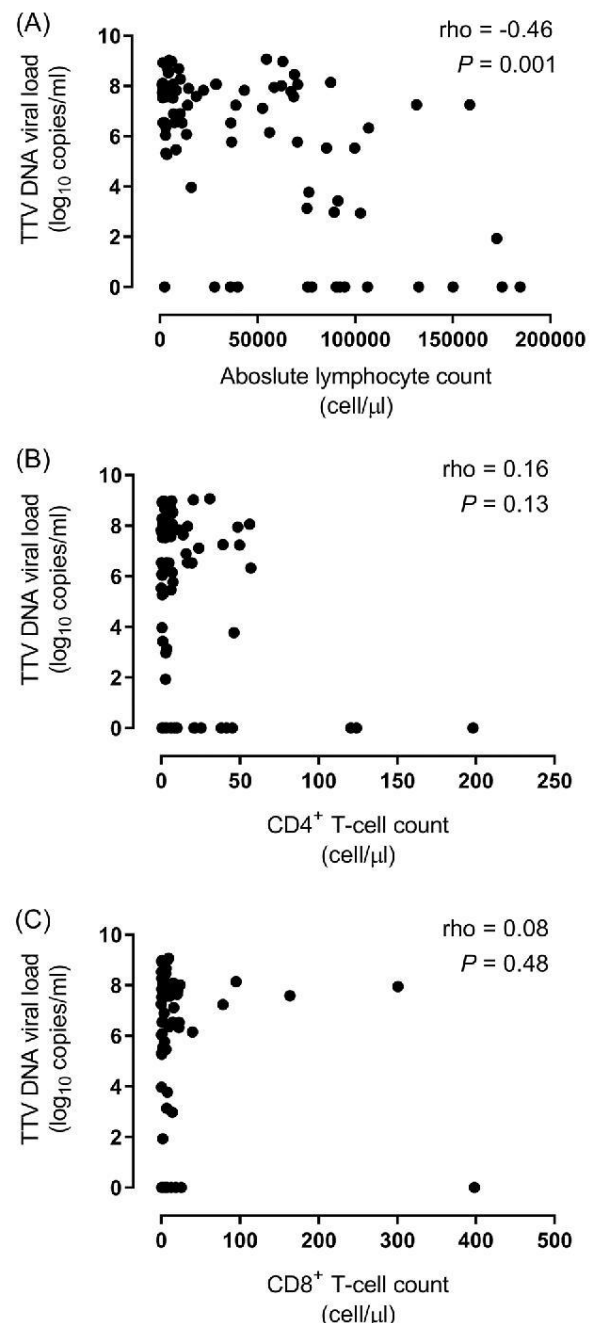


**FIGURE 1** Kinetics of Torque Teno virus (TTV) DNA in plasma in patients treated with Ibrutinib ( $n = 20$ ) or Ruxolitinib ( $n = 21$ ), in panels (A) and (B), respectively. Only data from patients with at least one specimen testing positive for TTV DNA over the follow-up are displayed. TTV DNA loads were quantified by PCR at baseline and at different time points after drug administration. The number of samples available for analysis and the number of those yielding negative PCR results (undetectable) at each monitoring time are indicated. Bars represent medians.

over the study period. The number of plasma specimens testing positive by PCR at baseline (63.1%) and at different testing times (maximum at day +120, 78.9%) was not significantly different ( $p \geq 0.2$ ) (Figure 1B). The median TTV DNA load at baseline was 3.86  $\log_{10}$  copies/mL (IQR: 0–5.05) and fluctuated slightly over time (Figure 1B). Overall, the TTV DNA peak was reached by day +60 (median: 4.05  $\log_{10}$  copies/mL; IQR: 0–4.91); nevertheless, the median TTV DNA load quantified at different time points after treatment inception was not significantly different from that measured at baseline ( $p \geq 0.12$ ).

