



**Estudio de la incidencia de la infección
por adenovirus, su cinética de
replicación, y la respuesta inmune
celular: impacto en la progresión clínica
de pacientes adultos receptores de TPH**

TESIS DOCTORAL

José Antonio Marrugal Lorenzo

Departamento de Medicina

Universidad de Sevilla

2019

El Prof. Jerónimo Pachón Díaz, Profesor Emérito de Medicina de la Universidad de Sevilla y el Dr. Javier Sánchez Céspedes, Doctor en Biología, adscrito al Servicio Andaluz de Salud.

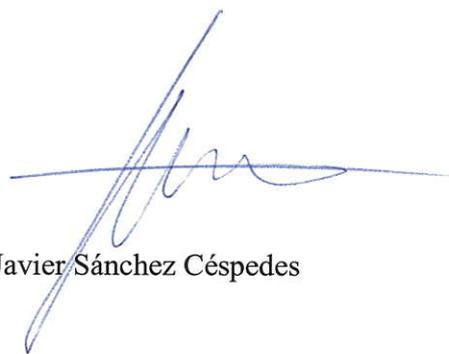
CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación que lleva por título *“Estudio de la incidencia de la infección por adenovirus, su cinética de replicación, y la respuesta inmune celular: impacto en la progresión clínica de pacientes adultos receptores de TPH”* ha sido realizado bajo su dirección por el Graduado en Biología Don José Antonio Marrugal Lorenzo, y reúne las condiciones necesarias para ser leído y defendido como Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Para que conste a los efectos oportunos, expiden el presente certificado en Sevilla a 20 de septiembre de 2019.



Jerónimo Pachón Díaz



Javier Sánchez Céspedes

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a Jerónimo Pachón haberme permitido formar parte de su grupo de investigación y darme la oportunidad de formarme durante este tiempo, y a Javi, mi director de tesis, quien me ha visto crecer personal y profesionalmente y a quién le agradezco haberme introducido en el micromundo que nos rodea.

Por supuesto todo este trabajo no hubiese sido igual sin mis compañeros de laboratorio, todos han aportado algún granito de arena en esta tesis.

A los Post-Doc Menia y Younes, por estar ahí para resolver mis dudas y calmar mis nervios.

A Damián, Marina, Mery y Raquel gracias por acogerme con tanto cariño cuando me incorporé. A Pablo, por abrirme el camino para que mi transcurso fuese más fácil. A Ángel, por alegrarme los desayunos que nos daban fuerzas para seguir. A Pili, comer en el IBiS nunca fue lo mismo sin ti. A Malu, por estar siempre dispuesta a ayudar y a organizar algún plan y a Marta, por tu sonrisa diaria tan contagiosa.

A los futuros Doctores. Tania, gracias por ser tan auténtica y alegre. A Gema, por transmitir tranquilidad en los días más duros y a Rafa y Andrea, los compañeros perfectos para ese par de cervezas tan necesarias a veces.

A Judith, por ayudarme tanto en esta última etapa, eres un sol. Y a Ana, que además de ser el Google Molecular del laboratorio y la relaciones públicas del IBiS, es la compañera perfecta que se puede tener y yo tengo el lujo de llamarla amiga.

A mis chicas Laura, Marigon, Vera y Mari, gracias por hacer de mi vida una performance, “The show must go on”.

A Jorge, por aguantar tan bien la convivencia con un doctorando y hacerme desconectar al llegar al piso.

A mis amigos Dani, Ale, Luis y José, después de todo lo que estamos viviendo, podemos decir que en la carrera nos quejábamos por gusto.

A Richi y Luisma, gracias por darle a mi vida ese toque de locura y postureo.

A mi hermana Ángela, por ser mi referencia. Este año marcará nuestras vidas y me siento muy afortunado de poder compartir todos estos altibajos pre-tesis contigo. Y a mi cuñado Arga, muchas gracias por cuidarla.

A mi madre, gracias por exigirme tanto y hacer de mi la persona que soy hoy. A mi padre, gracias por hacerme comprender que rendirse no es una opción. Sois lo más

importante de mi vida, espero que estéis tan orgullosos de mí como yo de vosotros, siento que jamás podré devolveros todo lo que me habéis dado (suerte que no soy un Lannister).

Al resto de mi familia, especialmente a mis abuelas, por hacerme sentir tan querido y especial.

Y por último a Ángel, mi compañero de vida y de viajes. Gracias por tu apoyo incondicional, por tus “he visto un vuelo barato” y tus “te traigo sushi”. Nos queda mucho mundo por descubrir juntos.

FINANCIACIÓN

Este trabajo ha sido financiado por el subprograma de proyectos de Investigación en Salud, correspondiente a la convocatoria 2015 de concesión de ayudas de la Acción Estratégica en Salud (número de expediente PI15/00489), Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad.

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN	17
1. Características del adenovirus humano (HAdV)	19
2. Epidemiología	20
3. Impacto clínico de las infecciones por adenovirus	25
<i>3.1. Infección y enfermedad en pacientes inmunodeprimidos</i>	25
<i>3.2. Infección y enfermedad en pacientes inmunocompetentes</i>	29
4. Respuesta inmune frente al adenovirus humano	31
<i>4.1. Respuesta innata</i>	33
<i>4.2. Respuesta adaptativa</i>	34
5. Tratamientos antivirales frente al adenovirus humano	35
II. JUSTIFICACIÓN	41
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	49
1. Hipótesis	51
2. Objetivos	52
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	53
1. Diseño del estudio	55
2. Ámbito del estudio	55
3. Sujetos de estudio y criterios de inclusión y de exclusión	55
4. Definiciones	55
5. Monitorización y seguimiento de los pacientes	56
6. Recogida de datos clínicos	56
7. Determinación de la carga viral de HAdV	57
8. Clasificación por secuenciación de las muestras positivas para HAdV	57
9. Determinación de la inmunidad celular específica frente a HAdV	58
10. Células y virus	59
11. Ensayo de citotoxicidad	59

12. Cuantificación del ADN de HAdV y HCMV <i>in vitro</i> mediante qPCR	59
13. Ensayos de susceptibilidad en co-infección por qPCR	61
14. Ensayo de reducción de la progenie vírica en co-infección	61
15. Análisis estadístico	61
16. Consideraciones éticas	62
V. RESULTADOS	63
1. Población de estudio	65
2. Infección por HAdV	67
3. Factores de riesgo asociado a la infección por HAdV y resultados clínicos	69
4. Respuesta inmune de células T específica frente a HAdV	71
5. Actividad antiviral de ganciclovir frente a HAdV en condiciones de co-infección con citomegalovirus	85
VI. DISCUSIÓN	89
VII. CONCLUSIONES	97
VIII. ANEXOS	101
ANEXO I. CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS	101
ANEXO II. CONSENTIMIENTO INFORMADO	105
ANEXO III. PUBLICACIONES DERIVADAS DEL TRABAJO DE LA TESIS DOCTORAL	109
ANEXO IV. OTRAS PUBLICACIONES GENERADAS DURANTE EL PERIODO DE FORMACIÓN PREDOCTORAL	111
IX. REFERENCIAS	113

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras

Figura 1. Estructura de la partícula viral del HAdV.

Figura 2. Esquema del genoma de HAdV5. Las flechas indican la dirección de la transcripción.

Figura 3. Representación esquemática del ciclo de vida del HAdV.

Figura 4. Estructura de los fármacos antivirales de amplio espectro de uso común para el tratamiento de infecciones por HAdV.

Figura 5. Mecanismo de acción del CDV.

Figura 6. Mecanismo de acción del GCV frente HCMV y HAdV.

Figura 7. Diagrama de la inclusión de los pacientes TPH.

Figura 8. Linfocitos CD4+ y CD8+ (%) y CD4+/CD8+ en pacientes con viremia HAdV $<5 \times 10^2$ y $\geq 5 \times 10^2$ copias/ml (A) y con (vir +) y sin (vir-) viremia HAdV (B).

Figura 9. Relación entre la respuesta inmune específica de HAdV en aquellos pacientes que muestran infección invasiva de HAdV (A) y aquellos que muestran cualquier nivel de ADNemia de HAdV (B) durante el seguimiento.

Figura 10. Respuesta de células T CD4+ (A) y células T CD8+ (B) durante el seguimiento para pacientes con viremia por HAdV previa al trasplante (días -7 o 0). Respuesta de células T CD4+ (C) y células T CD8+ (D) durante el seguimiento para pacientes sin viremia por HAdV previa al trasplante.

Figura 11. Respuesta de células T CD4+ (A) y células T CD8+ (B) durante el seguimiento para pacientes con episodios blips de viremia por HAdV previa al trasplante (días -7 o 0). Respuesta de células T CD4+ (C) y células T CD8+ (D) durante el seguimiento para pacientes con episodios de viremia persistente por HAdV previa al trasplante.

Figura 12. Respuesta de células T CD4+ (A) y células T CD8+ (B) durante el seguimiento para pacientes con episodios blips de viremia por HAdV posteriores al trasplante (de días +7 a +100). Respuesta de células T CD4+ (C) y células T CD8+ (D) durante el seguimiento para pacientes con episodios de viremia persistente por HAdV posteriores al trasplante.

Figura 13. Respuesta inmunitaria de células T específicas para HAdV en pacientes con viremia $\geq 5 \times 10^2$ copias/ml (A) o $< 5 \times 10^2$ copias/ml (B). Células T CD4+ específicas para

HAdV que expresan (%) IL-2 y TNF- α y células T CD8+ (%) que expresan IFN- γ , en los días +21, +56 y +100 después del trasplante.

Figura 14. Respuesta inmunitaria de células T específicas de HAdV en pacientes con blips o viremia persistente en los días -7 y/o 0 antes del trasplante. Células T CD4+ específicas para HAdV que expresan (%) IL-2, TNF- α e IFN- γ , en los días +21, +56 y +100 después del trasplante en pacientes con blips (A) y viremia persistente (B). Células T CD8+ específicas para HAdV que expresan (%) IL-2, TNF- α e IFN- γ , en los días +21, +56 y +100 después del trasplante en pacientes con blips (C) y viremia persistente (D).

Figura 15. Actividad inhibitoria de CDV y GCV. Actividad dosis-dependiente contra HAdV (A) y HCMV (B) por qPCR. El control DMSO es un control positivo con células infectadas con la misma MOI pero en ausencia de fármacos. Los resultados muestran la media \pm SD de muestras por triplicado de tres experimentos independientes.

Figura 16. La actividad antiviral de CDV y GCV contra HCMV (A) y HAdV (B), por separado y en condiciones de co-infección, ambas determinadas por qPCR. Los resultados muestran la media \pm SD de muestras por triplicado de tres experimentos independientes

Figura 17. Posible mecanismo de acción de GCV frente a HAdV en condiciones de co-infección de HCMV y HAdV.

Tablas

Tabla 1. Especies, tipos y tropismos tisulares de HAdV

Tabla 2. Impacto clínico de las infecciones por HAdV en pacientes receptores de TPH y TOS adultos y pediátricos.

Tabla 3. Características clínicas y demográficas de los 95 pacientes receptores de TPH.

Tabla 4. Características de los episodios de viremia por HAdV.

Tabla 5. Características de los episodios de viremia por HAdV según el nivel de DNAemia por HAdV.

Tabla 6. Características clínicas, del trasplante y datos demográficos de pacientes con y sin viremia post-trasplante.

Tabla 7. Características clínicas, del trasplante y datos demográficos de pacientes con viremia $\geq 5 \times 10^2$ y sin viremia post-trasplante.

Tabla 8. Respuesta inmune de células T específicas para HAdV. Porcentaje de pacientes con/sin viremia por HAdV que expresan IL-2, TNF- α e IFN- γ en los días +21, +56 y +100 después del trasplante, en células T CD4+ y CD8+ específicas de HAdV (* $p < 0.05$).

Tabla 9. Porcentaje de células T CD4+ y CD8+ específicas para HAdV que producen IL-2, TNF- α e IFN- γ en los días +21, +56 y +100 después del trasplante. Los resultados se muestran como media \pm SD.

Tabla 10. Respuesta inmunitaria de células T específica para HAdV en pacientes con viremia $\geq 5 \times 10^2$ copias/ml (A) o $< 5 \times 10^2$ copias/ml (B). Células T CD4+ y CD8+ específicas para HAdV (%) que expresan IL-2, TNF- α e IFN- γ en los días +21, +56 y +100 después del trasplante. Los resultados se muestran como media \pm SD (pacientes con viremia $\geq 5 \times 10^2$ copias/ml vs. $< 5 \times 10^2$ copias/ml, * $p < 0.05$).

Tabla 11. Valores de IC₅₀, CC₅₀, e Índice Selectivo (IS) para CDV y GCV. Los resultados representan la media \pm SD de muestras por triplicado de tres experimentos independiente. (* $p < 0.05$).

Tabla 12. Actividad antiviral de CDV y GCV frente a HAdV, HCMV en condiciones de mono-infección y co-infección de ambos, determinada por la reducción de la producción viral y expresada como las veces que se reduce en comparación a un control tratado con DMSO. Los resultados fueron representados como la media \pm SD de muestras por triplicado de tres experimentos independientes (* $p < 0.05$).

ABREVIATURAS

293β5	Células embrionarias de riñón humano
A549	Células humanas de epitelio alveolar basal
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATG	Globulina antitimocítica
AVP	Proteasa del adenovirus
CAR	Receptor de coxsackie-adenovirus
CC ₅₀	Concentración citotóxica 50
CDV	Cidofovir
CMX001	Hexadeciloxipropil-cidofovir (brincidofovir)
CTL	Linfocito T citotóxico
DBP	Proteína de unión a ADN
DMSO	Dimetilsulfóxido
EICH	Enfermedad injerto contra huésped
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GFP	Proteína fluorescente verde
GCV	Ganciclovir
HAdV	Adenovirus Humano
HCMV	Citomegalovirus humano
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)
HLA	Antígeno leucocitario humano
IC ₅₀	Concentración inhibitoria 50
IL	Interleuquina
INF	Interferón
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MOI	Multiplicidad de infección
MRC-5	Fibroblastos de pulmón fetal humano
NAC	Neumonía adquirida en la comunidad
NK	Células Natural Killer
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PML	Proteína de la leucemia promielocítica
ppm	Partes por millón
pTP	Precursor de la proteína terminal
pVIc	Péptido de la región C-terminal de la proteína precursora pVI
qPCR	PCR en tiempo real cuantitativa
IS	Índice de selectividad
TCID ₅₀	Dosis infectiva media en cultivo celular
TNF	Factor de necrosis tumoral
TOS	Trasplante de órgano sólido
TPH	Trasplante de progenitores hematopoyéticos
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

I. INTRODUCCIÓN

1. Características del adenovirus humano

El adenovirus humano (HAdV) es un virus sin envuelta, perteneciente al género Mastadenovirus de la familia *Adenoviridae*. Los HAdV engloban a más de 60 tipos diferentes clasificados en siete subgrupos o especies (de la A a la G) basadas en sus características biológicas, inmunológicas y bioquímicas [1, 2] (Tabla 1). En la tabla 1 se muestran así mismo las preferencias en cuanto a tropismo tisular de las diferentes familias. La especie A está relacionada principalmente con el tracto gastrointestinal [3], mientras que los subgrupos B y C son más comunes en enfermedades del aparato respiratorio [4]. HAdV-D es el mayor causante de conjuntivitis [5-7], y el HAdV-E está asociado a infecciones oculares (conjuntivitis) y respiratorias [8]. Finalmente, las especies F y G son agentes causales, principalmente, de gastroenteritis [3, 9, 10]. Además, el HAdV-36 se ha asociado con la obesidad, y existen estudios que sugieren que los HAdV tienen un papel relevante en el desarrollo de la misma [11, 12].

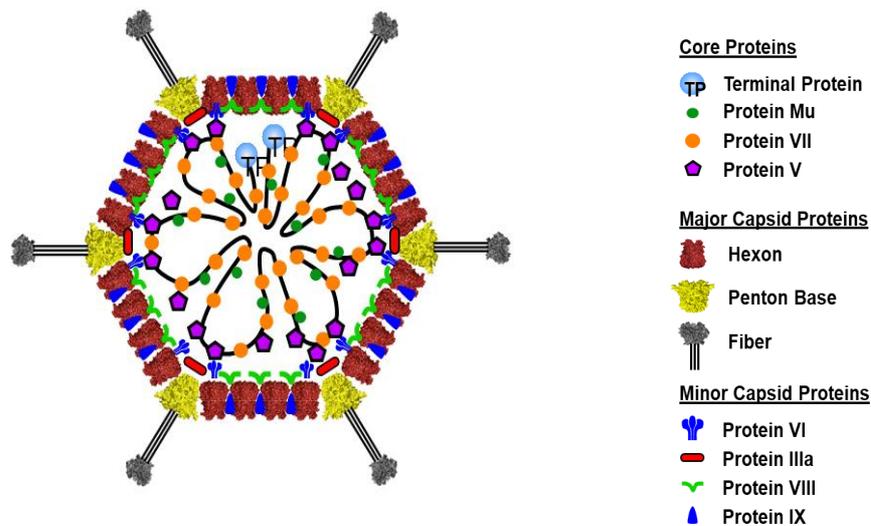


Figura 1. Estructura la partícula viral del HAdV.

La estructura de la partícula vírica del HAdV, con un diámetro de entre 70 a 100 nm, se compone de dos elementos principales: el núcleo o core que contiene el genoma de ADN lineal de doble cadena, y la cápside externa. La cápside posee simetría icosaédrica y está formada por tres componentes principales: el hexón, proteína mayoritaria y localizada en las caras y bordes de la cápside; la base pentón, situada en los vértices; y la fibra unida a la base pentón (Figura 1). La fibra es una proteína

trimérica con un dominio globular en la parte distal, responsable de la unión del virus al receptor de la célula hospedadora [13]. La longitud de estas fibras varía entre los distintos tipos de HAdV, en función del número de repeticiones en la secuencia de aminoácidos del eje de la fibra, que va desde 6 repeticiones en HAdV3 hasta las 22 en los HAdV2 y HAdV5 [14, 15].

Las proteínas menores de la cápside, IIIa, VI, VIII, y IX confieren estabilidad a la estructura del virión [16], y juegan papeles fundamentales en los procesos que ocurren tras la internalización, tales como la penetración del endosoma, la activación transcripcional, y la reorganización nuclear (proteína IX) [17, 18].

El core de la estructura del HAdV consiste en el ADN genómico de doble cadena y 6 proteínas. El genoma se encuentra condensado y asociado a las proteínas V, VII y μ [19], y con el extremo terminal unido covalentemente a dos copias de la proteína terminal (TP) [20]. La proteína VII, una proteína de características similares a las histonas, organiza el genoma viral en estructuras similares al nucleosoma, permitiendo la condensación del ADN del HAdV [21, 22]. La proteína V interviene en la unión del ADN viral con la cápside, a través de interacciones con la proteína VII y la base pentón [22, 23]. Los viriones completamente maduros contienen también la proteína IVa2, que interactúa de manera específica con el promotor mayor tardío del genoma de HAdV, necesario para el empaquetamiento del ADN del virus [24, 25]. Además en el núcleo se encuentra la proteasa del HAdV (AVP), esencial en el proceso de maduración de las nuevas partículas víricas [26].

El genoma del HAdV es una molécula de ADN de doble cadena linear, con un tamaño de entre 34 a 37 kb y que porta unos 40 genes [5]. Flanqueando ambos extremos del genoma se encuentran las repeticiones terminales invertidas (ITRs) que actúan como origen de replicación junto con la secuencia de empaquetamiento (Ψ). La organización del genoma es similar en los distintos tipos de HAdV, pudiendo dividirlo en tres regiones: temprana (E1A, E1B, E2, E3, E4), intermedia (IX e IVa2) y tardía (L1-L5). Cada una de estas regiones se corresponde con los distintos patrones/etapas de expresión durante el ciclo de infección del virus (Figura 2).

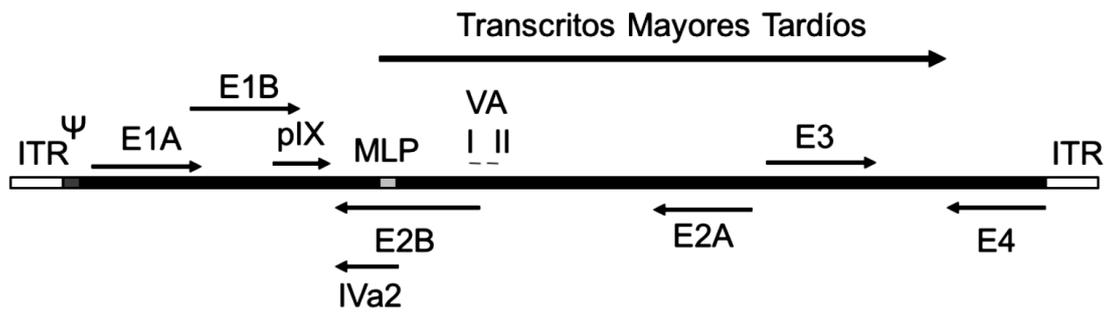


Figura 2. Esquema del genoma de HAdV5. Las flechas indican la dirección de la transcripción. Adaptada de Bratati S. et al., 2014 [27].

La infección de la célula hospedadora es un proceso que se inicia con la unión de la fibra de HAdV a sus receptores celulares; mayoritariamente el receptor de coxsackie-adenovirus (CAR) y el receptor CD46, y en menor medida la desmogleína 2 (DSG-2) son los receptores empleados por HAdV para el reconocimiento de su célula diana [28-32]. De manera alternativa, algunos miembros pertenecientes a HAdV-D reconocen el ácido siálico como receptor en lugar de CAR o CD46 y en los tipos de HAdV-2 y 5, el heparán sulfato de proteoglicanos (HSPGs) puede mediar la infección cuando la unión a los receptores CAR no es posible [17]. Tras la fase de unión, ocurre una interacción entre la base pentona del virus con las integrinas $\alpha\beta3$ y $\alpha\beta5$ celulares, permitiendo la internalización de las partículas virales a través de endocitosis mediada por clatrina [33]. Una vez dentro del endosoma, la partícula viral sufre una decapsidación parcial debida en parte a la acidificación del endosoma, causando la liberación de varias proteínas virales, entre ellas la proteína VI, cuya actividad lítica media el escape del virus al citoplasma [34, 35]. Posteriormente, el virión parcialmente decapsidado es transportado mediante la red microtubular hasta la envoltura nuclear, donde se ancla al complejo de poro nuclear, a través del cual el ADN viral junto con la proteína VII (estabilizadora del ADN) se introducen en el núcleo de la célula huésped [36] (Figura 3).

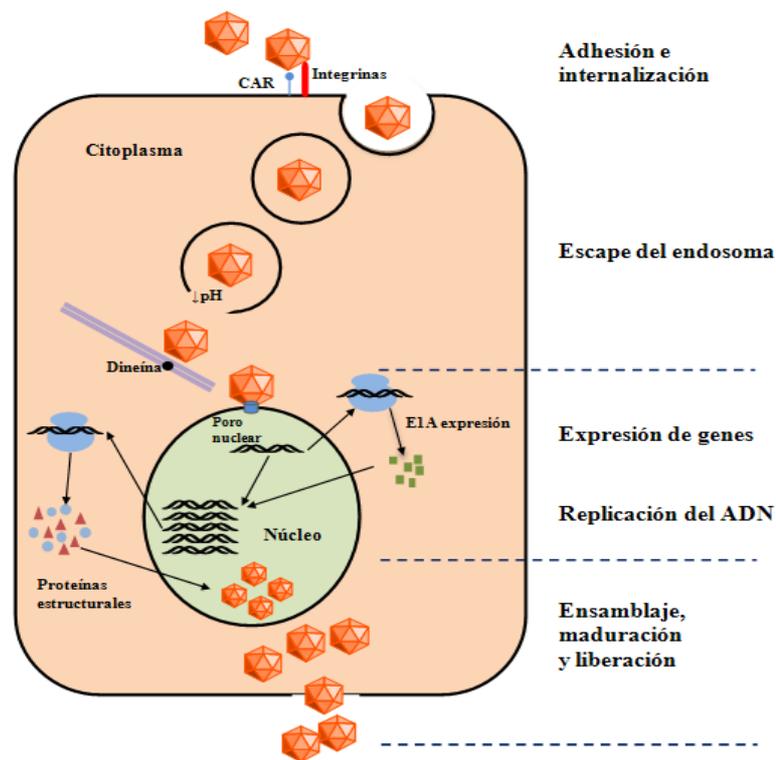


Figura 3. Representación esquemática del ciclo de vida del adenovirus. Adaptada de Martínez-Aguado P. et al., 2015 [37].

Una vez en el núcleo, el genoma viral se transcribe a ARNm temprano cuyas proteínas resultantes son esenciales para el siguiente proceso, la replicación del ADN viral (comenzando entre las 6 y 8 horas post-infección), y finalmente el ARNm tardío es sintetizado. Las nuevas proteínas de la cápsida y el core que han sido sintetizadas son importadas del citosol al núcleo celular para el ensamblaje de las nuevas partículas víricas. Un ciclo replicativo completo conlleva entre 24 y 36 horas y genera unos 10^4 viriones por célula infectada [38].

2. Epidemiología

Las infecciones más comunes causadas por HAdV son las respiratorias, oculares (faríngeo-conjuntival, queratoconjuntivitis) y gastrointestinales. En los huéspedes inmunocomprometidos pueden presentarse infecciones severas o diseminadas, pero esto ocurre rara vez en pacientes inmunocompetentes [39]. Cabe destacar además la creciente importancia que, como agente causal de la neumonía adquirida en la

comunidad, ha adquirido HAdV gracias al uso cada vez más extendido de herramientas moleculares de diagnóstico [40].

