

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

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

doi.org/10.23938/ASSN.0121

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

RESUMEN

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

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

ABSTRACT

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

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

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

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

Correspondencia:

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

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

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

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

INTRODUCCIÓN

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

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

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

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

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

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

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

mopoyesis, aumenta la proliferación de LT maduros¹³.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

BIBLIOGRAFÍA

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

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

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