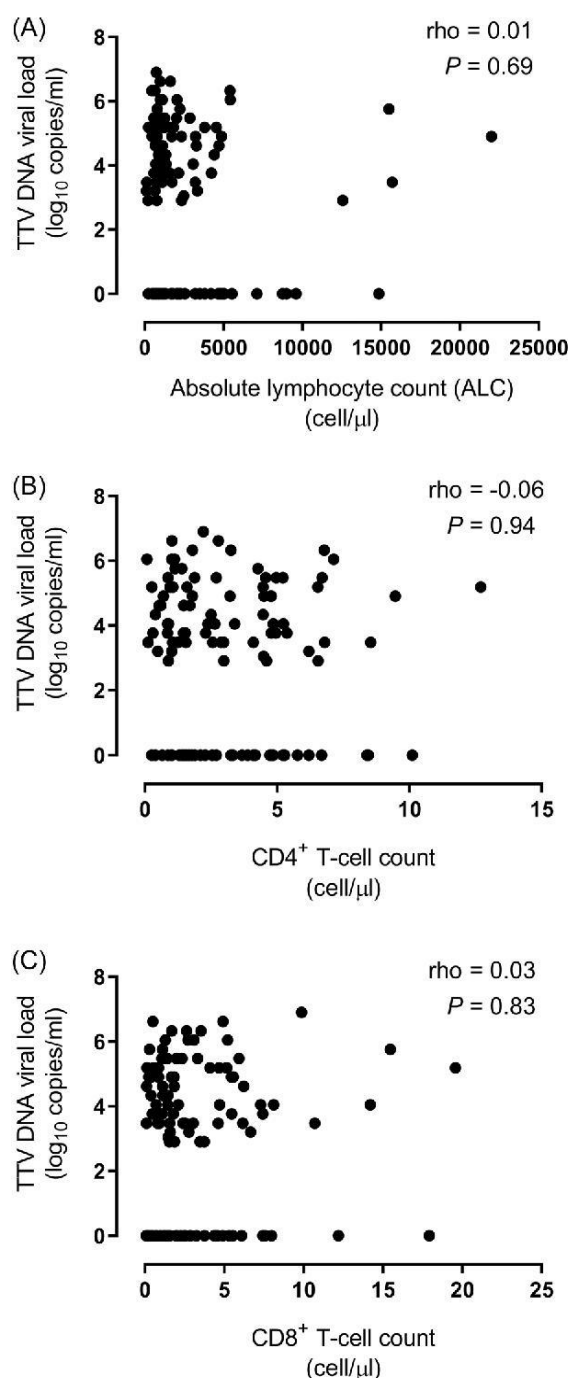
### 3.2 | Correlation between TTV DNA loads and absolute lymphocyte and total CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell counts

A total of 236 paired specimens from ibrutinib ( $n = 106$ ) or ruxolitinib ( $n = 130$ )-treated patients was available for assessment of the overall correlation between TTV DNA loads and absolute lymphocyte (ALC) and total CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell counts. As shown in Figure 2, a



**FIGURE 2** Correlation between Torque Teno virus (TTV) DNA in plasma and (A) absolute lymphocyte counts (ALC), (B) total CD4<sup>+</sup> T-cell counts and (C) total CD8<sup>+</sup> T-cell counts in patients treated with Ibrutinib ( $n = 20$ ), as determined by Spearman's Rank test. Rho and  $p$  values are shown.

moderate inverse correlation ( $\rho = -0.46$ ;  $p < 0.001$ ) was found between TTV DNA load and ALC in patients treated with ibrutinib (Figure 2A). Nevertheless, a very weak or no correlation was found between TTV DNA levels and total CD4<sup>+</sup> (Figure 2B) OR CD8<sup>+</sup> (Figure 2C) T-cell counts. As shown in Figure 3, there was also no correlation between ALC (Figure 3A), CD4<sup>+</sup> (Figure 3B) and CD8<sup>+</sup> (Figure 3C) T-cell counts in ruxolitinib-treated patients.



**FIGURE 3** Correlation between Torque Teno virus (TTV) DNA in plasma and (A) absolute lymphocyte counts (ALC), (B) total CD4<sup>+</sup> T-cell counts and (C) total CD8<sup>+</sup> T-cell counts in patients treated with Ruxolitinib ( $n = 21$ ), as determined by Spearman's Rank test. Rho and  $p$  values are shown.

### 3.3 | Plasma TTV DNA load monitoring for prediction of the occurrence of CMV DNAemia

Of the 20 ibrutinib-treated patients, seven developed low-grade CMV DNAemia (median CMV DNA peak level 106 IU/mL) within a