HAdV presenta una distribución global y la mayoría de las epidemias que provoca ocurren en el invierno o principios de la primavera, pero las infecciones ocurren durante todo el año sin una clara estacionalidad [41]. La mitad de los casos de infecciones por HAdV son asintomáticos, y por ello la mayoría de ellas no están documentadas, así que la información epidemiológica deriva generalmente de estudios e investigaciones de vigilancia de brotes esporádicos.

Las especies B y D de HAdV, principales responsables de las infecciones oculares, generan casos de queratoconjuntivitis y conjuntivitis hemorrágica aguda que predominan en el continente asiático durante el invierno y primavera, mientras que la fiebre faríngeo-conjuntival circula en su mayoría en China, Australia y Estados Unidos durante el verano [39]. En el caso de las infecciones respiratorias, causadas generalmente por las especies B y C de HAdV, son endémicas en la mayoría de países a nivel mundial, y suelen ocurrir en invierno, primavera y principios de verano. La gran mayoría de enfermedades gastrointestinales de HAdV que están causadas por la especie F, ocurren durante todo el año, y su incidencia varía entre el 1 y el 8% en países desarrollados, mientras que en países en vías de desarrollo se encuentra entre el 2 y el 31% [38, 39].

La transmisión del HAdV se produce fácilmente de persona a persona a través de fluidos corporales, incluyendo heces y secreciones respiratorias de las personas infectadas [38]. El HAdV es resistente a las secreciones gástricas y biliares, por lo que puede alcanzar la mucosa intestinal y replicarse. Se trata de un virus muy resistente en el medio externo, llegando a sobrevivir hasta 3 semanas en ambientes secos. Además, al tratarse de un virus sin envuelta, son resistentes a la mayoría de desinfectantes [39]. Por ello, una correcta desinfección en las unidades de trasplantes y cuidados intensivos es fundamental para evitar la transmisión del HAdV en pacientes inmunosuprimidos.

El período de incubación varía de 2 a 14 días. Es importante destacar que el HAdV puede residir latente en el tejido linfóide, parénquima renal, u otros tejidos durante años [42]. Por otro lado la reactivación del virus puede ocurrir en pacientes

severamente inmunodeprimidos [43]. El transporte asintomático del HAdV puede persistir durante semanas o meses. Debido a la estabilidad que presentan estos virus y su fácil transmisión, se han descrito importantes brotes de infección que pueden llegar a provocar epidemias que pueden propagarse rápidamente entre poblaciones cerradas (por ejemplo, hospitales, guarderías, orfanatos o piscinas públicas [39, 42]).

Tabla 1. Especies, tipos y tropismos tisulares de HAdV. Adaptada de T. Lion, 2014 [1]

Especies	Tipos (serotipos/genotipos)	Tropismo
A	12, 18, 31, 61	Entérico y respiratorio
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50, 55, 66	Respiratorio, ocular y renal
C	1, 2, 5, 6, 57	Respiratorio, ocular, hepático y linfoide
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51, 53, 54, 56, 58-60, 63-67	Ocular y entérico
E	4	Respiratorio y ocular
F	40,41	Entérico
G	52	Entérico

3. Impacto clínico de las infecciones por adenovirus

El HAdV se ha considerado durante muchos años el agente causal de enfermedades que iban desde infecciones respiratorias y oculares agudas a enfermedades gastrointestinales más severas, pero en cualquiera de los casos nunca se le asociaba a sintomatologías clínicas graves [44]. Sin embargo, hoy sabemos que el HAdV es una de las causas más comunes de enfermedades víricas asociadas con el trasplante, presentando además una elevada morbilidad y mortalidad [1, 3]. Además, el uso cada vez más generalizado de nuevas técnicas moleculares de diagnóstico ha permitido identificar al HAdV como agente causal tanto de casos aislados como de brotes de neumonía adquirida en la comunidad (NAC) en individuos inmunocompetentes [40, 45, 46].

La infección respiratoria por HAdV en individuos sanos ocurren más frecuentemente en niños sanos (en particular, menores de 4 años) o en adultos en entornos cerrados en condiciones de hacinamiento (escuelas, hospitales, instalaciones militares) [47-49]. La gran mayoría de los casos de infección cursan de manera autolimitada. Las infecciones diseminadas y fatales son raras en huéspedes inmunocompetentes [50, 51].

3.1. Infección y enfermedad en pacientes inmunodeprimidos

Las enfermedades más graves producidas por HAdV son sin duda las que afectan a los pacientes inmunodeprimidos, en los cuales la infección representa una seria amenaza para la supervivencia. Las deficiencias en el sistema inmune pueden estar causadas por deficiencias manifestadas desde la infancia (inmunodeficiencias primarias o congénitas) o al empleo de medicación inmunosupresora en el caso de pacientes receptores de trasplantes de progenitores hematopoyéticos (TPH) o de órgano sólido (TOS). En el caso de las inmunodeficiencias congénitas, particularmente en las inmunodeficiencias combinadas severas, son frecuentes las infecciones pulmonares graves y recurrentes causadas por HAdV, las cuales pueden llegar a ser letales con tasas de mortalidad de hasta el 55% [3, 52].

Actualmente, el número de TPH y TOS han aumentado espectacularmente debido a los avances de las terapias inmunosupresoras, esenciales para la prevención de

la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) en receptores de TPH, así como del rechazo en el TOS. Además de las dificultades relacionadas con la funcionalidad o el rechazo del órgano trasplantado, un problema importante después del trasplante es el desarrollo de infecciones virales, entre las cuales HAdV destaca como el virus que ha registrado el mayor incremento en su incidencia, sobre todo en las unidades pediátricas [3]. Diferentes estudios han puesto de manifiesto en los últimos años el creciente impacto de las infecciones por HAdV (principalmente de las familias B y C) en estos pacientes inmunodeprimidos [44, 53-55]. En el caso de los TOS la enfermedad está relacionada con el tipo de trasplante. De esta manera, pacientes trasplantados de pulmón, hígado, riñón o intestino delgado pueden manifestar neumonía, hepatitis, nefritis, cistitis hemorrágica, enteritis y enfermedad diseminada [56].

Los pacientes pediátricos receptores de TOS presentan una mayor incidencia y gravedad en las enfermedades producidas por HAdV que en adultos [57]. En trasplantes de hígado pediátricos, la incidencia de la infección varía del 4 al 10%, con tasas de mortalidad de un 53% [3]. Las infecciones en estos pacientes están asociadas a los serotipos 1, 2 y 5 de las especies C de HAdV. En los trasplantes renales la incidencia de la infección por HAdV alcanza el 12% con tasas de mortalidad de hasta el 18% [43]. Estas infecciones están asociadas a especies B de HAdV que provocan como síntomas principales cistitis hemorrágica y nefritis [43]. En los trasplantes de corazón y pulmón la infección por HAdV se identifica en entre el 7% y el 50% de los pacientes pediátricos, presentando un cuadro clínico caracterizado por vasculopatía coronaria, bronquiolitis o pérdidas del injerto [58]. La tasa de infección en el caso de trasplante intestinal o multivisceral se encuentra entre el 4% y 57% y en estos pacientes es frecuente encontrar casos de enfermedad diseminada por HAdV (Tabla 2) [1, 59].

Las infecciones por HAdV son frecuentes y están bien caracterizadas en el receptor pediátrico de TPH. Se manifiestan con un espectro clínico variado incluyendo neumonía, colitis, hepatitis, cistitis hemorrágica, nefritis túbulo-intersticial y encefalitis, pudiendo causar enfermedad diseminada con frecuencia fatal. La enfermedad diseminada por HAdV se observa en 10-20% de los casos, con tasas de mortalidad asociadas superiores al 50% [56]. La infección por HAdV puede ocurrir en cualquier momento después del trasplante, aunque numerosos estudios señalan una mayor incidencia durante los 100 primeros días después del TPH en adultos, mientras que

suele ser más precoz (<30 días) en pacientes pediátricos [1, 56, 60]. En pacientes pediátricos receptores de TPH alogénico se registran tasas de infección del 3-47% y mortalidades superiores al 50% (Tabla 2) que dependen de diversos factores como la edad, el régimen de condicionamiento empleado, el método diagnóstico y la naturaleza del estudio realizado (prospectivo o retrospectivo) [56, 61, 62]. Las tasas de infección en adultos suelen ser inferiores, del 3% al 15% [1, 62]. Tanto en pacientes adultos como pediátricos receptores de TPH alogénico, un aumento de la carga viral de HAdV en sangre periférica superior a 10^2 copias/ml en pacientes de alto riesgo o 10^4 en pacientes de bajo riesgo (determinada mediante PCR cuantitativa), y a pesar del tratamiento antiviral, se asocia a tasas de mortalidad cercanas al 100% [63].

La infección por HAdV en receptores de TPH generalmente se detecta dentro de los 100 días posteriores al trasplante [3, 64]. La enfermedad generalmente está localizada (por ejemplo, tracto urinario, tracto gastrointestinal, tracto respiratorio superior o inferior) pero la diseminación puede ocurrir en 10-30% de los casos[3]. La linfopenia aguda, la EICH aguda, el aislamiento de ADN de HAdV en más de un sitio, y las altas cargas virales de HAdV en plasma ($>10^4$ copias/ml) se asocian con una mayor mortalidad [39, 64]. En un estudio de 123 receptores de TPH alogénicos pediátricos consecutivos, el 12.3% desarrolló infecciones sintomáticas por HAdV. La supervivencia general fue mucho peor en los pacientes con infecciones por HAdV (15,4%) en comparación con los sujetos no infectados (50%; $p<0.03$). En el análisis multivariado, el factor de riesgo más importante asociado a la mortalidad fue la infección por HAdV ($p<0.001$) [65]. Sin embargo, el pronóstico puede ser bueno, particularmente cuando la carga viral es baja y no supera las 10^2 copias/ml en aquellos pacientes con bajo riesgo. Un estudio retrospectivo en receptores pediátricos de TPH detectó HAdV en sangre (mediante PCR) en 11 de 26 pacientes (42%), en 7 de los cuales (63%) la viremia desapareció sin tratamiento antiviral [66]. En otro estudio de 116 receptores adultos de TPH que se sometieron a una monitorización semanal de HAdV en sangre mediante PCR, 14 (12,1%) desarrollaron viremia por HAdV [64]. Sólo cinco fueron tratados con cidofovir y sólo uno murió como resultado de la infección por HAdV. En otro estudio de receptores pediátricos de TPH, la determinación semanal de HAdV en plasma identificó a 57 pacientes con infección; 8 (14%) de los cuales tenían enfermedad diseminada. Los 57 pacientes fueron tratados con cidofovir intravenoso y la curación clínica y microbiológica se logró en 56 de ellos (98%). Un paciente murió de neumonía

por HAdV [188]. La cuantificación de la carga de ADN de HAdV mediante PCR en tiempo real en plasma de receptores de TPH podría servir para identificar a los pacientes con alto riesgo de infección diseminada en base al establecimiento de puntos de corte estándares, o para evaluar la respuesta al tratamiento antiviral utilizado en cada caso [67].

La incidencia de infecciones por HAdV entre los receptores adultos de TOS presenta un rango del 5 al 22%, generalmente dentro de los primeros 6 meses posteriores al trasplante [3, 56, 68]. Se han observado infecciones por HAdV en receptores de trasplantes de hígado [69], renal, corazón [70], intestinal, y pulmón [70, 71]. Entre los receptores de TOS, los factores de riesgo para HAdV incluyen: edad pediátrica [3, 69], estado positivo para HAdV en el donante y negativo en el receptor y recepción de anticuerpos antilinfocitarios [68]. En un estudio prospectivo en pacientes pediátricos, se detectó viremia por HAdV (por PCR) dentro de los 12 primeros meses posteriores al trasplante en 19 de 263 (7.3%) receptores de TOS, incluidos: hígado (8.3%), riñón (6.5%) y corazón (6.7%) [69]. En el momento de la viremia, 11 pacientes (58%) estaban asintomáticos. Todos se recuperaron espontáneamente sin secuelas. En una revisión retrospectiva de 484 pacientes pediátricos con trasplante de hígado, 49 (10%) desarrollaron infecciones por HAdV de los cuales 9 (3.4%) murieron por infección invasiva[69]. En otra revisión retrospectiva de 191 receptores de trasplante de hígado en adultos, 11 (5.8%) tenían infección por HAdV y se documentaron 2 (1%) muertes relacionadas con HAdV [71]. En estos casos las manifestaciones clínicas de la infección por HAdV suele estar relacionado con el órgano trasplantado[59]. En los receptores de trasplante de hígado, el HAdV generalmente causa hepatitis, ictericia y hepatomegalia[3]. En pacientes con trasplante renal, la cistitis hemorrágica es el síntoma principal y además puede afectar el aloinjerto renal, lo que puede llevar a la pérdida del injerto [38]. En los receptores pediátricos de trasplante cardíaco, la presencia de HAdV en las biopsias endomiocárdicas posteriores al trasplante aumentó el riesgo de pérdida del injerto y de enfermedad de la arteria coronaria posterior al trasplante [72, 73]. En una cohorte de 383 receptores de trasplante de pulmón, solo se identificaron 4 infecciones por HAdV que corresponde a una incidencia en pacientes pediátricos del 8% y en pacientes adultos del 0.4%. Sin embargo, los cuatro desarrollaron neumonía hemorrágica severa y necrotizante y todos murieron durante los 45 días posteriores al trasplante [74].

Aunque el HAdV puede causar infecciones fatales en los receptores de TOS, no se han establecido las indicaciones para el tratamiento con cidofovir para infecciones leves. La viremia por HAdV puede ser asintomática y desaparecer espontáneamente[70]. No se recomienda la vigilancia de rutina de PCR en los receptores adultos de TOS. Además, el tratamiento con cidofovir se reserva para pacientes sintomáticos con neumonía o infección diseminada [39].

Tabla 2. Impacto clínico de las infecciones por HAdV en pacientes receptores de TPH y TOS adultos y pediátricos.

		Incidencia de la infección	Mortalidad
TPH	Adultos	3-15%	>50%
	Pediátricos	3-50%	>60%
TOS	Adultos	4-20%	1-10%
	Pediátricos	4-60%	>60%

3.2. Infección y enfermedad en pacientes inmunocompetentes

Las infecciones causadas por HAdV en pacientes inmunocompetentes suelen ser autolimitadas, de carácter leve y cursar de manera asintomática, sin embargo, cada vez con más frecuencia se reportan en la literatura científica casos de infecciones respiratorias graves por HAdV, en algunos casos con resultados fatales para el paciente [75, 76]. Los brotes epidémicos en individuos inmunocompetentes suelen ocurrir durante los meses de invierno y primavera, mientras que en pacientes inmunocomprometidos ocurren durante todo el año. La mayoría de las infecciones ocurren durante los primeros 5 años de vida, con un pico de incidencia a los 2 años [77, 78], debido a la inmadurez de la respuesta inmune de tipo humoral.

La mayoría de infecciones respiratorias están asociadas a especies C de HAdV y en niños suponen un 15% de todas las infecciones que ocurren en el tracto respiratorio superior y el 5% en el inferior [77]. En general, estas infecciones respiratorias no revisten gravedad, sin embargo se dan casos, especialmente en individuos jóvenes, donde pueden requerir el ingreso en unidades de cuidados intensivos [79], la utilización de ventilación mecánica asistida [79, 80], o de soporte vital extracorpóreo [81]. Frecuentemente se han documentado casos de infecciones por HAdV en adultos inmunocompetentes, especialmente en el personal militar [50]. Actualmente existe una vacuna para el personal militar estadounidense en forma de tabletas que previene las enfermedades respiratorias causadas por los tipos 4 y 7 de HAdV (especies E y B respectivamente) la cual presenta una eficacia del 99,3% [82]. Por otro lado, desde hace una década y gracias al desarrollo de modernas técnicas en biología molecular, se ha detectado un aumento de los casos graves de NAC en adultos sanos causada principalmente por los tipos 3, 7, 11 y 14 de HAdV-B [45]. Los HAdV son los agentes causales del 3% de las NAC, y más del 60% de los pacientes en los que se produce la enfermedad, necesitan intubación y ventilación mecánica [83]. Las tasas de mortalidad se sitúan en torno al 24% [84], pese a que en algunos casos la administración temprana de cidofovir se ha relacionado con mejorías sintomáticas de la enfermedad [85].

En niños, las infecciones gastrointestinales producidas por los tipos 40 y 41 de HAdV-F, son responsables de entre el 5-15% de las diarreas agudas [86]. Una de las infecciones más contagiosas son las queratoconjuntivitis producidas por los HAdV-D, que pueden resultar en una disminución de la capacidad visual de los pacientes afectados [87].

A pesar de la manifiesta existencia de inmunidad adquirida en la mayoría de adultos frente a múltiples tipos de HAdV, existen evidencias de infecciones latentes en los sistemas linfáticos, gastrointestinal y urinario [42, 88, 89]. Estas infecciones permiten la detección de los virus en las heces y orina después de una infección aguda e incluso en casos de infecciones asintomáticas. Un requisito indispensable para el desarrollo de infecciones persistentes por HAdV es evadir al sistema inmune del hospedador mediante diversos mecanismos. Entre estos se incluye la inhibición de la apoptosis en las células infectadas, anular las respuestas al interferón y el factor de necrosis tumoral, la prevención de la expresión del complejo mayor de

histocompatibilidad de clase I, y el bloqueo de las respuestas inmunes tanto celular como adaptativa [90-93].

4. Respuesta inmune frente al HAdV

La infección viral es un proceso que comprende múltiples etapas desde la entrada del virus, la replicación de su genoma, la transcripción y la liberación de viriones recién formados. La célula infectada puede detectar uno o más de estos eventos, lo que desencadena la secreción de IFN- α/β o la activación de otros mecanismos de defensa, como la apoptosis. Ciertos tipos de células pueden reconocer una infección temprana incluso antes de que se replique el virus, pudiendo responder a ella mediante la apoptosis [94-96]. Sin embargo, la mayoría de los tipos de células reconocen los virus entrantes en una etapa posterior al detectar moléculas de ARN de doble cadena (ARNdc) que se producen durante el proceso de replicación de muchos virus de ARN y ADN. La detección de ARNdc provoca la producción de citoquinas como el IFN tipo I (IFN- α/β), que normalmente no se sintetiza por células no infectadas [96]. La secreción de IFN- α/β se produce rápidamente después de la infección viral. Esta respuesta temprana de producción de citoquinas inducida por el virus no se limita a IFN- α/β . Ciertos virus tienen el potencial de infectar y activar rápidamente a macrófagos para producir citoquinas antivíricas adicionales, como TNF- α [96, 97], que pueden desencadenar actividades antivirales independientes. Otra citoquina involucrada a este nivel sería la interleuquina-2 (IL-2), un factor de crecimiento de células T que regula la proliferación y diferenciación de linfocitos y que, junto a TNF- α forma parte de las citoquinas proinflamatorias. La IL-2 actúa aumentando el recuento de células CD4 y, por lo tanto, ayudando a reconstituir el sistema inmunitario [98]. Además, estimula la síntesis de interferón, y la liberación TNF- α y TNF- β lo que desemboca en un aumento de la respuesta inmunológica [98]. No obstante, la inducción de IFN- α/β es ampliamente aceptada como la respuesta del huésped antiviral más inmediata e importante a muchas infecciones virales [97].

Se sabe que IFN- α/β inhibe la replicación de muchos virus *in vitro*, incluidos picornavirus (PCV), retrovirus, virus influenza (VI), virus de la estomatitis vesicular (VSV), virus del herpes simple (HSV), adenovirus, reovirus [96], virus de la hepatitis B y C [99, 100], entre otros. Además, muchos virus son sensibles a la actividad antiviral de

IFN- α/β *in vivo* porque se replican de forma incontrolable en ratones que recibieron anticuerpos neutralizantes contra IFN- α/β [101] o que fueron genéticamente deficientes para el receptor de IFN- α/β [102-104] o IFN- γ [104]. Sin embargo, en la mayoría de estos estudios *in vivo*, es difícil determinar si el IFN- α/β contribuyó a la eliminación viral mediante mecanismos antivíricos directos o inmunorreguladores indirectos. Sin embargo, se demostró que *in vivo* IFN- α/β inhibía la replicación de ciertos virus no citopática [105] y, por lo tanto, que éstos no respondían a la actividad inmunorreguladora de la citoquina. Finalmente, es importante tener en cuenta que los diferentes virus pueden ser sensibles al IFN- α/β [96]. De hecho, incluso diferentes cepas del mismo virus pueden ser sensibles al IFN- α/β [105].

Además de sus actividades antivirales directas, IFN- α/β puede inhibir la división celular, estimular las funciones efectoras de las células NK, CTL y macrófagos, regular la expresión de las moléculas MHC de clase I y MHC de clase II, inducir la síntesis de Ig en las células B [102], y estimular la proliferación de células T con fenotipo de memoria [106]. Todas estas funciones sugieren que IFN- α/β puede controlar las infecciones virales no solo por sus actividades antivirales directas, sino también por la modulación de la respuesta inmune innata y adaptativa [107].

Las poblaciones derivadas de células T son las encargadas de migrar el tejido infectado, reconocer el antígeno viral y realizar sus funciones efectoras, donde se incluye la producción de citoquinas antivirales, especialmente IFN- γ , IL-2 y TNF- α [98].

Tanto IFN- γ , IL-2 como TNF- α pueden jugar un papel crítico en el control de la infección viral en varios niveles diferentes. Primero, pueden reclutar y activar macrófagos, células NK y células T para realizar sus funciones efectoras, incluida la producción de citoquinas y citoquinas inmunorreguladoras y antivirales [98, 104]. En segundo lugar, pueden polarizar la respuesta de las células T hacia el desarrollo de funciones efectoras antivirales necesarias para el control de las infecciones virales. En tercer lugar, pueden regular el procesamiento de antígenos, el transporte y la expresión de MHC localmente en las células infectadas [107]. Finalmente, pueden ejercer actividad antiviral directa.

Los efectos antivirales de las citoquinas inflamatorias están mediadas por las vías celulares inducidas que interfieren con una o más etapas en el ciclo de replicación

viral que acaba en la eliminación completa o parcial del virus en la célula mientras que mantiene su integridad funcional [106].

Los anticuerpos antivirales acaban siendo detectables relativamente tarde en la mayoría de las infecciones cuando se piensa que son los principales responsables de la prevención en la diseminación célula-célula y en la resistencia a la reinfección [102]. Sin embargo, en ciertos casos, los anticuerpos antivirales también pueden controlar la producción o liberación de virus de las células infectadas, y pueden actuar sinérgicamente con las citoquinas antivirales en este sentido [98, 102].

Al igual que otros virus, la replicación de HAdV está controlada por las respuestas inmunitarias innata y adaptativa [98]. La secreción rápida de citoquinas antivirales, como interferón gamma (IFN- γ), factor de necrosis tumoral (TNF), interleukina-1 (IL-1), IL-2, y proteína inflamatoria de los macrófagos, es desencadenada por HAdV y se dirige a diferentes pasos en el ciclo viral, lo que limita la amplificación y propagación del virus.

Además, las células efectoras innatas, en particular las *natural killer*, que pueden destruir las células infectadas por virus de forma inespecífica, son reclutadas y activadas [98, 108]. El efecto de las citocinas inducidas por la infección es contrarrestado por productos virales como la proteína de 55 kDa E1B, codificada por HAdV. Esta proteína media la represión transcripcional de los genes inducibles por IFN, lo que facilita la replicación viral [1, 109].

4.1. Respuesta innata

La respuesta innata contra HAdV implica factores intrínsecos presentes a niveles constantes y factores innatos dirigidos por la célula huésped ante la exposición viral. Estos factores ejercen efectos antivirales al unirse directamente al virus o a componentes virales [110].

Los anticuerpos, en particular las Ig, protegen contra las infecciones letales causadas por virus, incluidos los HAdV [110]. Surgen principalmente de células plasmáticas y otras células B innatas, y se dirigen contra epítomos específicos de

proteínas virales u otros productos biológicos. Las Ig normalmente reconocen sus dianas en el espacio extracelular, bloquean sus funciones biológicas y los dirigen a la degradación en las células inmunitarias para la presentación de antígenos [91].

Por otro lado, los péptidos antimicrobianos son efectores inmunes innatos potentes que se han conservado a través de la evolución. En la infección por HAdV, la inhibición por las α -defensinas ocurre temprano durante la entrada, y estudios detallados identificaron la penetración del endosoma como el paso específico bloqueado por las mismas [111].

Además de proporcionar la primera línea de defensa, el sistema inmune innato apoya la proliferación y la diferenciación de la respuesta inmune adaptativa mediada por los linfocitos T y B. La generación de linfocitos T específicos contra HAdV facilita la lisis de las células infectadas mediante un mecanismo dependiente de perforina [1, 112].

4.2. Respuesta adaptativa

Aunque la gran cantidad de tipos existentes de HAdV implica que puede esperarse que la expresión de antígenos que representan potenciales dianas de los linfocitos T sea altamente polimórfica, las células T producidas contra HAdV, incluyendo los subconjuntos CD4 y CD8, mostraron una reactividad cruzada con diferentes especies de adenovirus [113]. Estas observaciones indican que dichos linfocitos T reconocen secuencias conservadas de residuos de aminoácidos de una proteína estructural de HAdV [114]. De hecho, una de las dianas inmunodominantes más importantes de las células T es la proteína hexón adenoviral, que contiene componentes antigénicos genéricos comunes a todas las especies de adenovirus [115]. Por lo tanto, se cree que la exposición a los HAdV durante la infancia y la consiguiente generación de linfocitos T citotóxicos con reacción cruzada conducen a una amplia inmunidad frente a HAdV en adultos [116-118].

Las personas sanas suelen portar linfocitos T específicos contra HAdV, que pueden identificarse por diversos métodos, como los ensayos de secreción de interferón gamma, la citometría de flujo de citoquinas o la detección de multímeros de clase I del

complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) [115, 119, 120]. La ausencia de células T específicas contra HAdV tiene un impacto negativo en el curso de las infecciones por HAdV y, de igual modo, la reconstitución de la respuesta de linfocitos T específicos contra HAdV se correlaciona con el control de la infección [119, 121]. El hecho de que los epítomos reconocidos por los linfocitos T CD4 y CD8 sean compartidos entre diferentes especies y tipos de HAdV sugiere que las células T con estas especificidades pueden proteger contra la mayoría, si no todos, los HAdV, y este hecho puede ser utilizado para la inmunoterapia mediante la utilización de la transferencia de células T adoptiva o basada en vacunas para tratar infecciones por estos virus.

A pesar de esta reactividad cruzada significativa entre los diferentes serotipos de HAdV en las respuestas de células T que parecen reconocer epítomos recientemente caracterizados en la proteína hexón, se ha visto que los HAdV presentan genes que codifican para proteínas inmunorreguladoras que pueden atenuar las respuestas inmunitarias innatas o adquiridas [43]. Muchas de estas proteínas están codificadas por los genes de la región de transcripción temprana E3 y no son esenciales para la replicación viral en el cultivo celular. Por ejemplo, E3-gp19K bloquea el transporte de antígenos MHC de clase I a la superficie de la célula infectada mediante su unión a la tapasina, una proteína transmembrana de tipo I que ayuda a las moléculas MHC de clase I a permanecer en su estado de péptido receptivo. Estos procesos conducen a la inhibición de señales para la activación de las células T citotóxicas [115, 121]. Otros genes E3 antiapoptóticos, como los que codifican para el complejo de proteínas RID α / β (internalización y degradación del receptor), inhiben la muerte celular inducida por TNF- α . También se ha demostrado que las proteínas E3 inhiben la estimulación por TNF- α de la síntesis de citoquinas (IL-8, MCP 1 e IP-10)[114]. Estos y otros mecanismos inmunomoduladores, así como las propiedades citolíticas del virus en sí, pueden ser responsables de las manifestaciones de la enfermedad adenoviral [43, 121].

5. Tratamientos antivirales frente al adenovirus humano

El tratamiento de la infección por HAdV solo se recomienda en pacientes inmunocomprometidos, especialmente en pacientes sometidos a alo-TPH, que tienen el mayor riesgo de infección grave [1, 37]. Actualmente no se dispone de una terapia

antiviral eficaz y segura para el tratamiento de las infecciones por HAdV. Se han reportado resultados muy variables en cuanto a su eficacia para varios agentes antivirales [122, 123]. Entre los fármacos antivirales disponibles en el mercado, solo el ganciclovir (GCV), la ribavirina y el cidofovir (CDV) mostraron una eficacia *in vitro* contra diferentes serotipos de HAdV (Figura 4) [124].

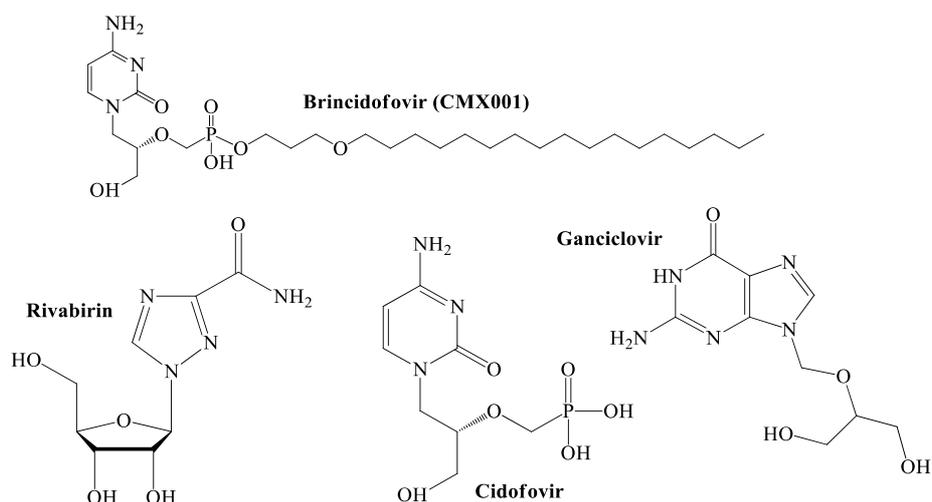


Figura 4. Estructura de los fármacos antivirales de amplio espectro de uso común para el tratamiento de infecciones por HAdV [37].

Cidofovir es un análogo de nucleótido de la citosina que inhibe la replicación del ADN viral mediante una incorporación competitiva más eficiente en el ADN (Figura 5). Muestra eficacia contra varios virus de ADN, pero solo está aprobado por las autoridades sanitarias para su uso en el tratamiento de la retinitis por HCMV en pacientes con SIDA [125, 126]. Cidofovir exhibe actividad antiviral contra todas las especies de HAdV, pero tiene una biodisponibilidad oral baja y una toxicidad significativa (necrosis tubular), además de no conferir protección a largo plazo [127]. Además, en 2014, Gilead Sciences, el fabricante de cidofovir (Vistide®), solicitó formalmente la cancelación de la autorización para comercializar cidofovir en Europa, alegando problemas con su producción y la disponibilidad de terapias alternativas para las indicaciones para las que fue aprobado (retinitis por HCMV) [37]. Actualmente, e incluso con su baja biodisponibilidad y nefrotoxicidad, el cidofovir es el fármaco anti-HAdV de elección para la terapia preventiva [128] o en aquellos casos más graves donde la infección ya se ha identificado [129]. La eficacia clínica informada de

cidofovir frente al HAdV en el contexto del alo-TPH es altamente variable, ya que algunos estudios muestran una baja o completa falta de eficacia, mientras que otros muestran tasas de éxito superiores al 70% [37].

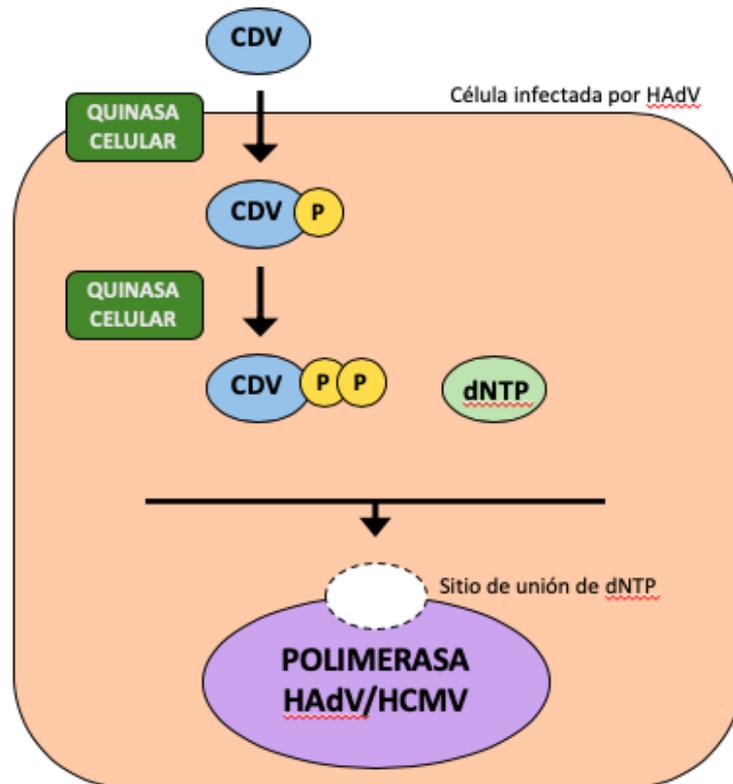


Figura 5. Mecanismo de acción del CDV.

Brincidofovir (CMX001), un conjugado lipídico biodisponible por vía oral de cidofovir, utiliza proteínas de la membrana plasmática celular (flipasas) para una rápida entrada en las células, lo que resulta en concentraciones intracelulares más altas [130]. Se ha demostrado que es eficaz para erradicar la infección diseminada por HAdV cuando se evalúan en el modelo de hámster sirio, que es permisivo para la replicación de HAdV5. En este modelo, los hámsteres sirios están inmunosuprimidos con ciclofosfamida, lo que aumenta la replicación del virus en varios órganos (principalmente en el hígado) y la patología HAdV. La eficacia y seguridad mostrada por brincidofovir en el tratamiento de infecciones por HAdV en este modelo animal de infección impulsó su estudio en posteriores ensayos clínicos para evaluar su eficacia y seguridad como parte de su desarrollo clínico [131]. La administración de brincidofovir ha demostrado ser segura en voluntarios sanos [132, 133]. En 2016 finalizó un estudio

multicéntrico de Fase III para evaluar la eficacia de brincidofovir en el tratamiento de la infección por HAdV del que lamentablemente no se han reportado resultados hasta el momento (NCT02087306) [133].

La ribavirina es un agente antiviral de amplio espectro que muestra actividad *in vitro* contra los virus de ADN y ARN. Es un análogo de nucleósido de la guanosina, pero su mecanismo de acción es incierto y aún controvertido, con diferentes mecanismos propuestos para explicar su actividad [124, 134, 135]. La ribavirina tiene actividad variable contra diferentes tipos de HAdV, mostrando una actividad máxima contra el subgrupo C, aunque las concentraciones plasmáticas alcanzadas por la ribavirina son 10 veces más bajas que el valor IC₅₀ requerido [136].

El GCV es otro análogo de nucleósido que se ha utilizado para el tratamiento de infecciones por HAdV, con resultados variables [61]. El trifosfato de GCV es un inhibidor eficaz de la ADN polimerasa de HAdV *in vitro* (Figura 6) [124]. Sin embargo, debido a que HAdV carece de la timidina quinasa viral, y las quinazas celulares son ineficientes para la fosforilación de GCV, su actividad anti-HAdV es pobre (Figura 6).

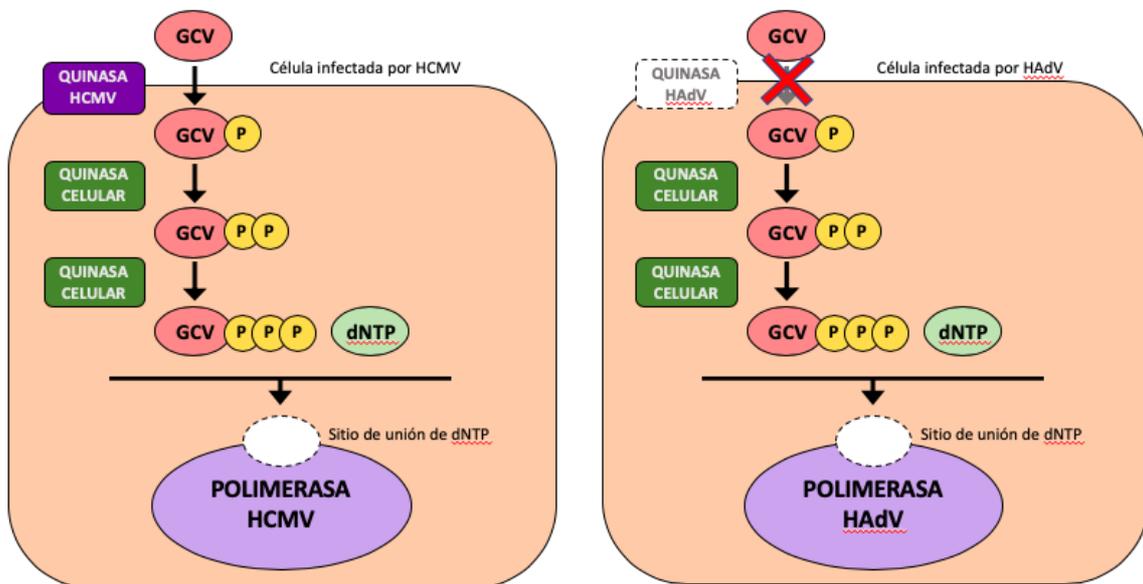


Figura 6. Mecanismo de acción del GCV frente HCMV y HAdV.

Algunos estudios retrospectivos han mostrado una menor incidencia de infección por HAdV en pacientes que reciben GCV como profilaxis frente a HCMV

[137]. Sin embargo, GCV no mostró una reducción significativa de la infección cuando se usó para tratar las infecciones por el HAdV y, además, indujo neutropenia, lo cual es especialmente crítico en pacientes que reciben TPH [137]. Según estos datos, no hay justificación para usar este medicamento para el tratamiento de HAdV; sin embargo, un artículo reciente demostró que el GCV fue eficaz en el tratamiento de la infección por HAdV en un modelo de Hámster sirio, lo que devolvió el GCV al repertorio opcional de medicamentos anti-HAdV [37]. Además, un profármaco de éster valílico de GCV, valganciclovir (VGCV), ha mostrado una actividad anti-HAdV significativa en el mismo modelo animal de infección [138]. El hámster sirio es permisivo para la replicación de HAdV en órganos y tejidos y la infección causa una patología similar a la observada en humanos [132].

II. JUSTIFICACIÓN

De entre todos los agentes infecciosos relacionados con el trasplante, las infecciones virales representan una causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes receptores de trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) [139]. Mientras que las infecciones causadas por HCMV continúan siendo las más frecuentes entre las infecciones virales en pacientes trasplantados [140], las mejoras en las técnicas diagnósticas realizadas en los últimos años han permitido la identificación de otros virus capaces de producir infección tras el TPH, los cuales son causa significativa de morbilidad y mortalidad [53, 141]. Entre ellos, HAdV destaca como el virus que mayor incremento ha registrado en cuanto a su incidencia [3]. El TPH alogénico constituye un factor de riesgo mayor de la infección por HAdV, conjuntamente con la edad [1]. En estos pacientes, la presencia de adenoviremia se asocia con enfermedad grave [1]. La incidencia de las infecciones por HAdV en pacientes receptores de alo-TPH no está actualmente bien definida, especialmente en adultos; así, algunos estudios muestran tasas de incidencia del 3% al 47% en pacientes pediátricos [1, 56, 142], mientras que dichas tasas parecen ser inferiores en pacientes adultos, del 3% al 15% [1, 143]. Aunque la mortalidad general de las infecciones por HAdV es aparentemente menor en pacientes adultos sometidos a alo-TPH, en trabajos previos la enfermedad potencialmente mortal se ha asociado invariablemente con la ADNemia de HAdV [1, 144, 145]; sin embargo, esta afirmación se deriva fundamentalmente de estudios realizados en pacientes pediátricos receptores de un alo-TPH [144] o en una evaluación retrospectiva de pacientes pediátricos y adultos previamente seleccionados después del diagnóstico de enfermedad diseminada por HAdV [145]. Es frecuente un resultado fatal en casos de enfermedad diseminada, con tasas de letalidad reportadas que alcanzan hasta 60-80% para niños y adultos [128, 144-147].

En un estudio retrospectivo reciente que monitorizaba la reactivación de HAdV en receptores de TPH alogénico, se muestran viremias por HAdV en el 15% de los pacientes, los cuales presentaban además una cinética de reconstitución de linfocitos CD4+ significativamente más lenta que aquellos pacientes que no presentaron viremia [1, 148]. En otro estudio prospectivo reciente, en el que se evaluaba la reconstitución de linfocitos en pacientes sometidos a doble trasplante de sangre del cordón umbilical, observaron que para el día 30 el conteo de linfocitos era altamente predecible, con retraso en la recuperación de células T CD4+ y CD8+ virus-específicas durante el primer año post-trasplante, sugiriendo que la mejora en la reconstitución de células T

virus-específicas jugaría un papel importante en la evolución clínica de estos pacientes [149]. Por otro lado, Guérin-El Khourouj *et al.* mostraron que la monitorización de la secreción de INF- γ por los linfocitos CD4⁺ HAdV-específicos resultaba de gran utilidad en la detección precoz de pacientes de alto riesgo, especialmente en aquellos con compatibilidad 9/10 en el HLA [150]. En pacientes adultos, se postulan como factores de riesgo el trasplante haploidéntico o de cordón de donante no emparentado, la enfermedad injerto contra huésped (EICH) de grado III/IV y el tratamiento con alentuzumab [38, 56, 142, 146, 148, 151], aunque éste último fármaco ya no forma parte en general del tratamiento de los pacientes receptores de trasplante.

En pacientes pediátricos, la detección de cargas virales elevadas de HAdV en heces medidas por PCR puede preceder a la detección de la viremia en días o semanas posteriores y, por el contrario, la eliminación fecal en niveles bajos no se sigue de viremia posterior [128]. Como ocurre con el HCMV, la identificación precoz de los pacientes que están en riesgo de desarrollar enfermedad invasiva por HAdV, monitorizando la viremia por PCR antes de la aparición de enfermedad, podría ser beneficiosa para estos pacientes. Algunos centros realizan vigilancia de la replicación de HAdV en receptores de alo-TPH pediátricos; aunque puede producirse el aclaramiento espontáneo de la viremia, valores crecientes se relacionan con la aparición de enfermedad invasiva. Si se detecta viremia, estaría indicada la monitorización de enfermedad de órgano, para lo que se tomarían muestras de las localizaciones más frecuentes. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con HCMV, el beneficio del tratamiento anticipado basado sólo en la detección de viremia no se ha establecido y no se ha recomendado de forma rutinaria dada la toxicidad asociada al uso de cidofovir. Por otro lado, el tratamiento anticipado con cidofovir podría reducir la carga viral pero no hay datos claros que apoyen que reduce la incidencia de enfermedad, ni que sea eficaz en el tratamiento de la enfermedad ya establecida [152]. Por otro lado, y a pesar de sus prometedores resultados, el brincidofovir, conjugado lipídico del cidofovir, está siendo actualmente evaluado en un ensayo clínico fase III [132, 153] y, por tanto, no está en la actualidad disponible en la práctica clínica.

En los pacientes adultos no están bien definidas las recomendaciones del cribado con carácter general. Según las guías europeas [151] podría estar recomendado en pacientes de alto riesgo (BIII) y prolongarse en función del grado de reconstitución

inmune. En estos pacientes (alto riesgo) si se detecta viremia, podría estar indicado el tratamiento anticipado (BIII) y la monitorización semanal de la viremia por PCR cuantitativa [151].

En cuanto a las indicaciones para el tratamiento de la enfermedad establecida [151], estaría indicado tanto en la enfermedad probable (síntomas focales más PCR positiva en la muestra correspondiente o síntomas generales y PCR positiva en sangre, excluyendo otras etiologías infecciosas) como en la probada (síntomas focales y detección de HAdV en biopsia o LCR, y fallo multiorgánico con detección de adenovirus en necropsia) [151]. El tratamiento de elección, en ausencia de un fármaco específico aprobado para este uso, era cidofovir (BIII), hasta su reciente retirada, en distintas pautas de dosificación, sin que ninguna demostrara ser superior a otra. Como tratamiento coadyuvante se puede considerar utilizar IgG (BIII), reducir la inmunosupresión si es posible (AII), y utilizar células T con inmunidad específica (BIII).

La transferencia adoptiva de linfocitos T específicos de antígeno es una estrategia prometedora para el tratamiento de infecciones por HAdV [154]. Hay varias aproximaciones posibles que tienen en común la obtención de linfocitos autólogos, que son estimulados *ex vivo* y expandidos artificialmente para ser reinfundidos. El riesgo de infección por HAdV está asociado, como en otras infecciones virales, con la falta de recuperación de las células T específicas endógenas. El conocimiento detallado de la respuesta inmune celular en infecciones por HAdV en pacientes receptores de TPH resulta de gran importancia a la hora de diseñar nuevas aproximaciones de terapias celulares, para proveer al paciente de protección fisiológica mediante la transfusión de células T específicas frente a HAdV [148, 150].

Mientras que frente a HCMV existen estrategias establecidas de profilaxis, así como tratamientos antivirales de elección, como ganciclovir, en la actualidad no existe un antiviral específico aprobado para su uso frente a HAdV. El agente terapéutico más utilizado actualmente es cidofovir, análogo de nucleótido, aunque no ha sido aprobado por las autoridades sanitarias para su uso específico frente a HAdV. Se necesitan grandes estudios prospectivos para optimizar el diagnóstico y el uso de agentes antivirales disponibles en la actualidad porque las indicaciones para el TPH se han

incrementado enormemente después de la introducción de acondicionamientos no mieloablativos y la mayor aplicación de los procedimientos de trasplante con células T deplecionadas [137].

El GCV está aprobado para la profilaxis de HCMV en pacientes trasplantados, y en dichos casos puede haber suprimido la infección diseminada por HAdV [137], por lo que el GCV podría considerarse una opción para el tratamiento de infecciones por HAdV en personas inmunocomprometidas [129].

En estudios previos se ha sugerido que el uso de GCV, utilizado como estrategia preventiva o profiláctica para las infecciones por HCMV, era capaz de reducir moderadamente la incidencia de infecciones por HAdV, lo que indica un posible papel en su profilaxis [155], aunque hasta ahora no se ha observado una correlación entre la incidencia de infección o enfermedad por HCMV y la de infección HAdV [61, 137]. Se ha visto también que la incidencia de infección por HCMV es similar entre pacientes que desarrollaron infección por HAdV post-trasplante y aquellos que no. Además, en aquellos pacientes con infección por HAdV, cuando se presenta también infección por HCMV, el inicio de ésta ocurre con mayor frecuencia después de la infección por HAdV, lo que sugiere que HCMV no promueve la reactivación del virus [137].

El tratamiento de las infecciones por HAdV usando GCV en humanos ha sido una práctica controvertida, ya que la razón científica detrás de esto es tenue, pues para su efectividad, el GCV debe ser inicialmente fosforilado por una quinasa viral a la forma de monofosfato activo y no se conoce que los genomas de HAdV codifiquen ninguna quinasa [125]. Sin embargo, el GCV a elevadas concentraciones micromolares puede inhibir la replicación de HAdV *in vitro*, y existe alguna publicación puntual sobre su eficacia clínica para el tratamiento de la infección por HAdV y la patogénesis en pacientes trasplantados [44, 129], aunque su actividad es menor que frente a HCMV [123, 156, 157].

Entre los diferentes aspectos que necesitan ser esclarecidos relativos a la infección por HAdV en receptores adultos de TPH destaca la importancia de la determinación de la carga viral del HAdV en sangre, a partir de la cual poder catalogar la infección por HAdV en cuanto a su asociación con la presencia de síntomas clínicos [54, 151]. La vigilancia y la monitorización de la carga viral del HAdV, en muestras

biológicas de pacientes inmunodeprimidos asintomáticos de alto riesgo, permitiría iniciar un tratamiento anticipado y reducir la morbilidad y mortalidad, así como ayudaría a reducir costes asociados tanto a la estancia hospitalaria como al tratamiento farmacológico de los pacientes [147, 148, 158]. Una vez analizada la influencia de la carga viral en la evolución clínica de los pacientes podría establecerse un punto de corte, al igual que se ha estandarizado para HCMV, a partir del cual aconsejar la utilización del tratamiento antiviral anticipado. Otro aspecto que requiere mayor conocimiento sería el estudio, en paralelo, de la carga viral asociada a la respuesta inmune específica frente a HAdV, lo cual permitiría identificar aquellas poblaciones de mayor riesgo de infección diseminada en función de su potencial capacidad para desarrollar una respuesta inmunitaria apropiada. Estos conocimientos ayudarán a sentar las bases para la caracterización de las infusiones celulares que mejor rendimiento aportarían en el caso de la terapia celular, además de aportar información sobre factores de riesgo alternativos a tener en cuenta en el seguimiento de estos pacientes.

Además, sería de gran utilidad conocer en qué condiciones el GCV podría suponer una alternativa terapéutica de utilidad para el tratamiento de las infecciones por HAdV, y si éstas guardan relación con la infección concomitante con HCMV.

III.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis

- 1.1. En los pacientes adultos receptores de trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH) existe una replicación de HAdV que puede monitorizarse a través de la determinación de la carga viral en sangre periférica.
- 1.2. La infección asintomática de HAdV en los pacientes adultos con alo-TPH despierta una respuesta inmune específica, la cual se relaciona con linfocitos T CD4+ y CD8+.
- 1.3. El conocimiento de la interrelación entre la carga viral plasmática de HAdV y la respuesta inmunitaria específica, permitiría conocer el riesgo de infección persistente por adenovirus en los pacientes adultos receptores de alo-TPH.
- 1.4. La actividad *in vitro* de ganciclovir frente a HAdV está aumentada en condiciones de co-infección con HCMV.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general:

El objetivo general del presente estudio es evaluar la incidencia e impacto clínico de la infección por HAdV en los pacientes receptores de TPH alogénico (alo-TPH) y determinar el papel de la inmunidad celular específica en la evolución de la misma.

2.2. Objetivos específicos:

1. Determinar la incidencia y la cinética de replicación del HAdV en los pacientes adultos receptores de alo-TPH mediante la determinación de la carga viral en sangre, durante los 100 primeros días postrasplante.
2. Evaluar la respuesta inmune celular específica frente a la infección por HAdV en pacientes adultos receptores de alo-TPH, y su relación con la presencia y evolución de la infección.
3. Determinar los factores de riesgo y las variables clínicas asociados a la infección y enfermedad de HAdV en pacientes adultos receptores de alo-TPH, incluyendo la enfermedad subyacente, el grado de acondicionamiento (mieloablatoivo vs. intensidad reducida), y el tratamiento inmunosupresor utilizado.
4. Evaluación *in vitro* de la actividad de GCV frente a HAdV en condiciones de mono-infección y de co-infección con HCMV.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño del estudio

Se realizó un estudio de cohortes prospectivo de casos consecutivos en el Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla, desde febrero de 2016 hasta mayo de 2018. Se incluyeron todos los pacientes mayores de 14 años que recibieron un TPH alogénico, diferenciando entre TPH alogénico de alto riesgo (haploidénticos o cordón no emparentado, depleción de células T, linfopenia severa (recuentos de células CD3+ < 300/ μ l) y pacientes con EICH) y TPH alogénico de bajo riesgo.