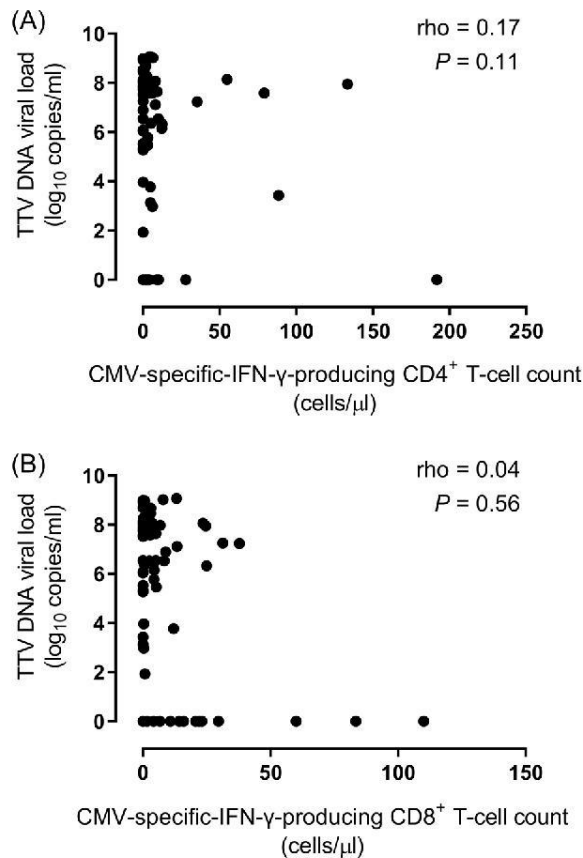
median of 45 days after treatment inception. We investigated whether TTV DNA load quantified at day +30 was significantly different across patients who did subsequently develop CMV DNAemia ( $n = 4$ ) or not ( $n = 12$ ). We found this not to be the case; in fact, TTV DNA load in patients who went on to develop CMV DNAemia (median: 6.12 log<sub>10</sub> copies/mL; IQR: 3.04–6.64) was comparable ( $p = 0.77$ ) to that in patients who did not develop CMV DNAemia (median: 4.55 log<sub>10</sub> copies/mL; IQR: 0–6.79). Regarding ruxolitinib-treated patients, 16 out of 21 (76%) had CMV DNAemia, which occurred at a median of 30 days after treatment inception. CMV DNA peak load was 182 IU/mL (range: 15–182). The TTV DNA load at day +30 in patients who developed CMV DNAemia ( $n = 7$ ; median, 3.48 log<sub>10</sub> copies/mL; IQR: 3.20–6.05) was comparable ( $p = 0.30$ ) to that in patients who did not ( $n = 4$ ; median: 2.91 log<sub>10</sub> copies/mL; IQR: 0–4.91).

### 3.4 | Correlation between TTV DNA loads and CMV-specific IFN- $\gamma$ -producing CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-cells

A total of 236 paired specimens were available from ibrutinib ( $n = 106$ ) or ruxolitinib ( $n = 130$ )-treated patients for evaluation of the overall correlation between TTV DNA loads and CMV-specific IFN- $\gamma$ -producing CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells. Either a weak or no correlation was observed between these parameters, both in patients treated with ibrutinib (Figure 4A,B for CMV-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells, respectively) and ruxolitinib (Figure 5A,B for CMV-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells, respectively).