2. Ámbito del estudio

El proyecto se realizó en el Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla, con la participación de investigadores de los Servicios de Hematología, Enfermedades Infecciosas y Microbiología,

3. Sujetos de estudio y criterios de inclusión y de exclusión

- Criterios de inclusión:

- a) Pacientes adultos (mayores de 14 años) receptores de TPH alogénico.
- b) Haber firmado el consentimiento informado previa información del estudio al paciente (ANEXO I).

- Criterios de exclusión:

- a) Pacientes que no hayan firmado el consentimiento informado.
- b) Pacientes en los que, debido a su estado clínico, no era posible realizar la extracción de las muestras sanguíneas.

4. Definiciones

Debido al hecho de que técnicas altamente sensibles como la PCR se han convertido en el estándar para la detección y la monitorización de las infecciones por HAdV, la Conferencia Europea sobre Infecciones en Leucemia (ECIL) recomendó en 2011 las siguientes definiciones [151]:

- i) Infección local: PCR positiva para HAdV, aislamiento del virus o detección del antígeno en biopsia o fluidos diferentes a la sangre periférica.
- ii) Infección sistémica (invasiva): PCR positiva para HAdV (Viremia/DNAemia), aislamiento del virus o detección del antígeno en sangre periférica.
- iii) Enfermedad probable: infección por HAdV más síntomas y signos correspondientes sin confirmación histológica.
- iv) Enfermedad comprobada: infección por HAdV más síntomas correspondientes relacionados con la infección, con confirmación histológica de la infección por HAdV en el lugar apropiado.

A efectos del presente estudio, y con los conocimientos actuales, la infección local sería equivalente a la enfermedad probable localizada, en presencia de síntomas, tales como conjuntivitis o diarrea.

5. Monitorización y seguimiento de los pacientes

El estudio se llevó a cabo durante los primeros 100 días posteriores al trasplante. En el momento de la admisión para el alo-TPH se solicitó el consentimiento informado. Durante el seguimiento se recolectaron muestras de sangre en tubos de EDTA para cuantificar la carga viral de HAdV semanalmente desde el día -7 al día +50 y cada dos semanas desde ese momento hasta el día +100 después del trasplante (un total de 13 muestras). Además, se recolectaron tres muestras de sangre en tubos de heparina, en los días +21, +56 y +100 post-trasplante, para evaluar el desarrollo de la respuesta inmune de células T específicas para HAdV.

6. Recogida de datos clínicos

Durante el seguimiento de los pacientes incluidos se procedió a recoger de forma ordenada en el cuaderno de recogida de datos los datos demográficos, de enfermedades crónicas subyacentes, la enfermedad hematológica para la que se indicó el alo-TPH, el acondicionamiento previo al mismo, el tratamiento inmunosupresor, y los datos clínicos

evolutivos, incluyendo la mortalidad, la presencia de infección y/o enfermedad por HAdV, otras infecciones, y la mortalidad.

Las variables incluidas en el cuaderno de recogida de datos se pormenorizan en el Anexo I.

7. Determinación de la carga viral de HAdV

La carga viral de HAdV se determinó en plasma utilizando el kit ADENOVIRUS R-GENE® (bioMérieux, Madrid, España), con un límite de detección de 10 copias de ADN de HAdV por reacción de PCR. Las muestras de plasma se procesaron para la extracción del genoma viral utilizando el kit MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation (Roche, Madrid, España). El ADN extraído se usó como molde para la PCR cuantitativa en tiempo real, y se usó un control negativo sin ADN como control para la contaminación. La viremia por HAdV se analizó a cualquier nivel de DNAemia por HAdV en sangre periférica y, además, en el subgrupo de pacientes con DNAemia por HAdV superior o igual a 5×10^2 copias de ADN/mL [159]. Los episodios de viremia se clasificaron como transitorios (blips), cuando se detectó HAdV en una muestra aislada, o persistente cuando se detectó HAdV en al menos dos muestras consecutivas.

8. Clasificación por secuenciación de las muestras positivas para HAdV

Las muestras positivas para HAdV por el kit ADENOVIRUS R-GENE® (bioMérieux) se amplificaron y secuenciaron siguiendo los cebadores y el protocolo previamente publicados por Okada M. *et al.* [160]. Para la determinación del tipo específico de HAdV, las secuencias de nucleótidos obtenidas de los productos de la PCR se compararon con las secuencias reportadas utilizando la herramienta para búsquedas de alineación (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

9. Determinación de la inmunidad celular específica frente a HAdV

La respuesta inmune de células T específicas de HAdV se determinó mediante la tinción intracelular de citoquinas y la citometría de flujo, siguiendo un protocolo previamente reportado con algunas modificaciones [161]. De manera resumida, se estimularon 500 μl de sangre total con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína del hexón PepMix HAd-3 y 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína pentona PepMix HAdV-5 (JPT Peptides Technologies GmbH, Berlín, Alemania). Las muestras no estimuladas se utilizaron como control negativo y como control positivo se estimularon muestras de sangre total con 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de *Streptomyces globatus*, ionomicina, sal de calcio y 25 ng/ml de 4-alfa-forbol-12-miristato-13-acetato (Sigma Aldrich, Madrid, España). Todas las muestras se co-estimularon con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de CD28/CD49d (Beckton Dickinson, Madrid, España) y se trataron con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de brefeldina A (Beckton Dickinson) para prevenir la secreción de citoquinas. Después de incubar las muestras durante 4 horas a 37°C con 5% de CO₂, se agregaron 5 ml de tampón FACS Lysis (Beckton Dickinson) y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se centrifugaron a 500 $\times g$ durante 5 minutos a 4°C y se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Para la tinción, las células se incubaron en la oscuridad durante 20 minutos a temperatura ambiente con 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de PEanti-humano CD69, 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de PerCP/Cy5.5 anti-humano CD4, 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de PE/Cy7 anti-humano CD8 y 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de BV510 anti-humano CD3 (Biolegend, San Diego, EE. UU.). Las células se fijaron agregando 50 μL de reactivo IntraPrep 1 (BeckmanCoulter, Madrid, España) e incubando durante 15 minutos. Después de lavar una vez con PBS, las células se permeabilizaron agregando 50 μl de reactivo IntraPrep 2 y se incubaron durante 15 minutos con los siguientes anticuerpos monoclonales: 0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de APC anti-humana IL-2, 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de FITC anti- humano IFN- γ y 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de BV421 anti-humano TNF- α . Posteriormente, las células se lavaron una vez con PBS y se resuspendieron en 300 μl de PBS. Las muestras se analizaron en un citómetro LSR Fortessa (BD Biosciences, Madrid, España) cuantificando 40.000 eventos de células CD3+ de la población total de linfocitos. Los porcentajes de células activadas CD4+ y CD8+ que expresan IFN- γ , TNF- α e IL-2 se normalizaron para el control negativo. El desarrollo de una respuesta inmune de células T específica de HAdV se definió como la expresión de cualquiera de las citoquinas evaluadas (IFN- γ , TNF- α e IL-2) por células CD4+ o CD8+ activadas.

10. Células y virus

Las líneas celulares de células epiteliales alveolares de adenocarcinoma (A549) y fibroblastos de pulmón fetal humano (MRC-5) fueron obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA). Estas líneas celulares se propagaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Life Technologies/Thermo Fisher) suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS) (Omega Scientific, Tarzana, CA), HEPES 10 mM, L-glutamina 4 mM, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 0.1 mM de aminoácidos no esenciales. HAdV5 y HCMV AD169 se obtuvieron de la ATCC.

11. Ensayo de citotoxicidad

La citotoxicidad de los fármacos se evaluó utilizando el ensayo de viabilidad celular Alamar Blue (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se cultivaron células A549 a una densidad de 5×10^3 células/pocillo en placas de 96 pocillos. El día siguiente, después de la perfecta adhesión de las células a la placa de cultivo, se añadieron concentraciones decrecientes de cada uno de los compuestos (200 µM, 150 µM, 100 µM, 80 µM, 60 µM, 40 µM, 30 µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM, 2,5 µM, 0 µM), diluidos en 100 µl de medio DMEM, a fin de obtener una curva de crecimiento. Las células fueron incubadas entonces a 37°C durante 48 horas. Finalmente, el día de la lectura de la fluorescencia, se añadió a cada pocillo una mezcla consistente en 100 µl de DMEM más 10 µl de reactivo AlamarBlue. La concentración citotóxica del 50% (CC₅₀) de las moléculas se calculó de acuerdo con Cheng *et al.*[162]. El índice de selectividad (IS) se evaluó como la relación de CC₅₀ a IC₅₀, donde la IC₅₀ se define como la concentración de compuesto que inhibe la infección por HAdV en un 50%.

12. Cuantificación del ADN de HAdV y HCMV *in vitro* mediante qPCR

Para la cuantificación de ADN de HAdV y HCMV, los protocolos de infección y los cebadores de la PCR a tiempo real cuantitativa (qPCR), las mezclas y las condiciones fueron las mismas que se han reportado previamente [163].

Para HAdV, se cultivaron las células A549 (1×10^5 células/pocillo en una placa de 6 pocillos) se infectaron con HCMV a un MOI de 0.05 pv/célula y se incubaron en DMEM completo. Después de 24 h de incubación a 37°C, el ADN se purificó del lisado celular con el QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la PCRq se diseñaron cebadores TaqMan y sondas para una región del hexón de HAdV5wt con el GenScript Real-time PCR (TaqMan) PrimerDesign software (GenScript). Las secuencias de los oligonucleótidos fueron AQ1: 5'-GCC ACG GTG GGG TTT CTA AAC TT -3'; AQ2: 5'-GCC CCA GTG GTC TTACAT GCA CAT -3'; y sonda AP: 6-FAM-5'-TGC ACC AGA CCC GGG CTC AGG TACTCC GA-3'-TAMRA. La mezcla de reactivos para PCR a tiempo real cuantitativa consistía en 2 µl del ADN purificado, los cebadores AQ1 y AQ2 a una concentración de 200 nM cada uno, y la sonda AP a una concentración de 50 nM en un volumen total de 12,5 µl más 12,5 µl de KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix (KAPA Biosystems, MA). El protocolo para esta PCR fue de 95°C durante 3 min seguido de 40 ciclos a 95°C durante 10 s y 60°C durante 30 segundos.

Para probar la sensibilidad del HCMV a ambos fármacos, las células MRC-5 (1.75×10^5 células/pocillo en una placa de 6 pocillos) se infectaron con HCMV a una MOI de 0.05 pv/célula y se incubaron en DMEM completo. Después de 72 h de incubación a 37°C, el ADN se purificó del lisado celular con el QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el protocolo de PCRq se diseñaron cebadores y sondas TaqMan para una región del gen US28 con el GenScript Real-time PCR (TaqMan) Primer Design software (GenScript). Las secuencias de oligonucleótidos fueron CMV-F: 5'-TCT ACG TGG CTA TGT TTG CC-3'; CMV-R: 5'-GCC GAT ATC TCA TGT AAA CAA-3'; y sonda CMV: 5'-CAC GGA GAT TGC ACT CGA TCG C-3'. Las mezclas de PCR en tiempo real consistieron en 10 µl de ADN purificado, CMV-F a una concentración de 100 nM, CMV-R a una concentración de 300 nM y sonda CMV a una concentración de 50 nM en un volumen total de 12.5 µL y mezclado con 12.5 µL de KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix (KAPABiosystems, MA). El protocolo de ciclo de PCR fue de 95°C durante 10 minutos seguido de 40 ciclos de 95°C durante 30 segundos y 58°C durante 60 segundos.

Se utilizaron CDV (Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y GCV (Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) a concentraciones entre 80 y 2.5 µg/ml para infecciones por HAdV, y entre 10 y 0.6 µg/ml para HCMV. Como control interno, se utilizó el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa humana (GAPDH) [127].

13. Ensayos de susceptibilidad en co-infección por qPCR

Para el ensayo de co-infección, las células MRC-5 (150.000 células/pocillo en una placa de 24 pocillos) se co-infectaron con HAdV a una MOI de 100 y HCMV a una MOI de 0.05. Las mismas MOI de HAdV y HCMV se utilizaron para infectar células MRC-5 por separado como controles. Las concentraciones utilizadas para CDV y GCV fueron 7 µg/ml y 30 µg/ml, respectivamente, en base a nuestros resultados previos de sensibilidad de ambos fármacos en monoinfección. Después de 72 h de incubación a 37°C y 5% de CO₂, se purificó el ADN de HAdV y HCMV del lisado celular con el kit QIAamp DNA Mini (Qiagen, Valencia, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cebadores, reactivos y el protocolo de PCR en tiempo real fueron los mismos que los utilizados en el apartado anterior [127].

14. Ensayo de reducción de la progenie vírica en co-infección

Se evaluó el efecto de CDV y GCV en la producción de virus. Para ello, las células MRC-5 se infectaron con HAdV5 y HCMV (MOI 100 y 0.05, respectivamente) en presencia o ausencia de los fármacos. Después de 72 h, las células se recogieron y se sometieron a tres rondas de congelación/descongelación para liberar las partículas víricas contenidas en su interior. Las diluciones en serie de los lisados se titularon en células MRC-5 y los valores de TCID₅₀ se calcularon utilizando un método de dilución de punto final [164].

15. Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de las características clínicas de los pacientes y de los episodios de infección por HAdV. Las variables categóricas se expresaron como

porcentajes. Las variables continuas se expresaron como mediana y rango intercuartílico (IQR) o media y desviación estándar (SD). Las variables categóricas se compararon mediante el test de Chi-cuadrado o el test exacto de Fisher y las variables continuas mediante el test de la t de Student o el test U de Mann-Whitney. En el análisis de los resultados de la actividad *in vitro* cidofovir y ganciclovir, los análisis estadísticos se realizaron usando un análisis de varianza bidireccional (ANOVA).

Para el análisis de los factores de riesgo relacionados con las variables dependientes: infección y/o enfermedad por HAdV, y mortalidad, las variables independientes fueron sexo, edad, tipo de acondicionamiento, uso de ATG, hemopatía, tipo de alo-TPH, EICH y profilaxis utilizada.

Aquellos pacientes con un donante alternativo (sangre del cordón umbilical o haploidéntico) y/o aquellos que desarrollaron EICH grado III-IV se consideraron pacientes de alto riesgo para la infección por HAdV.

Los análisis estadísticos se realizaron con el software SPSS versión 15.0 (SPSS, Chicago, IL, EE. UU.). Los gráficos se obtuvieron con GraphPad Prism 6 (GraphPad, La Jolla, CA, EE. UU.). Las diferencias se consideraron significativas para los valores de $p < 0.05$.

16. Consideraciones éticas

Antes de su comienzo, el estudio fue aprobado por el Comité de Ética para la Investigación Clínica del Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, España (C.I. 1058-N-15). Los pacientes fueron incluidos en el estudio tras prestar consentimiento informado por escrito (Anexo II).

V. RESULTADOS

1. Población de estudio

Ciento diecisiete pacientes recibieron un alo-TPH desde febrero de 2016 hasta mayo de 2018. Noventa y cinco de ellos cumplieron con los requisitos del estudio y fueron incluidos después de firmar el consentimiento informado, mientras que no se incluyeron un total de veintidós pacientes que se trasplantaron en el periodo de estudio, por las siguientes causas: nueve pacientes no aceptaron firmar el consentimiento informado, cuatro pacientes participaban en otros estudios o en ensayos clínicos y los otros nueve fueron excluidos por motivos diversos (Figura 7).

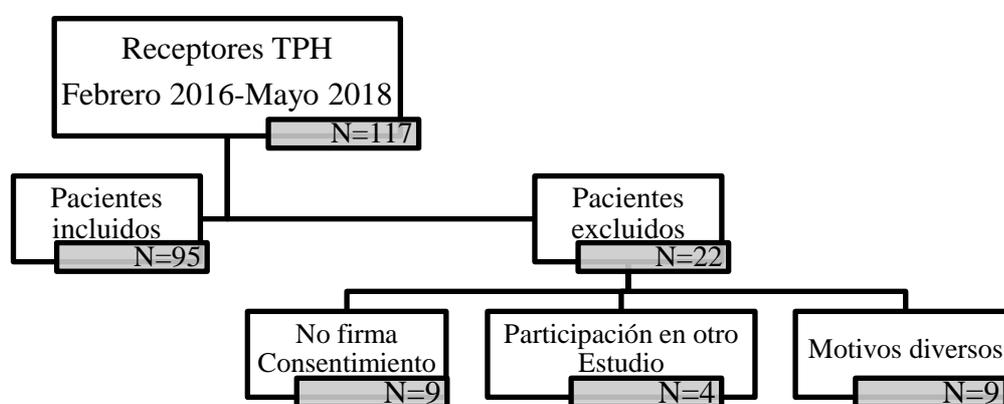


Figura 7. Diagrama de la inclusión/exclusión de los pacientes receptores de alo-TPH.

De los 95 pacientes incluidos, el 41,1% son mujeres, y presentan una edad media de 47,8 años. La enfermedad hematológica más frecuente fue la leucemia mieloide aguda (n = 28, 29,5%), seguida del síndrome mielodisplásico (n = 20, 21,1%). Cuarenta y nueve (51,6%) pacientes recibieron TPH de donantes no emparentados. Setenta y dos pacientes (75,8%) recibieron un acondicionamiento de intensidad reducida. El tratamiento profiláctico para la EICH más utilizado fue la combinación de tacrólimus y sirolimus. Treinta de los 95 pacientes se consideraron de alto riesgo de enfermedad diseminada por HAdV: 22 desarrollaron EICH grado III-IV y 8 tuvieron donantes haploideénticos. Además, 29 (30,5%) presentaron infección por HCMV de los

cuales 4 (13,7%) desarrollaron enfermedad. Las características demográficas y clínicas de los pacientes se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Características clínicas y demográficas de los 95 pacientes receptores de TPH.

Variable	N (%)
Mujer	39 (41,1)
Edad, media años (SD)	47,8 (13,4)
Enfermedad hematológica	
– Leucemia mieloide aguda	28 (29,5)
– Síndrome mielodisplásico	20 (21,1)
– Linfoma no-Hodgkin	12 (12,6)
– Linfoma de Hodgkin	10 (10,5)
– Leucemia linfoblástica aguda	11 (11,6)
– Otras	14 (14,7)
Donante	
– Donante no emparentado	49 (51,6)
– Hermano HLA-idéntico	38 (40,0)
– Donante haploidentico	8 (8,4)
Acondicionamiento	
– Intensidad reducida	72 (75,8)
– Mieloablativo	23 (24,2)
ATG* administrada	10 (10,5)
CD34+ (x10⁶/kg), media (SD)	5,9 (1,6)
Serología positiva de citomegalovirus	
– Donante / Receptor	54 (56,8) / 81 (85,3)
Donante mujer a receptor hombre	17 (17,9)

Profilaxis EICH[†]		
–	Tacrolimus + sirolimus	57 (60,0)
–	Tacrolimus + metotrexate	26 (27,4)
–	Otros [§]	12 (12,6)
Neutropenia febril		52 (54,7)
EICH aguda		43 (45,3)
–	EICH III-IV	23 (24,2)
–	Corticosteroides sistémicos	25 (54,7)
Infección por citomegalovirus		29 (30,5)
–	Enfermedad por citomegalovirus	4 (13,7)
Mortalidad		10 (9,5)

*ATG: globulina antitímocítica; [†]EICH, enfermedad injerto contra huesped; [§]Ciclosporina (CsA), metotrexato, ciclofosfamida más CsA y mofetil micofenolato (MMF), o tacrolimus más globulina antitímocítica (ATG) y metotrexate.

2. Infección por HAdV

Cincuenta y ocho (61,1%) pacientes presentaron episodios de viremia por HAdV, todos los cuales pertenecían a la especie C de HAdV. La mayoría de los episodios fueron blips (59 de 80, 73,8%), con una mediana de un episodio por paciente. La viremia por HAdV se identificó en la mayoría de los casos de forma temprana en relación con el trasplante (semanas -1 a +7) y los blips ocurrieron antes que los episodios persistentes (mediana 3 [1-5] vs. 7 [0-10] semanas, respectivamente). Las cargas virales mostraron una gran variabilidad, con niveles más bajos en los blips que en los episodios persistentes ($1,5 \times 10^2$ [$8,1 \times 10^1$ - $5,4 \times 10^2$] en comparación con $9,8 \times 10^2$ [$2,1 \times 10^2$ - $8,3 \times 10^4$] copias/ml], y una mediana de duración de 14 días en los episodios persistentes (Tabla 4).

Tabla 4. Características de los episodios de viremia por HAdV.

	N (%)
Pacientes	58 (61,1)
Episodios por paciente (mediana, IQR)	1 (1-2)
Episodios Blips	59 (73,8)
- - Semana de seguimiento (mediana, IQR)	3 (1-5)
- - Carga viral máxima (copias/ml; mediana, IQR)	1,5x10 ² (8,1x10 ¹ -5,4x10 ²)
Episodios Persistentes	21 (26,3)
- - Semana de seguimiento (median, IQR)	7 (0-10)
- - Duración de la viremia (días; mediana, IQR)	14 (7-14)
- - Carga viral máxima (copias/ml; mediana, IQR)	9,8x10 ² (2,1x10 ² -8,3x10 ⁴)

IQR: rango intercuartílico.

Treinta y seis (37,9%) pacientes presentaron viremia por HAdV inferior a 5x10² copias/ml y 22 (23,2%) igual o superior a 5x10² copias de DNA/ml. Las diferencias de los episodios de viremia entre ambos grupos se detallan en la Tabla 5. Seis (27.3%) de los 22 pacientes con viremia igual o superior a 5x10² copias/ml presentaron blips previamente.

Tabla 5. Características de los episodios de viremia por HAdV según el nivel de DNAemia.

	Baja DNAemia *	Alta DNAemia **
	N (%)	N (%)
Pacientes	36 (37,9)	22 (23,2)
Episodios por paciente (mediana, IQR)	1 (1-2)	1 (1-1)
Episodios Blips	59 (73,8)	18 (75,0)
- Semana de seguimiento (mediana, IQR)	3 (1-5)	5 (2-8)
- Carga viral máxima (copias/ml; mediana, IQR)	1,3x10 ² (7,9x10 ¹ -2,1x10 ²)	3,2x10 ³ (1,1x10 ³ -2,1x10 ⁴)
Episodios Persistentes	15 (26,8)	6 (25,0)
- Semana de seguimiento (median, IQR)	6 (-1-11)	7 (1-8)
- Duración de la viremia (días; mediana, IQR)	14 (7-14)	14 (14-14)
- Carga viral máxima (copias/ml; mediana, IQR)	1,9x10 ² (8,1x10 ¹ -2,6x10 ²)	2,0x10 ⁴ (1,8x10 ³ -7,3x10 ⁵)

*DNAemia < 5x10² copias/ml; ** DNAemia ≥ 5x10² copias/ml;IQR: rango intercuartílico.

3. Factores de riesgo asociados a la infección por HAdV y resultados clínicos

No encontramos asociación entre el desarrollo de la viremia por HAdV y el género, el régimen de acondicionamiento, el uso de globulina anti-timocítica (ATG) o las características del donante. La presencia de EICH aguda de grado III-IV o EICH refractaria a los esteroides no se relacionó con el desarrollo de ningún nivel de viremia por HAdV. Además, no hubo una mayor frecuencia de la viremia por HAdV en pacientes considerados con alto riesgo de infección por HAdV (Tabla 6).

En este estudio, ningún paciente desarrolló enfermedad sintomática o diseminada por HAdV, ni recibió tratamiento antiviral específico para el HAdV durante el seguimiento. Además, no hubo una asociación cronológica entre la detección de viremia por HAdV y la presencia de otros episodios de infección bacteriana, fúngica, viral o de infección de etiología desconocida. Respecto a la mortalidad, diez pacientes fallecieron durante el seguimiento por diferentes causas: i) causas directamente relacionadas con el trasplante (n = 5; dos EICH, dos microangiopatía trombótica y una enfermedad veno-oclusiva), ii) otras infecciones (n = 3, dos pacientes con shock séptico por neumonía e infección por *Clostridioides difficile* y un paciente con neumonía invasiva por *Aspergillus fumigatus*), iii) un paciente por recaída de la enfermedad hematológica y, iv) otro por fibrosis pulmonar multifactorial. Por último, no hubo diferencia en la mortalidad entre los pacientes con (n = 5, 8.6%) o sin (n = 5, 13.5%) viremia por HAdV (Tabla 6).

Tabla 6. Características clínicas, del trasplante y datos demográficos de pacientes con y sin viremia post-trasplante.

Variable	Pacientes con viremia, N = 58	Pacientes sin viremia, N = 37	p
Mujer	24 (41,4%)	15 (40,5%)	0,94
Acondicionamiento (intensidad reducida)	41 (70,7%)	30 (81,1%)	0,15
Globulina antitimocítica	5 (8,6%)	5 (13,5%)	0,44
Donante mujer / Receptor hombre	10 (17,2%)	8 (21,6%)	0,59
Donante no emparentado	28 (48,3%)	21 (56,8%)	0,42
Alto riesgo de TPH (Haploidéntico & EICH[†] III-IV)	21 (36,2%)	9 (24,3%)	0,22
EICH	29 (50,0%)	13 (35,1%)	0,16
EICH (III-IV)	16 (27,6%)	6 (16,2%)	0,20
Profilaxis EICH (Tacrolimus y Sirolimus)	33 (56,9%)	24 (64,9%)	0,44
Infección por Citomegalovirus	17 (31,5%)	12 (32%)	0,46
Mortalidad	5 (8,6%)	5 (13,5%)	0,45

Con respecto al nivel de viremia por HAdV, superior o inferior a 5×10^2 copias/ml, no hubo tampoco asociación con ninguno de los datos demográficos, las características del trasplante o las características clínicas anteriores (Tabla 7).

Tabla 7. Características clínicas, del trasplante y datos demográficos de pacientes con viremia $\geq 5 \times 10^2$ y sin viremia post-trasplante.

Variable	Pacientes con viremia $\geq 5 \times 10^2$, N=22	Pacientes sin viremia, N=37	<i>p</i>
Mujer	9 (40,9%)	15 (41,7%)	0.95
Acondicionamiento (intensidad reducida)	17 (81,0%)	23 (63,9%)	0.15
Globulina antitimocítica	3 (13,6%)	2 (5,6%)	0.29
Donante mujer / Receptor hombre	4 (18,2%)	6 (16,7%)	0.88
Donante no emparentado	10 (45,5%)	18 (50,0%)	0.74
Alto riesgo de TPH (Haploidéntico & EICH III- IV)	9 (40,9%)	12 (33,3%)	0.56
EICH	12 (22,7%)	13 (35,1%)	0,61
EICH (III-IV)	7 (31,8%)	9 (15,0%)	0.57
Profilaxis EICH (Tacrolimus y Sirolimus)	14 (73,7%)	19 (52,8%)	0.51
Infección por Citomegalovirus	2 (9,1%)	0 (0,0%)	0.07
Mortalidad	3 (13,6%)	2 (9,6%)	0.29

4. Respuesta inmune de células T específicas de HAdV

La respuesta inmune de células T específicas de HAdV se evaluó en 90 de los 95 pacientes (en cinco pacientes hubo pérdida de seguimiento en puntos de tiempo específicos). A lo largo del trasplante, se observó un aumento en el porcentaje de pacientes que expresan las distintas citoquinas. En la Tabla 8 se muestra como este

aumento es mayor en aquellos pacientes con viremia que en aquellos que no presentaban viremia por HAdV, destacando el aumento de la expresión de las citoquinas IL-2 y TNF- α por los linfocitos T CD4+ así como el de la expresión de IFN- γ por los linfocitos T CD8+.

El número de pacientes con respuesta inmunitaria específica de células T específicas de HAdV aumentó durante el seguimiento: 30 (33,3%), 65 (72,2%) y 78 (86,7%) de los 90 pacientes en los días +21, +56 y +100 posteriores al trasplante, respectivamente, presentaron respuesta de células T específicas frente a HAdV. Doce (13,3%) de los 90 pacientes no desarrollaron una respuesta inmune de células T específicas de HAdV durante el seguimiento; tres (25,0%) de ellos tuvieron un episodio de viremia (blip) por HAdV. El número de pacientes con células T CD4+ que expresaron IL-2 en el día +56 ($p < 0,05$) y células T CD8+ que expresaron IL-2 ($p < 0,05$) y TNF α ($p < 0,05$) en el día +21, fue mayor en aquellos con viremia por HAdV (Tabla 8).

Tabla 8. Respuesta inmune de células T específicas para HAdV. Porcentajes de pacientes con/sin viremia por HAdV que expresan IL-2, TNF- α e IFN- γ en los días +21, +56 y +100 después del trasplante, en células T CD4+ y CD8+ específicas de HAdV (* $p < 0.05$).

	CD4+			CD8+		
	IL-2	TNF- α	INF- γ	IL-2	TNF- α	INF- γ
+21	5,3/6,0	23,6/12,1	12,7/6,0	12,7/0,0*	20,0/3,0*	12,7/6,0
+56	26,8/5,0*	58,5/45,0	36,6/35,0	21,6/20,0	31,7/35,0	34,1/20,0
+100	41,5/20,8	75,6/62,5	36,6/41,6	24,4/25,0	26,8/50,5	43,9/41,7

Si observamos el porcentaje de expresión de citoquinas en la cohorte completa, en el día +21 los porcentajes medios de células T CD4+ y CD8+ que expresaron IL-2 fueron 0,007% \pm 0,03 y 0,01% \pm 0,04, respectivamente. Para TNF- α estos porcentajes fueron 0,03% \pm 0,06 y 0,02% \pm 0,04, y para INF- γ 0,02% \pm 0,6 y 0,02% \pm 0,05, respectivamente. En el día +56, la media de células T CD4+ y células T CD8+ que

expresan IL-2 fue $0,02\% \pm 0,05$ y $0,03\% \pm 0,06$, respectivamente, y para TNF- α fue $0,07\% \pm 0,07$ y $0,05\% \pm 0,09$ así como $0,06\% \pm 0,09$ y $0,04\% \pm 0,06$ para INF- γ , respectivamente. Por último, al final del seguimiento (día +100) la media de las células T CD4 + y CD8 + que expresan IL-2 fue $0,05\% \pm 0,07$ y $0,03\% \pm 0,05$, respectivamente, para TNF- α fueron $0,13\% \pm 0,11$ y $0,05\% \pm 0,08$ y para INF- γ $0,05\% \pm 0,07$ y $0,06\% \pm 0,09$, respectivamente (Tabla 9).

El pico máximo medio de expresión de citoquinas fue del 0,13% registrado para las células T CD4+ que expresaron TNF- α en el día +100 (Tabla 8). Doce (11,1%) de los 90 pacientes evaluados no desarrollaron una respuesta inmune de células T específica para HAdV durante el seguimiento, 3 (25,0%) de los cuales presentaron al menos un episodio de viremia blip de HAdV.

Table 9. Porcentajes de células T CD4 + y CD8 + específicas para HAdV que producen IL-2, TNF- α e INF- γ en los días +21, +56 y +100 después del trasplante. Los resultados se muestran como media \pm SD.

	CD4+			CD8+		
	IL-2	TNF- α	INF- γ	IL-2	TNF- α	INF- γ
+21	$0,007 \pm 0,03$	$0,03 \pm 0,06$	$0,02 \pm 0,6$	$0,01 \pm 0,04$	$0,02 \pm 0,04$	$0,02 \pm 0,05$
+56	$0,02 \pm 0,05$	$0,07 \pm 0,07$	$0,06 \pm 0,09$	$0,03 \pm 0,06$	$0,05 \pm 0,09$	$0,04 \pm 0,06$
+100	$0,05 \pm 0,07$	$0,13 \pm 0,11$	$0,05 \pm 0,07$	$0,03 \pm 0,05$	$0,05 \pm 0,08$	$0,06 \pm 0,09$

Cuando evaluamos el porcentaje de linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y la relación de la linfocitos T CD4+/CD8+ para cada día en los que se cuantificó la respuesta inmune durante el trasplante en aquellos pacientes sin viremia, con viremia o con viremia por encima o por debajo de 5×10^2 copias/ml, podemos ver que no hubo diferencias significativas en cuanto a los porcentajes de células T CD4+ y CD8+ ni en cuanto a la relación de células T CD4+/CD8+ en pacientes con y sin viremia por HAdV o en aquellos con más o menos de 5×10^2 copias/ml de ADN (Figura 8).

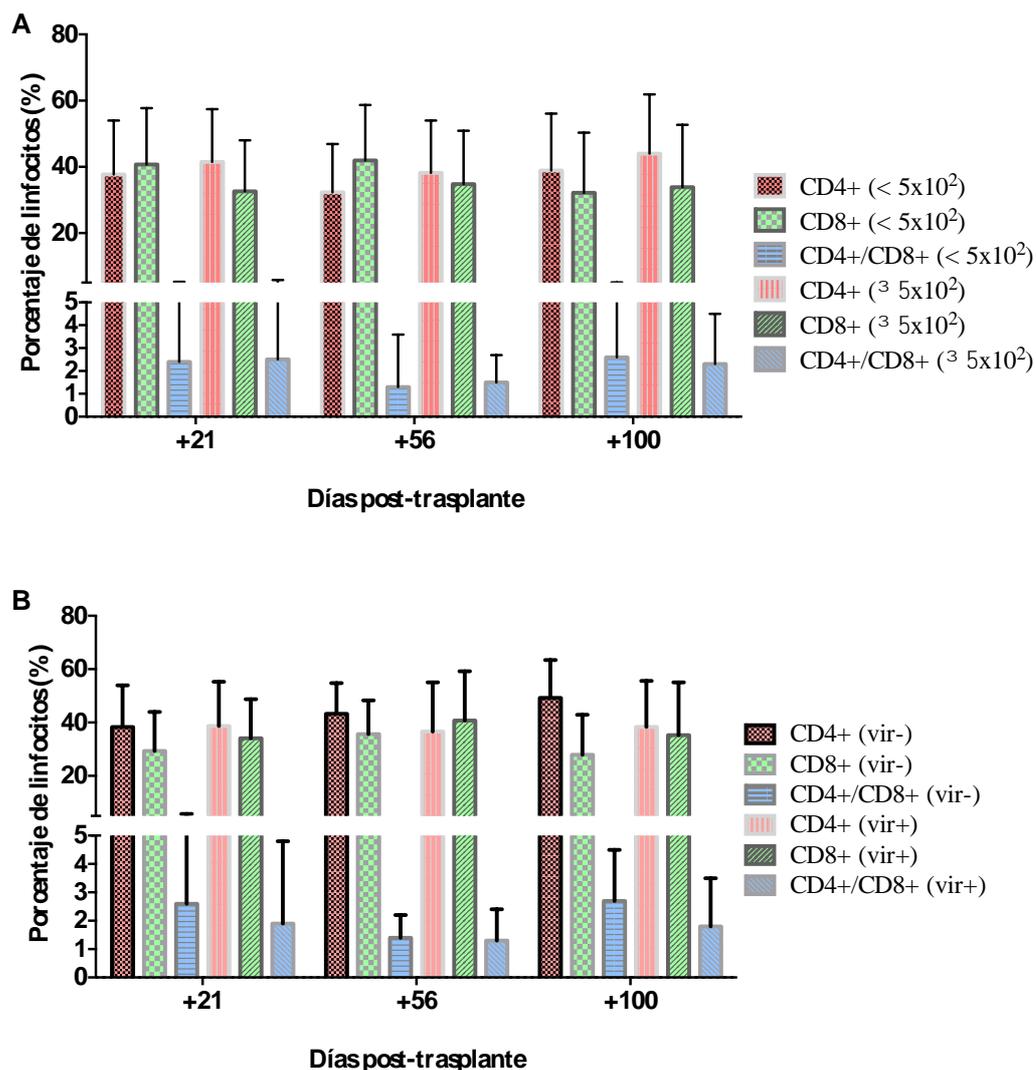
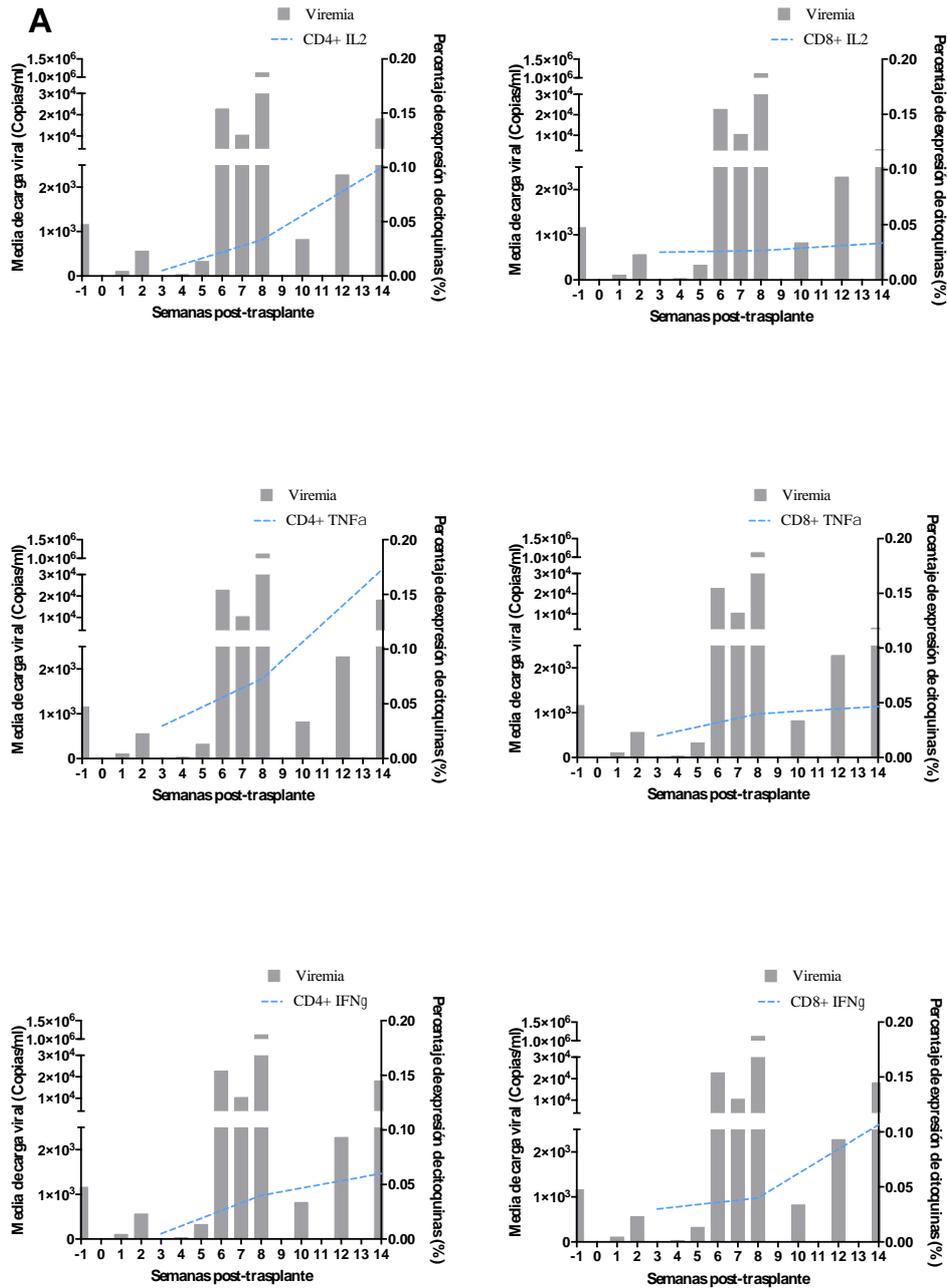


Figura 8. Linfocitos CD4+ y CD8+ (%) y CD4+/CD8+ en pacientes con viremia HAdV $< 5 \times 10^2$ y $\geq 5 \times 10^2$ copias/ml (A) y con (vir+) y sin (vir-) viremia HAdV (B).

A continuación, correlacionamos la incidencia de viremia por HAdV (≥ 500 copias/ml) con la respuesta inmune específica en cada punto de tiempo (+21, +56 y +100 días después del trasplante). En general, la expresión de las tres citoquinas evaluadas fue mayor para las células T CD4+ que para las células T CD8+ (Figura 9A). El porcentaje medio de células T CD4+ que expresan IL-2 creció a lo largo del seguimiento, variando de un 0% en el día +21 a un 0,1% en el día +100, mientras que en el caso de TNF- α alcanzó el 0,17%, coincidiendo con el final de los casos de alto nivel de viremia por HAdV. El porcentaje medio de células T CD4+ que expresaron INF- γ aumentó moderadamente hasta un valor máximo de 0,06%. A diferencia de las células T CD4+, el porcentaje medio de células T CD8+ que expresan IL-2 y TNF- α

fue mucho menor y no aumentó a lo largo del seguimiento, presentando valores máximos de 0,03% y 0,04%, respectivamente, desde el día +21 hasta día +100. En el caso de INF- γ y a diferencia de las células T CD4 +, el porcentaje medio de células T CD8 + que lo expresaron fue mayor en el día +100, alcanzando un valor máximo de 0,1% cuando menos casos de viremia por HAdV y menor carga de virus se registraron (Figura 9A).



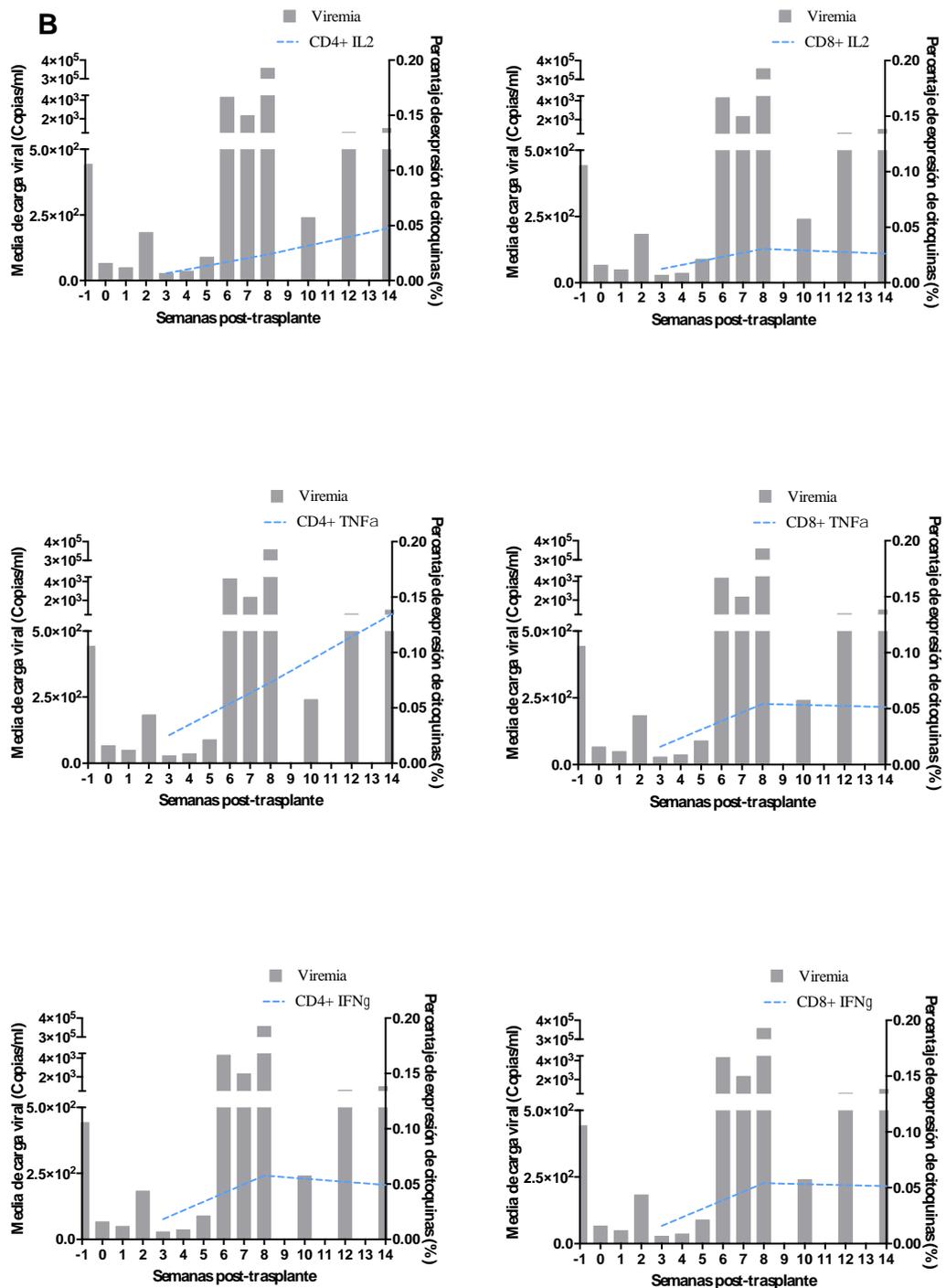


Figura 9. Relación entre la respuesta inmune específica de HAdV en aquellos pacientes que muestran HAdV DNAemia ≥ 500 copias/ml (A) y aquellos que muestran cualquier nivel de ADNemia de HAdV (B) durante el seguimiento.

Si comparamos la respuesta inmune específica de HAdV con la existencia de viremia de HAdV de cualquier nivel (incluida la ADNemia de HAdV $<5 \times 10^2$ copias/ml), el porcentaje medio de células T CD4+/CD8+ que expresan IL-2, TNF- α e

INF- γ fueron similares a los mostrados en comparación con los pacientes que presentaron HAdV DNAemia ≥ 500 copias/ml. Sólo en el caso de las células T CD8+ que expresan INF- γ se observó una disminución significativa (del 0,1% al 0,05%) (Figura 9B).

En un siguiente análisis comparamos el porcentaje de expresión de citoquinas por células T en pacientes que presentaron DNAemia de cualquier nivel antes del trasplante (en los días -7 o 0) *versus* aquellos que no lo hicieron. Los pacientes con replicación previa al trasplante mostraron un mayor porcentaje de expresión de IL-2, TNF- α e INF- γ por las células CD4+ en los tres puntos temporales estudiados. El porcentaje, en el caso de las células T CD8+ que expresan IL-2, TNF- α e INF- γ , también fue mayor en los días +21 y +56; sin embargo, para el día +100, la expresión siguió creciendo en aquellos pacientes sin viremia de HAdV previa al trasplante y disminuyó en aquellos que presentaron viremia de HAdV previa al trasplante (Figura 10).

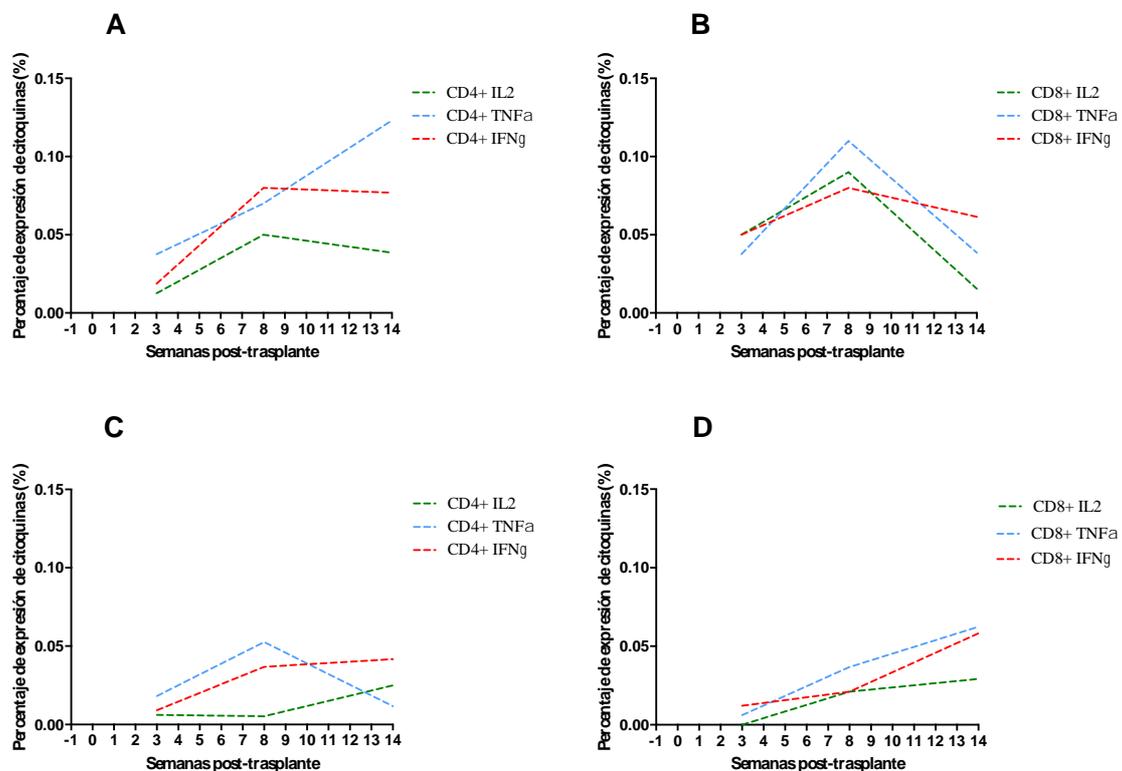
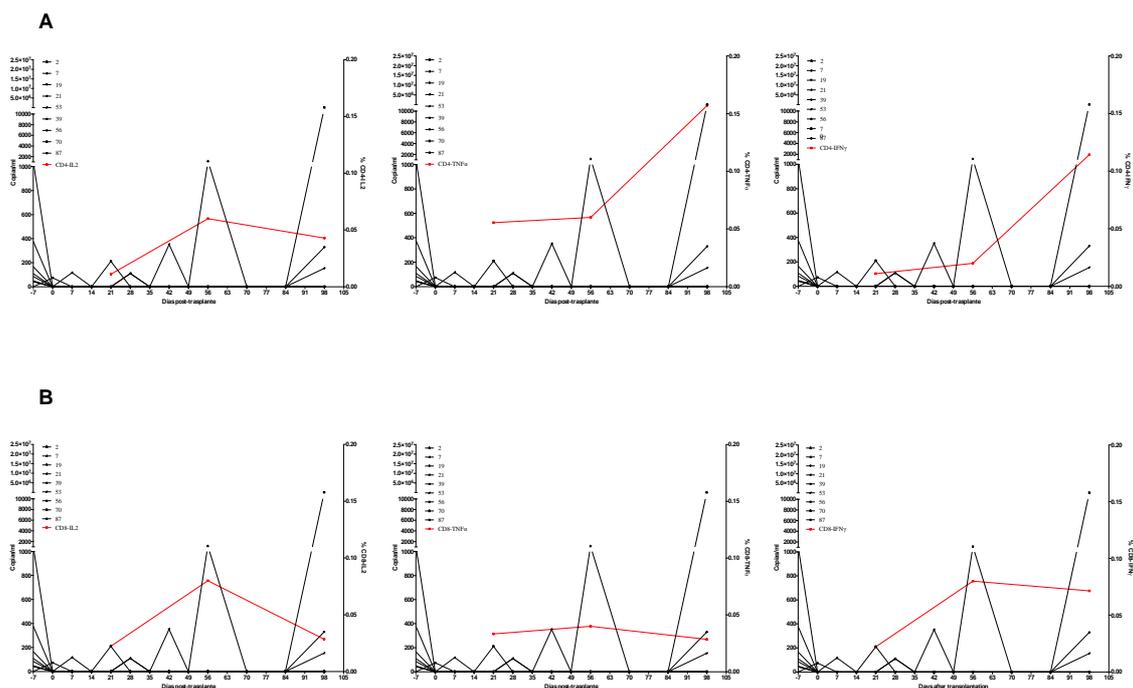


Figura 10. Respuesta de células T CD4+ (A) y células T CD8+ (B) durante el seguimiento para pacientes con viremia (>0 copias/ml) por HAdV previa al trasplante

(días -7 o 0). Respuesta de células T CD4+ (C) y células T CD8+ (D) durante el seguimiento para pacientes sin viremia por HAdV previa al trasplante.