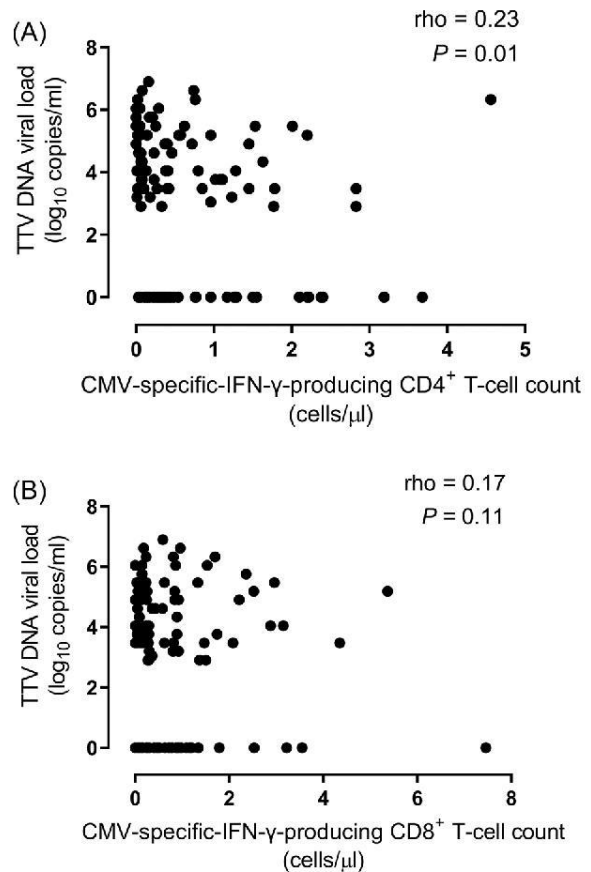
## 4 | DISCUSSION

An increasing amount of experimental evidence supports the assumption that the magnitude of the TTV DNA load in blood mirrors the net state of immunosuppression in a variety of clinical settings.<sup>7–9</sup> In this context, TTV DNA load monitoring may predict the occurrence of virus infectious events in the SOT setting; specifically, it was shown that either high or increasing levels of plasma TTV DNA load early after kidney or liver transplantation is associated with the development of CMV or BK virus DNAemia.<sup>20,22,23</sup> In the allo-HSCT setting, a subset of patients at high risk of developing high-level CMV DNAemia requiring the inception of pre-emptive antiviral therapy could be identified by analyzing plasma TTV DNA load kinetics early after engraftment.<sup>12</sup> It is currently unknown whether monitoring of the kinetics of TTV DNA load would be useful in predicting the occurrence of infectious events in hematological patients undergoing treatment with small molecule inhibitors. In the current study, we characterized the dynamics of TTV DNA load in patients treated with ibrutinib or ruxolitinib and assessed whether the TTV DNA load measured at different time points after treatment inception could anticipate the development of CMV DNAemia. Our main observations were as follows. Firstly, TTV DNA levels significantly increased over time in patients treated with



**FIGURE 4** Correlation between Torque Teno virus (TTV) DNA in plasma and Cytomegalovirus pp65/IE-1-IFN-γ-producing CD4<sup>+</sup> (A) and CD8<sup>+</sup> (B) T-cell counts in whole blood from ibritinib-treated patients, as enumerated by flow cytometry for intracellular cytokine staining, and assessed by Spearman's Rank test. Rho and *p* values are shown. IFN, interferon.

ibrutinib, reaching the peak by day +120. This observation may point to a progressive impairment of T-cell mediated immunity, as it is mainly responsible for the control of TTV replication.<sup>2</sup> However, it may also relate to the increase in ALC that commonly occurs during treatment with B cell receptor pathway inhibitors, including ibritinib,<sup>24,25</sup> which would promote TTV replication as T-cells are the main TTV target cell type.<sup>26</sup> Supporting the latter hypothesis is the fact that a moderate inverse correlation was seen between TTV DNA load and ALC (although not with CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T-cells analyzed separately). As for patients treated with ruxolitinib, a trend toward increasing TTV DNA load levels was observed, with the peak being reached by day +60 after treatment inception; yet, the difference between median TTV DNA levels measured at these time points was not statistically significant; this observation is consistent with the known impact of ruxolitinib on dendritic cell differentiation and function that impairs T-cell activation.<sup>27</sup> This, to some extent, would impair T-cell control of TTV replication. A non-mutually exclusive explanation for the lesser impact of ruxolitinib compared with ibritinib on TTV DNA load kinetics might also be related to the relatively stable dynamics of ALC in the former group; in this sense,



**FIGURE 5** Correlation between Torque Teno virus (TTV) DNA in plasma and Cytomegalovirus pp65/IE-1-IFN-γ-producing CD4<sup>+</sup> (A) and CD8<sup>+</sup> (B) T-cell counts in whole blood from ruxolitinib-treated patients, as enumerated by flow cytometry for intracellular cytokine staining, and assessed by Spearman's Rank test. Rho and *P* values are shown. IFN, interferon.

we failed to show a correlation between ALC, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell counts and TTV DNA loads in ruxolitinib-treated patients. Moreover, the median TTV DNA load at baseline was substantially higher in patients that then underwent ibritinib therapy compared with those who started with ruxolitinib (5.27 log<sub>10</sub> copies/mL vs. 3.86 log<sub>10</sub> copies/mL). Although speculative, the different nature of both the underlying hematological disease and prior chemotherapy drug regimens employed across both patient groups may account for the difference. Furthermore, as a proof-of-concept approach, we sought to determine whether the occurrence of CMV DNAemia could be anticipated via TTV DNA load measurements. In this context, we previously demonstrated that hematological patients undergoing treatment with molecular targeting agents are at increased risk of developing low-level CMV DNAemia.<sup>18,19</sup> Since CMV DNAemia was detected at a median of +45 and +30 days after ibritinib and ruxolitinib administration, respectively, we focused on TTV DNA loads quantified at day +30. TTV DNA levels at this time point in patients either treated with ibritinib or ruxolitinib were not associated with the subsequent development of CMV DNAemia.