Cuando analizamos los diferentes episodios de viremia por HAdV pre-trasplante, sin tener en cuenta el umbral de más de 500 copias/ml, y lo comparamos con la respuesta inmune específica de HAdV, observamos algunos patrones claros (Figura 11 y 12). Los pacientes que presentaron episodios de blips antes del trasplante en los días +7 o 0 mostraron una respuesta mínima específica de HAdV, tanto de células T CD4+ como de CD8+ (Figura 11). En estos pacientes, la expresión de CD4+ TNF- α e IFN- γ creció exponencialmente en el día +56 hasta el día +100 con valores superiores al 0,1%, mientras que la expresión de CD4+ IL-2 registró un bajo aumento de nivel hasta el día +56 y luego se mantuvo debajo de 0,05% hasta el final del seguimiento (Figura 11A y 11B). Cuando los episodios previos al trasplante fueron persistentes, la respuesta inmune fue claramente diferente, hubo una fuerte expresión de IL-2 e IFN- γ por las células CD8+ al día +21 (más de 0,1%) que disminuye gradualmente hasta el final del seguimiento, y la expresión de CD8+ TNF- α presentó un pico superior al 0,15% en el día +56. La expresión de IL-2 por las células CD4+ fue inferior al 0,05% durante todo el seguimiento, la de TNF- α por CD4+ aumentó del día +21 al día +56 a valores por debajo del 0,1% y la expresión de IFN- γ por las células CD4+ presentó un pico de expresión en el día +56 por encima de 0,1% (Figura 11C y 11D).



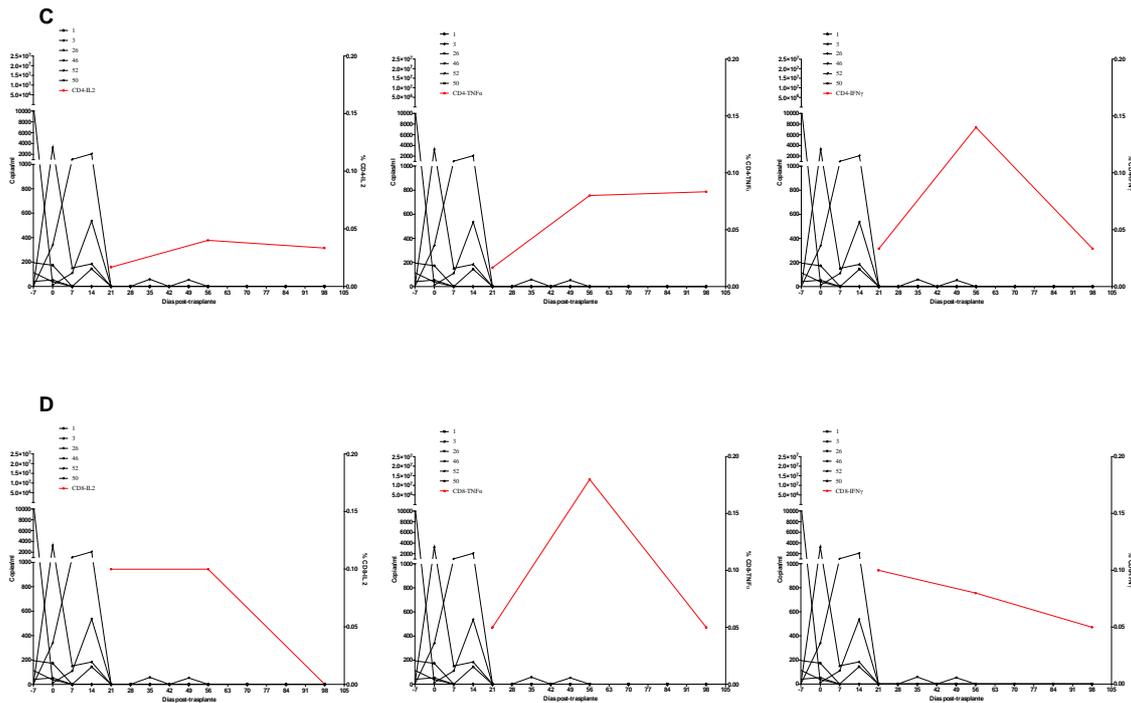


Figura 11. Respuesta de células T CD4+ (A) y células T CD8+ (B) durante el seguimiento para pacientes con episodios blips de viremia por HAdV previa al trasplante (días -7 o 0). Respuesta de células T CD4+ (C) y células T CD8+ (D) durante el seguimiento para pacientes con episodios de viremia persistente por HAdV previa al trasplante.

Aquellos pacientes que no presentaron ni blips ni episodios persistentes de viremia previa al trasplante mostraron un patrón similar de expresión de citoquinas IL-2 y TNF- α por las células CD4+ viéndose un incremento gradual desde el día +21 al +100 y de IFN- γ por las células CD4+ con un pico de expresión en el día +56 que se mantuvo estable hasta el día +100 (Figura 12). En pacientes con blips después del trasplante, la expresión de IL-2 y TNF- α por las células CD8+ fue menor al 0,05% durante todo el seguimiento, mientras que la expresión de IFN- γ creció gradualmente desde el día +21 hasta el día +100, con valores por debajo del 0,1% (Figura 12A y 12B). Para los pacientes con episodios persistentes, en el día +21, ninguno presentó respuesta inmune específica de HAdV ni para CD4+ ni CD8+ y pero presentaron un aumento gradual en la expresión de citoquinas hasta el final del seguimiento alcanzando valores por debajo del 0,1% para IL-2, IFN- γ en células CD4+ y para IL-2 y TNF- α en células CD8+, así como valores por encima del 0,1% para TNF- α por CD4+ y para IFN- γ por las células CD8+ (Figura 12C y 12D).

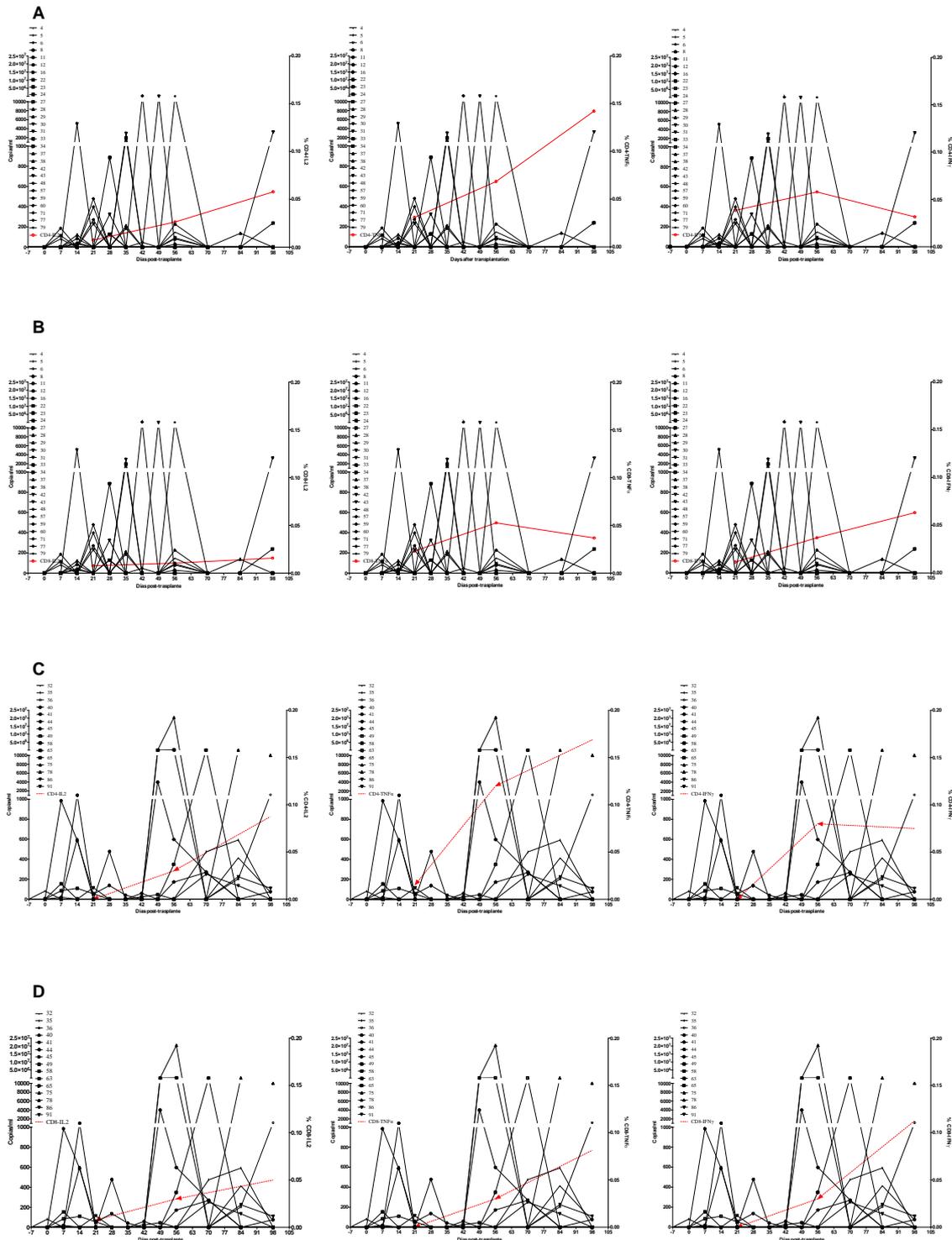


Figura 12. Respuesta de células T CD4+ (A) y células T CD8+ (B) durante el seguimiento para pacientes con episodios blips de viremia por HAdV posteriores al trasplante (de días +7 a +100). Respuesta de células T CD4+ (C) y células T CD8+ (D) durante el seguimiento para pacientes con episodios de viremia persistente por HAdV posteriores al trasplante.

En un siguiente paso comparamos la respuesta inmune de células T específicas de HAdV en pacientes con viremia superior o inferior a 5×10^2 copias/ml en sangre. Al igual que en el caso del porcentaje de pacientes, observamos que existe una tendencia donde el porcentaje de citoquinas que se expresan aumentan a lo largo del trasplante (Tabla 10).

Tabla 10. Respuesta inmunitaria de células T específica para HAdV en pacientes con viremia $\geq 5 \times 10^2$ copias/ml (A) o $< 5 \times 10^2$ copias/ml (B). Células T CD4+ y CD8+ específicas para HAdV que expresan (%) IL-2, TNF- α e IFN- γ en los días +21, +56 y +100 después del trasplante. Los resultados se muestran como media \pm SD (pacientes con viremia $\geq 5 \times 10^2$ copias/ml vs. $< 5 \times 10^2$ copias/ml, * $p < 0,05$).

A

	CD4+			CD8+		
	IL-2	TNF- α	INF- γ	IL-2	TNF- α	INF- γ
+21	0,005 \pm 0,02	0,03 \pm 0,05	0,005 \pm 0,02	0,02 \pm 0,07	0,02 \pm 0,04	0,03 \pm 0,07
+56	0,03 \pm 0,6	0,07 \pm 0,07	0,04 \pm 0,09	0,03 \pm 0,06	0,04 \pm 0,08	0,04 \pm 0,06
+100	0,1 \pm 0,09*	0,2 \pm 0,1*	0,06 \pm 0,08	0,03 \pm 0,05	0,05 \pm 0,09	0,1 \pm 0,1*

B

	CD4+			CD8+		
	IL-2	TNF- α	INF- γ	IL-2	TNF- α	INF- γ
+21	0,008 \pm 0,03	0,03 \pm 0,06	0,03 \pm 0,09	0,02 \pm 0,05	0,02 \pm 0,05	0,01 \pm 0,04
+56	0,03 \pm 0,06	0,09 \pm 0,08	0,08 \pm 0,1	0,04 \pm 0,08	0,08 \pm 0,1	0,05 \pm 0,07
+100	0,03 \pm 0,06*	0,13 \pm 0,1*	0,05 \pm 0,08	0,02 \pm 0,04	0,04 \pm 0,08	0,05 \pm 0,08*

Como se muestra en la Tabla 10 existe una mayor expresión de citoquinas en aquellos pacientes con una carga viral superior o igual a 5×10^2 copias/ml. La máxima expresión de citoquinas se vio en las células T CD4+ que expresan TNF- α en el día +100 (0,2% vs 0,13%, $p < 0,05$). Además, las expresiones más altas de IL-2 por las células T CD4+ (0,1% vs 0,03%, $p < 0,05$) e INF- γ por las células T CD8+ (0,1% vs 0,05%, $p < 0,05$) fueron observadas en el día +100 posterior al trasplante, en los pacientes con viremia por HAdV superior o igual a 5×10^2 copias de ADN/ml (Tabla 10 y Figura 13). En cuanto a los pacientes con una viremia inferior a 500 copias/ml, la mayor expresión se vio en las células T CD4+ que expresaron TNF- α , mientras que la expresión de IL-2 por las células T CD4+ y la de INF- γ por las células T CD8+ se mantuvieron estables y con valores bajos, cercanos al 0.05% (Tabla 10 y Figura 13).

Finalmente, comparamos la respuesta inmune de células T específicas de HAdV en pacientes con viremia persistente de HAdV pre-trasplante (días -7 y 0) ($n=4$) frente a aquellos con blips ($n=12$) antes del trasplante (Figura 14). Observamos un aumento más temprano de la expresión de citoquinas en los pacientes con episodios persistentes en comparación de aquellos que presentaron blips pre-trasplantes, además, este aumento y rapidez en la expresión de citoquinas pacientes con episodios persistentes pre-trasplantes coincidía con la disminución en el número de episodios de infección por HAdV durante el seguimiento de los mismos.

Estos pacientes con viremia persistente tenían expresión de CD4+ de INF- γ ($p=0,05$) y expresión de CD8+ de IL-2, TNF- α e INF- γ ($p < 0,05$) más alta y/o más temprana (a +21 y +56 días) en comparación con los que tienen señales intermitentes, y esta respuesta inmunitaria fue paralela a la desaparición casi completa de los episodios de viremia (Figura 14).

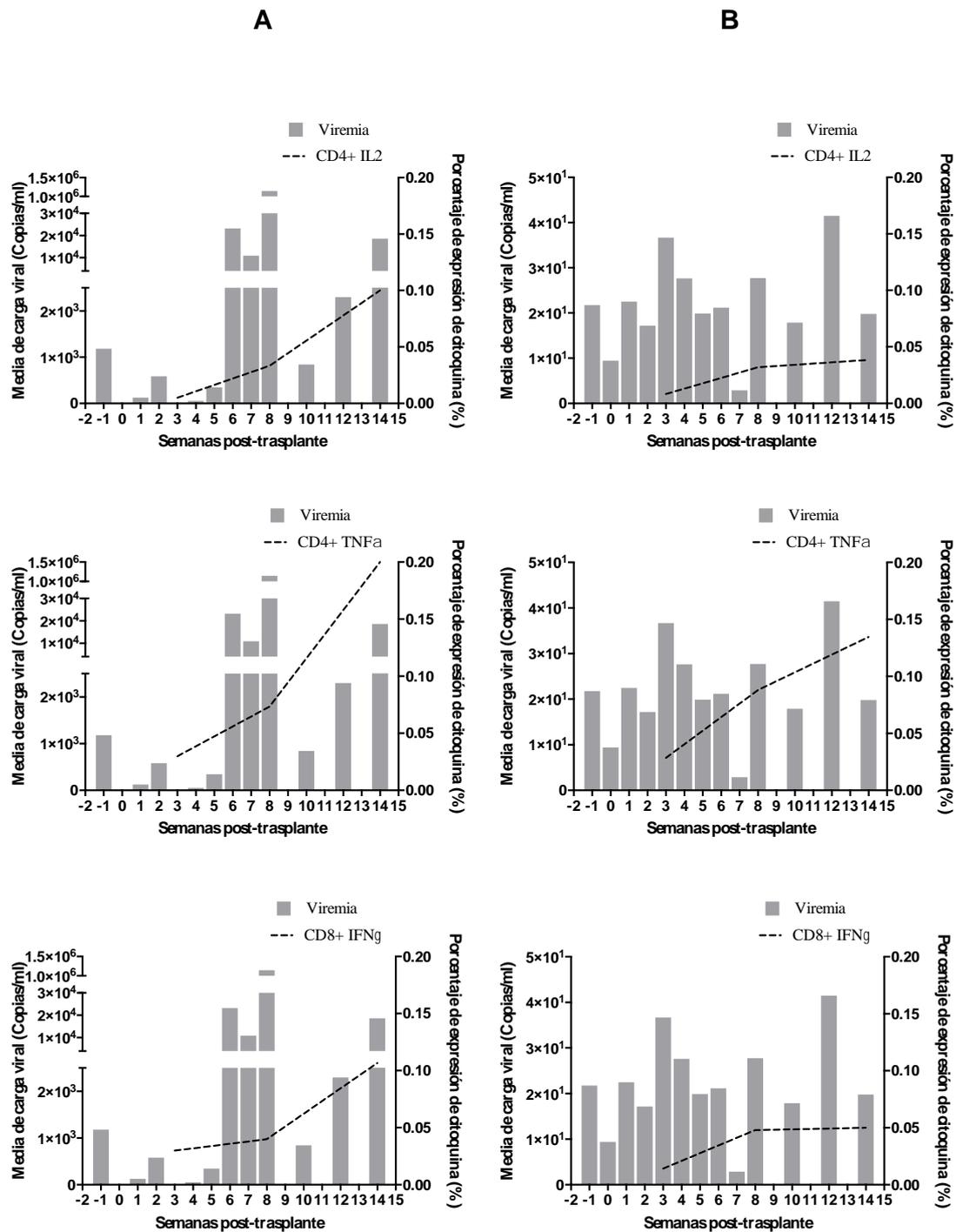


Figura 13. Respuesta inmunitaria de células T específicas para HAdV en pacientes con viremia $\geq 5 \times 10^2$ copias/ml (A) o $< 5 \times 10^2$ copias/ml (B). Células T CD4+ específicas para HAdV (%) que expresan IL-2 y TNF- α y células T CD8+ (%) que expresan IFN- γ , en los días +21, +56 y +100 después del trasplante.

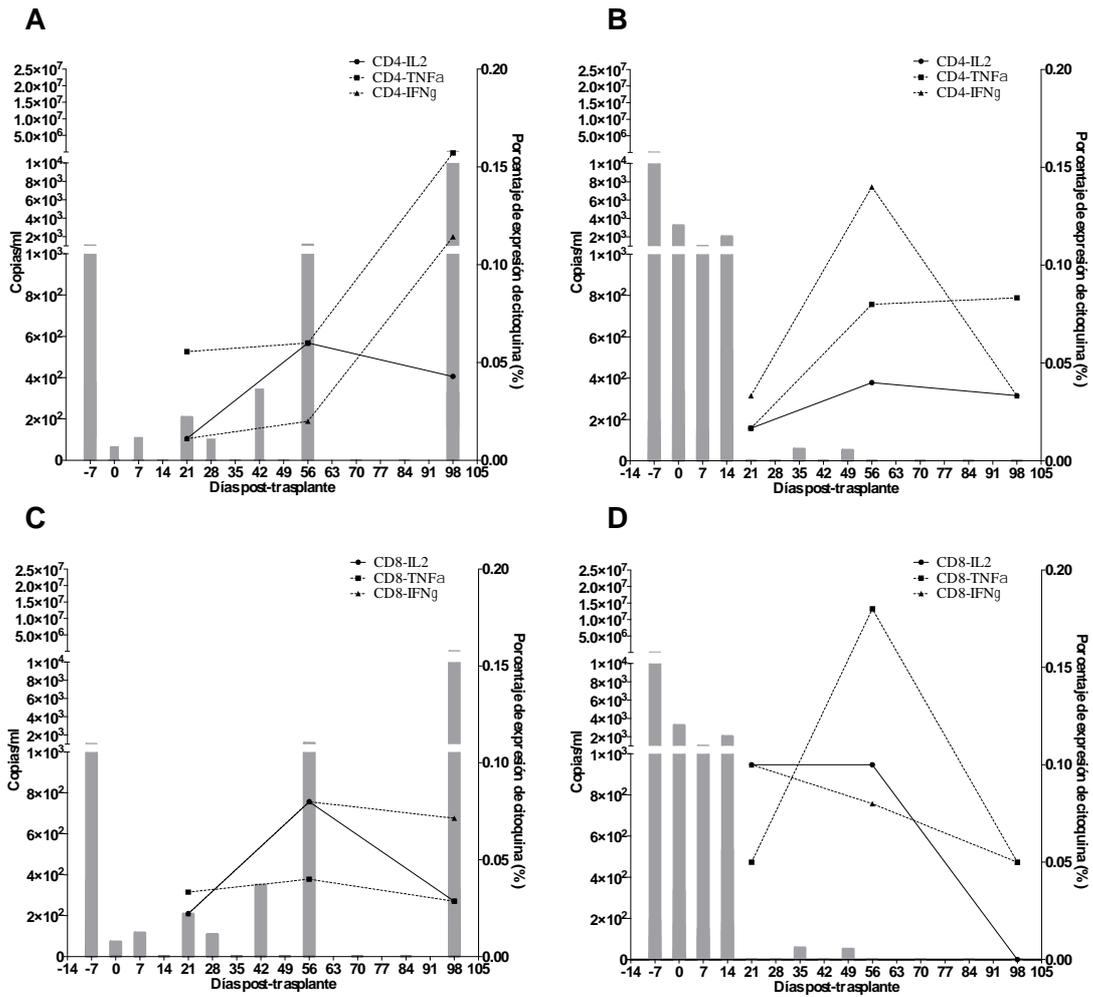


Figura 14. Respuesta inmunitaria de células T específicas de HAdV en pacientes con blips o viremia persistente en los días -7 y/o 0 antes del trasplante. Células T CD4+ específicas para HAdV que expresan (%) IL-2, TNF- α e IFN- γ , en los días +21, +56 y +100 después del trasplante en pacientes con blips (A) y viremia persistente (B). Células T CD8+ específicas para HAdV que expresan (%) IL-2, TNF- α e IFN- γ , en los días +21, +56 y +100 después del trasplante en pacientes con blips (C) y viremia persistente (D).

5. Actividad antiviral de GCV frente a HAdV en condiciones de co-infección con CMV

Nuestros resultados *in vitro* mostraron que, aunque CDV y GCV mostraron una actividad anti-HAdV dosis-dependiente utilizando qPCR, la actividad antiviral de GCV contra HAdV se observó en concentraciones mucho más altas (Tabla 11, Figura 15), como se reportó anteriormente por Ying *et al.* [165], mostrando una IC₅₀ para GCV de 25 µg/ml [165]. A diferencia de HAdV, y tal y como se esperaba, ambos fármacos mostraron actividad anti-HCMV dosis-dependiente a bajas concentraciones (Tabla 11 y Figura 15).

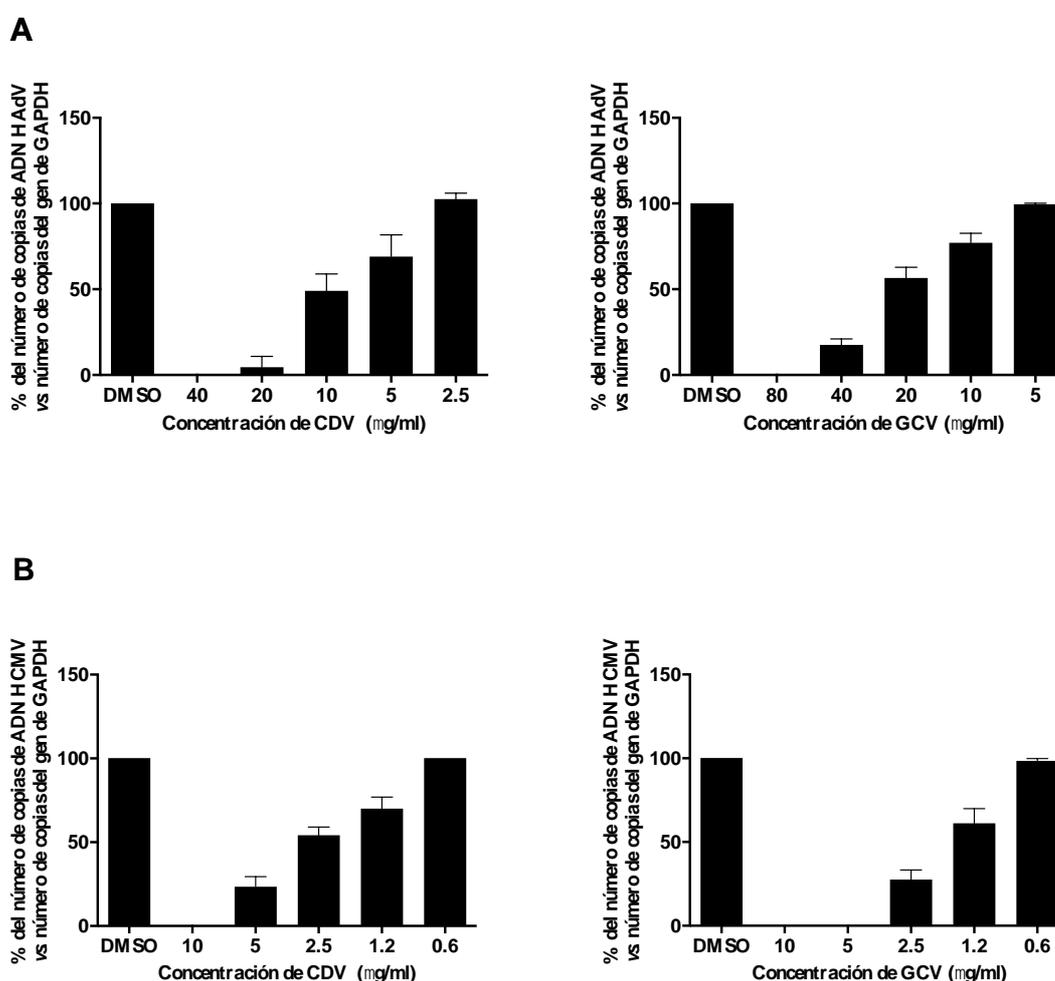


Figura 15. Actividad inhibitoria de CDV y GCV. Actividad dosis-dependiente contra HAdV (A) y HCMV (B) por qPCR. El control DMSO es un control positivo con células infectadas con la misma MOI pero en ausencia de fármacos. Los resultados muestran la media \pm SD de muestras por triplicado de tres experimentos independientes.

Mientras que CDV fue activo frente a ambos virus en concentraciones micromolares bajas (valores de IC₅₀ entre 3,7 y 8,8 µg/ml), GCV solo fue activo en concentraciones bajas contra HCMV (IC₅₀ frente HCMV de 2,1 µg/ml vs. 21,4 µg/ml frente a HAdV) (Tabla 11). La concentración citotóxica (CC₅₀) para GCV varió entre 100 y 175 µg/ml, mientras que para el CDV mostró valores que oscilaron entre 41,5 y 50,6 µg/ml, en el rango de los reportados previamente [124]. En todos los casos, los índices selectivos (SI) calculados fueron bajos (Tabla 11) teniendo en cuenta que, en general, sólo las moléculas que muestran un SI superior a 100 *in vitro* son consideradas para su análisis posterior *in vivo* en el área de desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos.

Tabla 11. Valores de IC₅₀, CC₅₀, e Índice Selectivo (IS) para CDV y GCV.

	HAdV			HCMV		
	IC ₅₀ µg/ml	CC ₅₀ µg/ml	SI	IC ₅₀ µg/ml	CC ₅₀ µg/ml	SI
CDV	8,8±2,3	50,6±9,8	5,8	3,7±1,5	41,5±6,5	11,2
GCV	21,4±1,4*	175,0±15,5	8,2	2,1±0,5	100,0±20,0	47,6

Los resultados representan la media±SD de muestras por triplicado de tres experimentos independiente. (**p*<0,05).

A continuación, se evaluó la eficiencia de replicación del ADN de HAdV y HCMV en presencia de CDV y GCV para evaluar el impacto de su co-infección en la síntesis *de novo* de cada ADN viral. Para los ensayos de co-infección, se seleccionaron concentraciones de 7 µg/ml y 30 µg/ml para CDV y GCV, respectivamente. Ambos, HAdV y HCMV fueron susceptibles a CDV en las concentraciones ensayadas con más de 2 log de reducción en su número de copias de ADN con respecto a un control positivo con DMSO (Figura 16A y Figura 16B).

CDV mostró reducciones de 2 logs en el número de copias de ADN frente a HCMV, tanto en monocultivo como en co-infección con HAdV. Frente a HAdV CDV

mostró una inhibición que alcanzó reducciones de 4 log en el monocultivo y 3 log en la co-infección con HCMV (Figura 16). Del mismo modo, GCV mostró reducciones de 2 log en el número de copias de ADN de HCMV, tanto en monocultivo como en co-infección con HAdV (Figura 16A). Sin embargo, la actividad antiviral de GCV contra HAdV fue 1-log más baja que para CDV y lo que es más significativo, mejoró en 1-log su actividad contra HAdV en co-infección en comparación con su actividad en monocultivo, donde alcanzó la misma actividad de CDV con reducciones de 3 log en el número de copias de ADN de HAdV (Figura 16B).

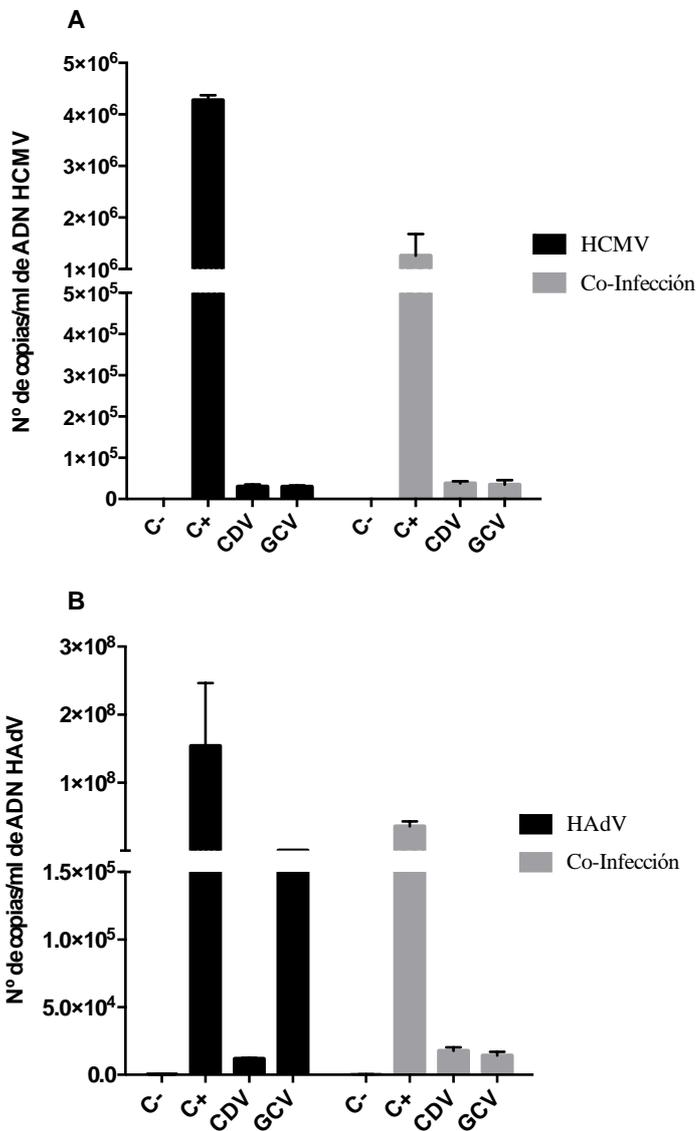


Figura 16. La actividad antiviral de CDV y GCV contra HCMV (A) y HAdV (B), por separado y en condiciones de co-infección, ambas determinadas por qPCR. Los

resultados muestran la media \pm SD de muestras por triplicado de tres experimentos independientes

La actividad antiviral de CDV y GCV se evaluó además utilizando un ensayo que determina la inhibición en la producción de nuevas partículas virales en presencia de dichos fármacos. El tratamiento con CDV se asoció con reducciones en el rendimiento de HAdV y HCMV de $82,5\pm 21,4$ y $110,7\pm 12$, respectivamente. Cuando se usó GCV, las reducciones en el rendimiento del virus fueron mayores para el HCMV y la co-infección que para el HAdV ($145,2\pm 35,5$ vs. $116,4$ vs. $23,0\pm 10,0$ respectivamente, $p < 0,05$) (Tabla 12).

Tabla 12. Actividad antiviral de CDV y GCV frente a HAdV, HCMV en condiciones de mono-infección y co-infección de ambos, determinada por la reducción de la producción viral y expresada como las veces que se reduce en comparación a un control tratado con DMSO. Los resultados fueron representados como la media \pm SD de muestras por triplicado de tres experimentos independientes ($*p < 0,05$).

	HAdV	HCMV	CO-I
CDV	$82,5\pm 21,4$	$110,7\pm 12,0$	$98,3\pm 30,5$
GCV	$23,0\pm 10,0^*$	$145,2\pm 35,5$	$116,4\pm 27,3$

VI. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio prospectivo muestran una alta incidencia de viremia por HAdV, incluyendo niveles superiores a 5×10^2 copias/ml, en pacientes adultos que reciben alo-TPH. La mayoría de los episodios virales fueron blips, con baja carga viral en sangre, pero aproximadamente uno de cada cuatro fueron episodios persistentes, con una carga viral superior a 10^5 copias/ml. En este estudio no se identificaron factores demográficos o clínicos asociados al desarrollo de viremia HAdV, ni con otras infecciones durante los 100 días posteriores al alo-TPH. Las tasas de mortalidad fueron similares en pacientes con y sin viremia por HAdV e independiente también del grado de viremia ($<$ vs. ≥ 500 copias/ml). Finalmente, la respuesta inmune de las células T específicas para HAdV aumentó constantemente después del alo-TPH en adultos en nuestro estudio. Se observó dicha respuesta en tres de cada 10 pacientes hasta casi nueve de cada 10 pacientes, a los 30 y 100 días después del trasplante, respectivamente.

La incidencia de viremia por HAdV encontrada en el estudio es similar a la reportada en pacientes pediátricos [1] y más alta que la reportada para los pacientes adultos con alo-TPH, que son muy variables (3% a 15%) [143, 166-168] y generalmente más bajos que en los pacientes pediátricos. La alta variabilidad de la incidencia observada en estudios anteriores puede depender del uso de diferentes herramientas de diagnóstico no moleculares, como los métodos de inmunohistoquímica o cultivo [1, 3]. Además, de acuerdo con otros estudios [169, 170], se detectaron episodios de viremia tanto persistente como blips al inicio del seguimiento (días -7 y 0) lo que sugiere que la viremia por HAdV puede surgir de la reactivación del virus debido a la pérdida de la respuesta inmune o a través del injerto. Estos datos podrían respaldar la implementación de un cribado para HAdV previo al trasplante como ya han sugerido otros [170].

Los datos del presente estudio no apoyan, en pacientes adultos con alo-TPH, el umbral de más de 5×10^2 copias de ADN de HAdV/ml en sangre para ser considerado como un marcador de infección invasiva por HAdV [159, 169], ya que ningún paciente desarrolló enfermedad por HAdV diseminada, independientemente del nivel de viremia por HAdV.

En pacientes adultos receptores de un alo-TPH, los factores de riesgo postulados para la infección y la enfermedad por HAdV incluyen trasplante haploidéntico o de

cordón de donante no relacionado y enfermedad de injerto contra huésped (EICH) de grado III/IV, aunque la enfermedad diseminada por HAdV también puede ocurrir antes del desarrollo de EICH aguda y tratamiento con alemtuzumab [56, 63, 148, 171]. Sin embargo, en el presente estudio no encontramos ninguna asociación entre la viremia HAdV y estos factores de riesgo, incluso en casos con viremia superior a 5×10^2 copias de ADN de HAdV/ml.

La respuesta inmune de células T específicas de HAdV resulta esencial para el control de la infección después del TPH [1, 63, 168, 172]. Es bien conocido el papel de las células T CD8+ citotóxicas para controlar las infecciones virales, ya que reconocen y destruyen las células infectadas, que muestran los péptidos por las moléculas del MHC de clase I y, además, se ha reportado previamente el aumento significativo de células T CD8+ específicas del hexón de HAdV después del aclaramiento viral [2]. Del mismo modo, se ha demostrado que las células T CD4+ específicas de HAdV aumentan después de la eliminación viral en pacientes con enfermedad por HAdV [2]. Se ha demostrado además que los individuos sanos seropositivos presentan concentraciones de células T CD4+ y CD8+ específicas de HAdV tan altas como el 1% de la población total de células T [173]. Se ha sugerido además que la respuesta combinada de CD4+ y CD8+ es necesaria para un control eficiente de la infección por HAdV en pacientes que reciben un TPH, ya que la desaparición de la viremia por HAdV se sincronizó con la aparición posterior de una respuesta combinada de células T CD4+/CD8+ específicas para HAdV, basándose en la cuantificación de INF- γ tras la estimulación de las células T CD4+/CD8+ con péptidos del hexón de HAdV [121].

En el presente estudio, hemos caracterizado la respuesta inmune celular específica de HAdV para identificar el marcador inmunológico más apropiado para guiar el manejo de las infecciones por HAdV en receptores de alo-TPH en adultos. A diferencia de Guérin-El Khourouj *et al.* [150], quien sugirió que la monitorización de IFN- γ CD4+ específico de HAdV puede ser de gran ayuda para la detección temprana en pacientes de TPH con alto riesgo [150], nosotros encontramos que la expresión de IL-2 y TNF- α por las células T CD8+ fueron los marcadores más tempranos en pacientes con viremia HAdV, tan pronto como a las tres semanas. Además, las respuestas inmunitarias específicas de las células T CD4+ y CD8+ aumentaron en aquellos casos en los que existía una mayor carga de HAdV en sangre. Un hallazgo

interesante en el presente estudio fue la eliminación casi completa de la viremia por HAdV después de tres semanas de seguimiento, en pacientes con viremia persistente antes del trasplante, los cuales poseían expresiones más altas de INF- γ por CD4+ y de IL-2, TNF- α e INF- γ por células T CD8+, aunque el pequeño número de estos pacientes solo permite sugerir esta asociación.

Actualmente no hay recomendaciones definitivas para la monitorización de las cargas virales de HAdV y la reconstitución inmune específica de células T como base para la profilaxis y el tratamiento de las infecciones por HAdV en pacientes adultos. En pacientes pediátricos, estas recomendaciones se limitan al umbral común de DNAemia por HAdV superior a 1×10^3 copias/ml para el inicio de la terapia preventiva, que en la mayoría de los casos se deriva de estudios retrospectivos y observacionales fundamentalmente en pacientes pediátricos y en algunos casos previa selección de pacientes tras el diagnóstico de la enfermedad diseminada por HAdV [168, 174, 175]. Estudios más recientes sugieren que la detección previa al trasplante de ADN de HAdV superior a 1×10^6 en heces se correlacionaría con un mayor riesgo de infección invasiva temprana por HAdV [159]. En una reciente encuesta europea sobre el tratamiento de la infección por HAdV en alo-TPH, los profesionales clínicos que asisten a pacientes adultos inician un tratamiento preventivo con cidofovir en el 29% y el 14% de los pacientes de alto y bajo riesgo, respectivamente [174]. Los altos efectos adversos observados con cidofovir representan un desafío para esta decisión, en ausencia de datos clínicos de estudios prospectivos que apoyen la predicción de viremia en la enfermedad diseminada por HAdV. En este contexto, los resultados del presente estudio no apoyan la terapia preventiva basada sólo en la viremia por HAdV.

Como una de las limitaciones de nuestro estudio debemos destacar que debido a que la respuesta inmune de las células T no se evaluó en todos puntos de tiempo en los que se evaluó la carga de HAdV en la sangre, por lo que no fue posible determinar una relación precisa entre el desarrollo de la respuesta inmune específica de HAdV y la presencia de los episodios de adenoviremia. Además, la inclusión de otro tipo de muestras en la monitorización de la infección por HAdV, como las heces, podría haber ayudado a comprender mejor la posterior viremia por HAdV.

Actualmente no existe un medicamento aprobado por las autoridades sanitarias para tratar las infecciones por HAdV. Brincidofovir (CMX001) representa una alternativa prometedora que concluyó en 2016 la Fase III de su desarrollo clínico, aunque los resultados de dicho ensayo clínico aún no se han publicado (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02087306). El uso de CDV suele ser limitado debido a su alta nefrotoxicidad y baja biodisponibilidad [1]. También se ha utilizado GCV, pero ha mostrado resultados de eficacia muy variables y, además, causa neutropenia que también limita su uso en este tipo de pacientes [63].

El uso de GCV para tratar las infecciones por HAdV no tiene una base lógica, ya que GCV debe ser fosforilada en primer lugar por una quinasa viral a su forma monofosfato y HAdV no codifica para dicha proteína quinasa. Sin embargo, la evaluación *in vivo* de la eficacia de GCV condujo a la recomendación de su uso para tratar infecciones por HAdV en pacientes con trasplantes [165]. Además, otros autores encontraron que el uso de GCV como profilaxis para la infección por HCMV se asoció significativamente a un menor riesgo de desarrollar infecciones por HAdV [137]. Basándonos en estos datos, uno de nuestros objetivos fue demostrar que, como sucede en presencia de la TK de HSV, la presencia de HCMV, y en consecuencia de su proteína quinasa UL97, puede ser la causa de la eficacia mejorada de GCV frente a HAdV *in vivo*.

En este trabajo hemos demostrado que la actividad antiviral de CDV contra HAdV y HCMV es independiente de la presencia o no de ambos virus. Sin embargo, y a diferencia de CDV, la actividad antiviral *in vitro* de GCV contra HAdV mejora de manera significativa cuando existe una condición de co-infección con HCMV.

No se conoce de forma clara el mecanismo con el que GCV afecta la replicación del ADN de HAdV. Si bien no hay evidencia de que el genoma de HAdV codifique para una proteína quinasa, estudios previos demostraron que la actividad de la TK de HSV contribuía con aumentos de 4 a 6 veces en la eficacia de GCV frente a HAdV [176, 177]. En nuestro caso, la actividad antiviral mejorada del GCV durante la infección sugiere la participación de la proteína quinasa UL97 de HCMV. La fosforilación de GCV por UL97 aumentaría o aceleraría la conversión de GCV a GCV monofosfato y, en consecuencia, la presencia de la forma activa trifosforilada de GCV

(Figura 17). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que los pacientes tratados con GCV como terapia preventiva para las infecciones por HCMV pueden considerarse pacientes de bajo riesgo para el desarrollo posterior de infecciones por HAdV.

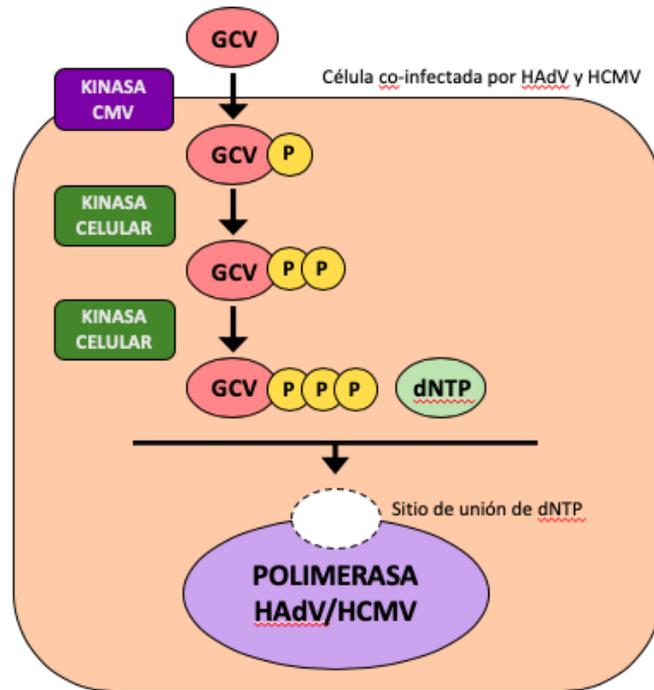


Figura 17. Posible mecanismo de acción de GCV frente a HAdV en condiciones de co-infección de HCMV y HAdV.

En resumen, nuestros resultados muestran que la infección por HAdV es un evento frecuente después del alo-TPH en pacientes adultos, en contraste con los datos de estudios anteriores. La viremia puede ser persistente y con altas cargas virales. Sin embargo, no encontramos asociación con el desarrollo de enfermedad diseminada por HAdV ni con la mortalidad. La respuesta inmune de células T específicas para HAdV parece presentar un estado de pre-estimulación, ya que estaba presente en la mayoría de los pacientes, incluso en un pequeño número de ellos sin viremia por HAdV, y puede ayudar a controlar las infecciones por HAdV en receptores adultos de alo-TPH, como sugiere la eliminación temprana y rápida de la viremia en aquellos pacientes con episodio persistente antes del trasplante. Finalmente, los datos de este estudio sugieren que aquellos pacientes tratados con GCV como terapia preventiva frente a HCMV deben ser considerados como pacientes de bajo riesgo para sufrir infecciones por HAdV.

VII. CONCLUSIONES

1. La incidencia de la infección por HAdV en pacientes adultos receptores de alo-TPH es elevada. En nuestro estudio cincuenta y ocho pacientes (61%) presentaron carga viral detectable en sangre, de los cuales 22 (23.2%) mostraron niveles superiores a 5×10^2 copias/ml. La mayor parte de los episodios fueron blips, siendo 1 de cada 4 episodios persistentes.
2. La respuesta inmune de las células T específicas para HAdV aumenta constantemente después del alo-TPH, detectándose en tres de cada 10 pacientes durante los primeros 21 días, y hasta en nueve de cada 10 pacientes a los 100 días post-trasplante.
3. La expresión de IL-2 y TNF- α por las células T CD8 + se presentan como los marcadores más tempranos en pacientes con viremia por HAdV. Además, las respuestas inmunitarias específicas de las células T CD4+ y CD8+ aumentaron en aquellos casos en los que existía una mayor carga de HAdV en sangre.
4. Se ha comprobado la eliminación de la viremia por HAdV, a partir del día 14 post-trasplante, en los pacientes con viremia persistente pre-trasplante que poseían expresiones más altas de INF- γ por CD4+ y de IL-2, TNF- α e INF- γ por células T CD8+, aunque el pequeño número de casos solo permite sugerir esta asociación.
5. No se identificaron factores demográficos o clínicos asociados al desarrollo de viremia por HAdV durante los 100 días posteriores al alo-TPH. Las tasas de mortalidad fueron similares en pacientes con y sin viremia por HAdV.
6. La actividad antiviral *in vitro* de CDV frente a HAdV y HCMV es independiente de la presencia de uno o ambos virus. Sin embargo, la actividad antiviral *in vitro* de GCV contra HAdV mejora cuando existe una condición de co-infección con HCMV.

- Líneas de Tratamiento EICH: 1^a/2^a/3^a

CMV

- Infección previa por CMV: S/N; Fecha diagnóstico: (dd/mm/aaaa)
- Missmath CMV (D/R):
- Infección sintomática CMV: S/N
- Tratamiento infección CMV (días):

DATOS CLÍNICOS RELATIVOS A LA INFECCIÓN POR HAd:

- Diagnóstico de infección por HAd: S/N; Fecha: (dd/mm/aaaa):
- Tratamiento inmunosupresor al diagnóstico de la infección por HAd:
- Presentación clínica de la infección:
 - o Asintomático: S/N (0)
 - o Fiebre: S/N (1)
 - o Infiltrado pulmonar: S/N (2)
 - o Diarrea: S/N (3)
 - o Disfunción hepática: S/N (4)
 - o Sepsis: S/N (5)
 - o Sospecha de infección diseminada o fallo multiorgánico: S/N (6)
 - o Otros (especificar a continuación): (7)
- Otra infección concomitante: S/N Etiología: Bacteriana/Vírica/Fúngica/ Sin etiología
- Tipo de infección concomitante: Fecha de diagnóstico: (dd/mm/aaaa)
- Neutropenia febril: S/N; Fecha inicio/fin: (dd/mm/aaaa)
- EVOH: S/N
- Otras complicaciones (describir):

VARIABLES DEPENDIENTES DE LA INFECCIÓN POR HAd:

- Monitorización periódica de la carga viral:

Día -7	Día 0	Día +7	Día +14	Día +21
Fecha determ: --/--/----				
Nº copias:				
				Resp.IE: S/N

				Tipo resp. IE: CD4+/CD8+
Día +28	Día + 35	Día +42	Día +49	Día +56
Fecha determ: --/--/----				
Nº copias:				
				Resp.IE: S/N
				Tipo resp. IE: CD4+/CD8+
Día + 70	Día +84	Día +100		
Fecha determ: --/--/----	Fecha determ: --/--/----	Fecha determ: --/--/----		
Nº copias:	Nº copias:	Nº copias:		
		Resp.IE: S/N		
		Tipo resp. IE: CD4+/CD8+		

- Viremia HAd >500 copias/ml: S/N
- Viremia HAd persistente: S/N

- Otras muestras: S/N
- Tipo de muestra: LBA/Orina/ Biopsia colon/Biopsia hepática/ LCR
- Fecha de la muestra: (dd/mm/aaaa)
- Diagnóstico de HAd: +/-

EVOLUCIÓN:

- Fracaso del implante: S/N
- Recidiva hemopatía: S/N; Fecha recidiva: (dd/mm/aaaa)
- Evolución: 1. Curación 2. Éxito atribuible 3. Éxito no atribuible
- Causa del éxito:
- Supervivencia a los 100 días post-Alo-TPH: S/N
- Fecha éxito: (dd/mm/aaaa)

ANEXO II. CONSENTIMIENTO INFORMADO



Estudio de la incidencia de la infección por adenovirus, su cinética de replicación, y la respuesta inmune celular: impacto en la progresión clínica de pacientes adultos receptores de TPH (PI 15/00489).