The apparent lack of association between the magnitude of TTV DNA loads and the subsequent occurrence of CMV DNAemia in both patient groups is consistent with our observation that no correlation existed between TTV DNA loads and CMV pp65/IE-1 IFN- $\gamma$ -producing CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-cell counts. In this context, it should be noted that peripheral blood levels of both CMV-specific functional T-cell subsets were predictive of the risk of CMV DNAemia in SOT<sup>28</sup> and allo-HSCT settings,<sup>21</sup> but not in ibrutinib or ruxolitinib-treated patients.<sup>18,19</sup>

The main limitation of this study is the relatively small cohort of available patients. This precluded for example the assessment of whether TTV DNA loads measured earlier than day +30 could predict the occurrence of CMV DNAemia. In addition, the frequency of CMV DNAemia monitoring could have been insufficient, particularly beyond day +90, to capture all episodes of CMV DNAemia that may have occurred. Finally, only monofunctional CMV-specific IFN- $\gamma$ -producing T-cells were enumerated.

In summary, TTV DNA load kinetics may differ across ibrutinib and ruxolitinib-treated patients. Moreover, our data suggest that neither the occurrence of CMV DNAemia nor the magnitude of CMV-specific T-cell responses might be anticipated or inferred, respectively, based on TTV DNA load measurements following treatment inception. Further studies involving larger cohorts are warranted to precisely gauge the potential utility of serial TTV DNA monitoring in anticipating the development not only of active CMV infection but also other opportunistic infections to which ibrutinib and ruxolitinib-treated patients are at increased risk.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

**Juan Carlos Hernández-Boluda, María José Terol, Carlos Solano, and David Navarro:** conceptualization and funding acquisition. **Carlos Solano de la Asunción, Estela Giménez, Eliseo Albert, María José Remigia, and Paula Amat:** methodology and data curation. **Javier López, Valentín García-Gutiérrez, Rafael Andreu, Dolores García, and Laura Fox:** data curation and project administration. **David Navarro:** wrote the manuscript. All authors reviewed and approved the final version of the manuscript.

#### ACKNOWLEDGMENTS

Estela Giménez (Juan Rodés Contract, JR18/00053) and Eliseo Albert (Juan Rodés Contract, JR20/00011) hold contracts funded by the Carlos III Health Institute (co-financed by the European Regional Development Fund, ERDF/FEDER). This research was supported by a grant from FIS PI18/00127 (Fondo de Investigaciones Sanitarias), Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain).

#### CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflicts of interest.

#### DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

#### ORCID

David Navarro  <http://orcid.org/0000-0003-3010-4110>

#### REFERENCES

1. Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;241(1):92-97.
2. Focosi D, Antonelli G, Pistello M, Maggi F. Torquetenovirus: the human virome from bench to bedside. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22(7):589-593.
3. Webb B, Rakibuzzaman A, Ramamoorthy S. Torque teno viruses in health and disease. *Virus Res*. 2020;285:198013.
4. De Vlaminc I, Khush KK, Strehl C, et al. Temporal response of the human virome to immunosuppression and antiviral therapy. *Cell*. 2013;155(5):1178-1187.
5. Moustafa A, Xie C, Kirkness E, et al. The blood DNA virome in 8,000 humans. *PLoS Pathog*. 2017;13(3):e1006292.
6. Focosi D, Spezia PG, Macera L, et al. Assessment of prevalence and load of torquetenovirus viraemia in a large cohort of healthy blood donors. *Clin Microbiol Infect*. 2020;26(10):1406-1410.
7. Redondo N, Navarro D, Aguado JM, Fernández-Ruiz M. Viruses, friends, and foes: the case of Torque Teno Virus and the net state of immunosuppression. *Transpl Infect Dis*. 2022;24(2):e13778.
8. van Rijn A, Roos R, Dekker F, Rotmans J, Feltkamp M. Torque teno virus load as marker of rejection and infection in solid organ transplantation - A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol*. 2023;33(1):e2393.
9. Jaksch P, Görzer I, Puchhammer-Stöckl E, Bond G. Integrated immunologic monitoring in solid organ transplantation: the road toward torque teno virus-guided immunosuppression. *Transplantation*. 2022;106(10):1940-1951.
10. Albert E, Solano C, Giménez E, et al. Kinetics of Alphatorquevirus plasma DNAemia at late times after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Med Microbiol Immunol*. 2019;208(2):253-258.
11. Albert E, Solano C, Pascual T, et al. Dynamics of Torque Teno virus plasma DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Clin Virol*. 2017;94:22-28.
12. Albert E, Solano C, Giménez E, et al. The kinetics of torque teno virus plasma DNA load shortly after engraftment predicts the risk of high-level CMV DNAemia in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2018;53(2):180-187.
13. Roberto P, Cinti L, Napoli A, et al. Torque teno virus (TTV): a gentle spy virus of immune status, predictive marker of seroconversion to COVID-19 vaccine in kidney and lung transplant recipients. *J Med Virol*. 2023;95(2):e28512.
14. Martín-López M, Albert E, Fernández-Ruiz M, et al. Torque teno virus viremia in patients with chronic arthritis: influence of biologic therapies. *Semin Arthritis Rheum*. 2020;50(1):166-171.
15. Forqué L, Albert E, Giménez E, et al. Monitoring of Torque Teno virus DNAemia in critically ill COVID-19 patients: may it help to predict clinical outcomes? *J Clin Virol*. 2022;148:105082.
16. Sochacka-Ćwikła A, Mączyński M, Regiec A. FDA-approved drugs for hematological malignancies—the last decade review. *Cancers*. 2021;14(1):87.
17. Ruiz-Camps I, Aguilar-Company J. Risk of infection associated with targeted therapies for solid organ and hematological malignancies. *Ther Adv Infect Dis*. 2021;8:204993612198954.
18. Solano de la Asunción C, Terol MJ, Saus A, et al. Cytomegalovirus-specific T-cell immunity and DNAemia in patients with chronic lymphocytic leukaemia undergoing treatment with ibrutinib. *Br J Haematol*. 2021;195(4):637-641.

19. Solano de la Asunción Carlos, Giménez E, Hernández-Boluda JC, et al. Immunobiology of cytomegalovirus infection in patients with haematological malignancies undergoing treatment with small molecule inhibitors. *Br J Haematol*. 2023;200(6):e58-e61.
20. Maggi F, Focosi D, Statzu M, et al. Early post-transplant Torque-tenovirus Viremia predicts Cytomegalovirus reactivations in solid organ transplant recipients. *Sci Rep*. 2018;8(1):15490.
21. Solano C, Benet I, Clari MA, et al. Enumeration of cytomegalovirus-specific interferon CD8+ and CD4+ T cells early after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk of active cytomegalovirus infection. *Haematologica*. 2008;93(9):1434-1436.
22. Fernández-Ruiz M, Albert E, Giménez E, et al. Monitoring of alphatorquevirus DNA levels for the prediction of immunosuppression-related complications after kidney transplantation. *Am J Transplant (AJT)*. 2019;19(4):1139-1149.
23. Fernández-Ruiz M, Albert E, Giménez E, et al. Early kinetics of Torque Teno virus DNA load and BK polyomavirus viremia after kidney transplantation. *Transpl Infect Dis*. 2020;22(2):e13240.
24. Herman SEM, Niemann CU, Farooqui M, et al. Ibrutinib-induced lymphocytosis in patients with chronic lymphocytic leukemia: correlative analyses from a phase II study. *Leukemia*. 2014;28(11):2188-2196.
25. Barrientos JC, Burger JA, Byrd JC, et al. Characterizing the kinetics of lymphocytosis in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with single-agent ibrutinib. *Leuk Lymphoma*. 2019;60(4):1000-1005.
26. Focosi D, Macera L, Boggi U, Nelli LC, Maggi F. Short-term kinetics of torque teno virus viraemia after induction immunosuppression confirm T lymphocytes as the main replication-competent cells. *J Gen Virol*. 2015;96(Pt 1):115-117.
27. Heine A, Held SAE, Daacke SN, et al. The JAK-inhibitor ruxolitinib impairs dendritic cell function in vitro and in vivo. *Blood*. 2013;122(7):1192-1202.
28. Fernández-Ruiz M, Giménez E, Vinuesa V, et al. Regular monitoring of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity in intermediate-risk kidney transplant recipients: predictive value of the immediate post-transplant assessment. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(3):381.e1-381.e10.

**How to cite this article:** de la Asunción CS, Giménez E, Hernández-Boluda JC, et al. Assessment of the potential value of plasma Torque Teno virus DNA load monitoring to predict Cytomegalovirus DNAemia in patients with hematological malignancies treated with small molecule inhibitors: a proof-of-concept study. *J Med Virol*. 2023;95:e28933. doi:10.1002/jmv.28933