CONSENTIMIENTO INFORMADO - INFORMACIÓN AL PACIENTE

Antes de proceder a la firma de este consentimiento informado, lea atentamente la información que a continuación se le facilita y realice las preguntas que considere oportunas.

Naturaleza:

El objetivo del estudio será determinar qué número de pacientes adultos que reciben un trasplante de progenitores hematopoyéticos pueden estar infectados por adenovirus, así como conocer la respuesta inmune del organismo ante dicha infección, con el objeto de conocer la trascendencia que este hecho en su evolución clínica.

El estudio consistirá en el seguimiento protocolizado de los datos clínicos antes y tras la realización del trasplante, así como la extracción de sangre venosa, coincidiendo todo ello con las visitas clínicas y las extracciones de sangre que forman parte del seguimiento habitual de los pacientes trasplantados.

También se estudiará la presencia de adenovirus en otras muestras obtenidas de endoscopia, broncoscopia, colonoscopia u otras muestras que estén indicadas clínicamente, en aquellos pacientes con procesos clínicos intercurrentes que puedan estar causados por adenovirus.

De forma nueva para este virus, observaremos la respuesta inmunológica de los pacientes trasplantados para intentar dilucidar causas, factores de riesgo o de protección que agraven o atenúen los efectos de la infección.



Importancia:

Este estudio intentará determinar:

- Porcentaje de pacientes receptores de TPH que están más expuestos a la colonización por adenovirus y, dentro de este grupo, cuántos de ellos desarrollan la infección por este microorganismo.
- Conocer en qué tipo de pacientes existe una mayor colonización/infección por adenovirus.
- Conocer la respuesta inmunológica del paciente frente al adenovirus
- Lograr en un futuro prevenir o minimizar la afectación por parte este microorganismo gracias a un mayor conocimiento de su proceso infectivo a raíz del cual podamos optimizar las herramientas terapéuticas disponibles.

Implicaciones para el paciente:

- La participación es totalmente voluntaria.
- El paciente puede retirarse del estudio cuando así lo manifieste, sin dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
- Todos los datos carácter personal, obtenidos en este estudio son confidenciales y se tratarán conforme a la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- La información obtenida se utilizará exclusivamente para los fines específicos de este estudio.

Riesgos de la investigación para el paciente:

No hay ningún riesgo durante ni posterior a la recogida de muestras.

Si requiere información adicional se puede poner en contacto con nuestro personal de investigación en el teléfono: 670943816 o en el correo electrónico:

manuela.aguilar.sspa@juntadeandalucia.es



Estudio de la incidencia de la infección por adenovirus, su cinética de replicación, y la respuesta inmune celular: impacto en la progresión clínica de pacientes adultos receptores de TPH (PI 15/00489).

CONSENTIMIENTO INFORMADO - INFORMACIÓN AL PACIENTE

Yo (Nombre y Apellidos):.....

He leído el documento informativo que acompaña a este consentimiento (Información al Paciente)

He podido hacer preguntas sobre el “Estudio de la incidencia de la infección por adenovirus, su cinética de replicación, y la respuesta inmune celular: impacto en la progresión clínica de pacientes adultos receptores de TPH”.

He recibido suficiente información sobre el “Estudio de la incidencia de la infección por adenovirus, su cinética de replicación, y la respuesta inmune celular: impacto en la progresión clínica de pacientes adultos receptores de TPH”.

He hablado con el profesional sanitario informador:.....

- Comprendo que mi participación es voluntaria y soy libre de participar o no en el estudio.
- Se me ha informado que todos los datos obtenidos en este estudio serán confidenciales y se tratarán conforme establece la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- Se me ha informado de que la información obtenida sólo se utilizará para los fines específicos del estudio.
- Deseo ser informado/a de los datos que se obtengan en el curso de la investigación, incluidos los descubrimientos inesperados que se puedan producir: Si/No
- Comprendo que puedo retirarme del estudio:
 - o Cuando quiera
 - o Sin tener que dar explicaciones
 - o Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos



Presto libremente mi conformidad para participar en el proyecto titulado “Estudio de la incidencia de la infección por adenovirus, su cinética de replicación, y la respuesta inmune celular: impacto en la progresión clínica de pacientes adultos receptores de TPH”.

Firma de la paciente
(o representante legal en su caso)

Firma del profesional
sanitario informador

Nombre y apellidos:.....

Nombre y apellidos:

Fecha:

Fecha:

ANEXO III. PUBLICACIONES DERIVADAS DEL TRABAJO DE LA TESIS DOCTORAL

A high incidence of adenovirus infection is controlled by T-cell immune response in adult allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients. Sánchez-Céspedes J.*, **Marrugal-Lorenzo J.A.***, Martín-Gandul C., Rodríguez-Torres N., Montero-Mateos E., Serna-Gallego A., Escamilla-Gómez V., Merino L., Espigado I., Pachón J., Pérez Simón J.A. y Aguilar-Guisado M.

Manuscrito en revisión en la revista *Clinical Microbiology and Infection* (CLM-19-16016).

In vitro co-infection by cytomegalovirus improves the antiviral activity of ganciclovir against human adenovirus. Aguilar-Guisado M.*, **Marrugal-Lorenzo J.A.***, Merino L., Pachón J., y Sánchez-Céspedes J.

Manuscrito en revisión en la revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (AAC01840-19).

ANEXO IV. OTRAS PUBLICACIONES GENERADAS DURANTE EL PERIODO DE FORMACIÓN PREDOCTORAL

Repositioning salicylanilide anthelmintic drugs to treat adenovirus infections. **Marrugal-Lorenzo J.A.**, Serna-Gallego A., Berastegui-Cabrera J, Pachón J, and Sánchez-Céspedes J. *Scientific Reports* 2019 Jan 9;9(1):17. doi: 10.1038/s41598-018-37290-3. IF: 4.525. Q1.

Inhibition of adenovirus infection by mifepristone. **Marrugal-Lorenzo J.A.**, Serna-Gallego A., González-González L., Buñuales M, Poutou J., Pachón J., Gonzalez-Aparicio M., Hernandez-Alcoceba R. and Sánchez-Céspedes J. *Antiviral Research* 2018 Nov;159:77-83. doi: 10.1016/j.antiviral.2018.09.011. IF: 4.130. Q1.

Multiple multicomponent reactions: unexplored substrates, selective processes, and versatile chemotypes in biomedicine. Ghashghaei O., Caputo S., Sintés M., Revés M., Kielland N., Estarellas C., Luque F.J., Aviñó A., Eritja R., Serna-Gallego A., **Marrugal-Lorenzo J.A.**, Pachón J., Sánchez-Céspedes J., Treadwell R., de Moliner F., Vendrell M. y Lavilla R. *Chemistry – A European Journal* 2018 Sep 25 ;24 (54): 14513-14521. doi: 10.1002/chem.201802877. IF: 5.160. Q1.

New 4-Acyl-1-phenylaminocarbonyl-2-phenylpiperazine derivatives as potential inhibitors of adenovirus infection. Synthesis, biological evaluation, and structure-activity relationships. Sánchez-Céspedes J., Martínez-Aguado P., Vega-Holm M., Serna-Gallego A., Candela J.I., **Marrugal-Lorenzo J.A.**, Pachón J., Iglesias-Guerra F. y Vega-Pérez J.M. *Journal of Medicinal Chemistry* 2016 Jun 9;59(11):5432-48. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b00300. IF: 6.259. D1

Antiadenovirus drug discovery: potential targets and evaluation methodologies. Martínez-Aguado, P., Serna-Gallego, A., **Marrugal-Lorenzo, J.A.**, Gomez-Marin, I., y Sanchez-Céspedes, J. *Drug Discov Today* 2015 Oct;20(10):1235-42. doi: 10.1016/j.drudis.2015.07.007. IF: 6.369. D1

REFERENCIAS

1. Lion, T., *Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients*. Clin Microbiol Rev, 2014. **27**(3): p. 441-62.
2. Bruminhent, J., et al., *Absolute lymphocyte count and human adenovirus-specific T-cell immune restoration of human adenovirus infection after kidney transplantation*. J Med Virol, 2019. **91**(8): p. 1432-1439.
3. Echavarría, M., *Adenoviruses in immunocompromised hosts*. Clin Microbiol Rev, 2008. **21**(4): p. 704-15.
4. Metzgar, D., et al., *Evaluation of multiplex type-specific real-time PCR assays using the LightCycler and joint biological agent identification and diagnostic system platforms for detection and quantitation of adult human respiratory adenoviruses*. J Clin Microbiol, 2010. **48**(4): p. 1397-403.
5. Robinson, C.M., et al., *Molecular evolution of human adenoviruses*. Sci Rep, 2013. **3**: p. 1812.
6. Menon, B.B., et al., *Epidemic Keratoconjunctivitis-Causing Adenoviruses Induce MUC16 Ectodomain Release To Infect Ocular Surface Epithelial Cells*. mSphere, 2016. **1**(1).
7. Robinson, C.M., et al., *Molecular evolution of human species D adenoviruses*. Infect Genet Evol, 2011. **11**(6): p. 1208-17.
8. Cooper, R.J., et al., *The epidemiology of adenovirus infections in Greater Manchester, UK 1982-96*. Epidemiol Infect, 2000. **125**(2): p. 333-45.
9. Jones, M.S., 2nd, et al., *New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis*. J Virol, 2007. **81**(11): p. 5978-84.
10. Walls, T., A.G. Shankar, and D. Shingadia, *Adenovirus: an increasingly important pathogen in paediatric bone marrow transplant patients*. Lancet Infect Dis, 2003. **3**(2): p. 79-86.
11. Mitra, A.K. and K. Clarke, *Viral obesity: fact or fiction?* Obes Rev, 2010. **11**(4): p. 289-96.
12. Ponterio, E. and L. Gnessi, *Adenovirus 36 and Obesity: An Overview*. Viruses, 2015. **7**(7): p. 3719-40.
13. Arnberg, N., *Adenovirus receptors: implications for targeting of viral vectors*. Trends Pharmacol Sci, 2012. **33**(8): p. 442-8.

14. Signas, C., G. Akusjarvi, and U. Pettersson, *Adenovirus 3 fiber polypeptide gene: implications for the structure of the fiber protein*. J Virol, 1985. **53**(2): p. 672-8.
15. Green, N.M., et al., *Evidence for a repeating cross-beta sheet structure in the adenovirus fibre*. Embo j, 1983. **2**(8): p. 1357-65.
16. Saban, S.D., et al., *Visualization of alpha-helices in a 6-angstrom resolution cryoelectron microscopy structure of adenovirus allows refinement of capsid protein assignments*. J Virol, 2006. **80**(24): p. 12049-59.
17. Smith, J.G., et al., *Adenovirus*. Curr Top Microbiol Immunol, 2010. **343**: p. 195-224.
18. Wiethoff, C.M., et al., *Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly*. J Virol, 2005. **79**(4): p. 1992-2000.
19. Chatterjee, P.K., M.E. Vayda, and S.J. Flint, *Interactions among the three adenovirus core proteins*. J Virol, 1985. **55**(2): p. 379-86.
20. Robinson, A.J., et al., *Replicating adenovirus 2 DNA molecules contain terminal protein*. Virology, 1979. **96**(1): p. 143-58.
21. Vayda, M.E., A.E. Rogers, and S.J. Flint, *The structure of nucleoprotein cores released from adenovirions*. Nucleic Acids Res, 1983. **11**(2): p. 441-60.
22. Vayda, M.E. and S.J. Flint, *Isolation and characterization of adenovirus core nucleoprotein subunits*. J Virol, 1987. **61**(10): p. 3335-9.
23. Matthews, D.A. and W.C. Russell, *Adenovirus core protein V is delivered by the invading virus to the nucleus of the infected cell and later in infection is associated with nucleoli*. J Gen Virol, 1998. **79** (Pt 7): p. 1671-5.
24. Zhang, W. and M.J. Imperiale, *Interaction of the adenovirus IVa2 protein with viral packaging sequences*. J Virol, 2000. **74**(6): p. 2687-93.
25. Tribouley, C., et al., *The product of the adenovirus intermediate gene IVa2 is a transcriptional activator of the major late promoter*. J Virol, 1994. **68**(7): p. 4450-7.
26. Mangel, W.F. and C. San Martin, *Structure, function and dynamics in adenovirus maturation*. Viruses, 2014. **6**(11): p. 4536-70.
27. Saha, B., C.M. Wong, and R.J. Parks, *The adenovirus genome contributes to the structural stability of the virion*. Viruses, 2014. **6**(9): p. 3563-83.
28. Nemerow, G.R., et al., *Insights into adenovirus host cell interactions from structural studies*. Virology, 2009. **384**(2): p. 380-8.

29. Gaggar, A., D.M. Shayakhmetov, and A. Lieber, *CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses*. Nat Med, 2003. **9**(11): p. 1408-12.
30. Bergelson, J.M., et al., *Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5*. Science, 1997. **275**(5304): p. 1320-3.
31. Wang, H., et al., *Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 14*. Nat Med, 2011. **17**(1): p. 96-104.
32. Trinh, H.V., et al., *Avidity binding of human adenovirus serotypes 3 and 7 to the membrane cofactor CD46 triggers infection*. J Virol, 2012. **86**(3): p. 1623-37.
33. Lyle, C. and F. McCormick, *Integrin alphavbeta5 is a primary receptor for adenovirus in CAR-negative cells*. Virol J, 2010. **7**: p. 148.
34. Suomalainen, M., et al., *A direct and versatile assay measuring membrane penetration of adenovirus in single cells*. J Virol, 2013. **87**(22): p. 12367-79.
35. Greber, U.F., et al., *Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells*. Cell, 1993. **75**(3): p. 477-86.
36. Suomalainen, M., et al., *Microtubule-dependent plus- and minus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus*. J Cell Biol, 1999. **144**(4): p. 657-72.
37. Martinez-Aguado, P., et al., *Antiadenovirus drug discovery: potential targets and evaluation methodologies*. Drug Discov Today, 2015. **20**(10): p. 1235-42.
38. Lynch, J.P., 3rd, M. Fishbein, and M. Echavarría, *Adenovirus*. Semin Respir Crit Care Med, 2011. **32**(4): p. 494-511.
39. Lynch, J.P., 3rd and A.E. Kajon, *Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention*. Semin Respir Crit Care Med, 2016. **37**(4): p. 586-602.
40. Gadsby, N.J., et al., *Comprehensive Molecular Testing for Respiratory Pathogens in Community-Acquired Pneumonia*. Clin Infect Dis, 2016. **62**(7): p. 817-823.
41. Mitchell, L.S., et al., *Adenovirus 7a: a community-acquired outbreak in a children's hospital*. Pediatr Infect Dis J, 2000. **19**(10): p. 996-1000.
42. Garnett, C.T., et al., *Prevalence and quantitation of species C adenovirus DNA in human mucosal lymphocytes*. J Virol, 2002. **76**(21): p. 10608-16.
43. Kojaoghlanian, T., P. Flomenberg, and M.S. Horwitz, *The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host*. Rev Med Virol, 2003. **13**(3): p. 155-71.

44. Lenaerts, L., E. De Clercq, and L. Naesens, *Clinical features and treatment of adenovirus infections*. Rev Med Virol, 2008. **18**(6): p. 357-74.
45. Tan, D., et al., *Severe Community-Acquired Pneumonia Caused by Human Adenovirus in Immunocompetent Adults: A Multicenter Case Series*. PLoS One, 2016. **11**(3): p. e0151199.
46. Kajon, A.E. and M.G. Ison, *Severe Infections with Human Adenovirus 7d in 2 Adults in Family, Illinois, USA, 2014*. Emerg Infect Dis, 2016. **22**(4): p. 730-3.
47. Chang, S.Y., et al., *A community-derived outbreak of adenovirus type 3 in children in Taiwan between 2004 and 2005*. J Med Virol, 2008. **80**(1): p. 102-12.
48. Moura, P.O., et al., *Molecular epidemiology of human adenovirus isolated from children hospitalized with acute respiratory infection in Sao Paulo, Brazil*. J Med Virol, 2007. **79**(2): p. 174-81.
49. Lin, K.H., et al., *A two decade survey of respiratory adenovirus in Taiwan: the reemergence of adenovirus types 7 and 4*. J Med Virol, 2004. **73**(2): p. 274-9.
50. Kajon, A.E., et al., *Molecular epidemiology of adenovirus type 4 infections in US military recruits in the postvaccination era (1997-2003)*. J Infect Dis, 2007. **196**(1): p. 67-75.
51. Hakim, F.A. and I.M. Tleyjeh, *Severe adenovirus pneumonia in immunocompetent adults: a case report and review of the literature*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2008. **27**(2): p. 153-8.
52. Al-Herz, W. and M.A. Moussa, *Survival and predictors of death among primary immunodeficient patients: a registry-based study*. J Clin Immunol, 2012. **32**(3): p. 467-73.
53. Lindemans, C.A., A.M. Leen, and J.J. Boelens, *How I treat adenovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients*. Blood, 2010. **116**(25): p. 5476-85.
54. Verdeguer, A., et al., *Observational prospective study of viral infections in children undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation: a 3-year GETMON experience*. Bone Marrow Transplant, 2011. **46**(1): p. 119-24.
55. Bil-Lula, I., et al., *Hematuria due to adenoviral infection in bone marrow transplant recipients*. Transplant Proc, 2010. **42**(9): p. 3729-34.
56. Ison, M.G., *Adenovirus infections in transplant recipients*. Clin Infect Dis, 2006. **43**(3): p. 331-9.

57. Seidemann, K., et al., *Monitoring of adenovirus infection in pediatric transplant recipients by quantitative PCR: report of six cases and review of the literature.* Am J Transplant, 2004. **4**(12): p. 2102-8.
58. Bridges, N.D., et al., *Adenovirus infection in the lung results in graft failure after lung transplantation.* J Thorac Cardiovasc Surg, 1998. **116**(4): p. 617-23.
59. Florescu, D.F. and J.A. Hoffman, *Adenovirus in solid organ transplantation.* Am J Transplant, 2013. **13 Suppl 4**: p. 206-11.
60. Flomenberg, P., et al., *Increasing incidence of adenovirus disease in bone marrow transplant recipients.* J Infect Dis, 1994. **169**(4): p. 775-81.
61. Bordigoni, P., et al., *Treatment of adenovirus infections in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.* Clin Infect Dis, 2001. **32**(9): p. 1290-7.
62. Long, S.S., L.K. Pickering, and C.G. Prober, *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases.* 2009: Churchill Livingstone/Elsevier.
63. Matthes-Martin, S., H. Boztug, and T. Lion, *Diagnosis and treatment of adenovirus infection in immunocompromised patients.* Expert Rev Anti Infect Ther, 2013. **11**(10): p. 1017-28.
64. Sive, J.I., et al., *Adenoviremia has limited clinical impact in the majority of patients following alemtuzumab-based allogeneic stem cell transplantation in adults.* Clin Infect Dis, 2012. **55**(10): p. 1362-70.
65. George, D., et al., *Adenovirus infection in paediatric allogeneic stem cell transplantation recipients is a major independent factor for significantly increasing the risk of treatment related mortality.* Br J Haematol, 2012. **156**(1): p. 99-108.
66. Walls, T., et al., *Adenovirus infection after pediatric bone marrow transplantation: is treatment always necessary?* Clin Infect Dis, 2005. **40**(9): p. 1244-9.
67. Leruez-Ville, M., et al., *Real-time blood plasma polymerase chain reaction for management of disseminated adenovirus infection.* Clin Infect Dis, 2004. **38**(1): p. 45-52.
68. Sandkovsky, U., L. Vargas, and D.F. Florescu, *Adenovirus: current epidemiology and emerging approaches to prevention and treatment.* Curr Infect Dis Rep, 2014. **16**(8): p. 416.

69. Michaels, M.G., et al., *Adenovirus infection in pediatric liver transplant recipients*. J Infect Dis, 1992. **165**(1): p. 170-4.
70. Humar, A., et al., *A surveillance study of adenovirus infection in adult solid organ transplant recipients*. Am J Transplant, 2005. **5**(10): p. 2555-9.
71. McGrath, D., et al., *Adenovirus infection in adult orthotopic liver transplant recipients: incidence and clinical significance*. J Infect Dis, 1998. **177**(2): p. 459-62.
72. Moulik, M., et al., *Viral endomyocardial infection is an independent predictor and potentially treatable risk factor for graft loss and coronary vasculopathy in pediatric cardiac transplant recipients*. J Am Coll Cardiol, 2010. **56**(7): p. 582-92.
73. Shirali, G.S., et al., *Association of viral genome with graft loss in children after cardiac transplantation*. N Engl J Med, 2001. **344**(20): p. 1498-503.
74. Ohori, N.P., et al., *Adenovirus pneumonia in lung transplant recipients*. Hum Pathol, 1995. **26**(10): p. 1073-9.
75. Siminovich, M. and P. Murtagh, *Acute lower respiratory tract infections by adenovirus in children: histopathologic findings in 18 fatal cases*. Pediatr Dev Pathol, 2011. **14**(3): p. 214-7.
76. Zhang, S.Y., et al., *Fatal pneumonia cases caused by human adenovirus 55 in immunocompetent adults*. Infect Dis (Lond), 2016. **48**(1): p. 40-7.
77. Hong, J.Y., et al., *Lower respiratory tract infections due to adenovirus in hospitalized Korean children: epidemiology, clinical features, and prognosis*. Clin Infect Dis, 2001. **32**(10): p. 1423-9.
78. Pacini, D.L., A.M. Collier, and F.W. Henderson, *Adenovirus infections and respiratory illnesses in children in group day care*. J Infect Dis, 1987. **156**(6): p. 920-7.
79. Lu, M.P., et al., *Clinical characteristics of adenovirus associated lower respiratory tract infection in children*. World J Pediatr, 2013. **9**(4): p. 346-9.
80. Alharbi, S., et al., *Epidemiology of severe pediatric adenovirus lower respiratory tract infections in Manitoba, Canada, 1991-2005*. BMC Infect Dis, 2012. **12**: p. 55.
81. Mendiratta, P., et al., *Extracorporeal membrane oxygenation for respiratory failure in the elderly: a review of the Extracorporeal Life Support Organization registry*. Asaio j, 2014. **60**(4): p. 385-90.

82. Kuschner, R.A., et al., *A phase 3, randomized, double-blind, placebo-controlled study of the safety and efficacy of the live, oral adenovirus type 4 and type 7 vaccine, in U.S. military recruits*. *Vaccine*, 2013. **31**(28): p. 2963-71.
83. Tan, D., et al., *Severe adenovirus community-acquired pneumonia in immunocompetent adults: chest radiographic and CT findings*. *J Thorac Dis*, 2016. **8**(5): p. 848-54.
84. Clark, T.W., D.H. Fleet, and M.J. Wiselka, *Severe community-acquired adenovirus pneumonia in an immunocompetent 44-year-old woman: a case report and review of the literature*. *J Med Case Rep*, 2011. **5**: p. 259.
85. Kim, S.J., et al., *Outcomes of early administration of cidofovir in non-immunocompromised patients with severe adenovirus pneumonia*. *PLoS One*, 2015. **10**(4): p. e0122642.
86. Verma, H., S.D. Chitambar, and G. Varanasi, *Identification and characterization of enteric adenoviruses in infants and children hospitalized for acute gastroenteritis*. *J Med Virol*, 2009. **81**(1): p. 60-4.
87. Meyer-Rusenber, B., et al., *Epidemic keratoconjunctivitis: the current situation and recommendations for prevention and treatment*. *Dtsch Arztebl Int*, 2011. **108**(27): p. 475-80.
88. Garnett, C.T., et al., *Latent species C adenoviruses in human tonsil tissues*. *J Virol*, 2009. **83**(6): p. 2417-28.
89. de Jong, P.J., et al., *Adenovirus isolates from urine of patients with acquired immunodeficiency syndrome*. *Lancet*, 1983. **1**(8337): p. 1293-6.
90. Mahr, J.A. and L.R. Gooding, *Immune evasion by adenoviruses*. *Immunol Rev*, 1999. **168**: p. 121-30.
91. Wold, W.S., et al., *Immune responses to adenoviruses: viral evasion mechanisms and their implications for the clinic*. *Curr Opin Immunol*, 1999. **11**(4): p. 380-6.
92. Wold, W.S., T.W. Hermiston, and A.E. Tollefson, *Adenovirus proteins that subvert host defenses*. *Trends Microbiol*, 1994. **2**(11): p. 437-43.
93. Gooding, L.R. and W.S. Wold, *Molecular mechanisms by which adenoviruses counteract antiviral immune defenses*. *Crit Rev Immunol*, 1990. **10**(1): p. 53-71.
94. Jan, J.T., S. Chatterjee, and D.E. Griffin, *Sindbis virus entry into cells triggers apoptosis by activating sphingomyelinase, leading to the release of ceramide*. *J Virol*, 2000. **74**(14): p. 6425-32.

95. Griffin, D.E. and J.M. Hardwick, *Perspective: virus infections and the death of neurons*. Trends Microbiol, 1999. **7**(4): p. 155-60.
96. Koyama, A.H., et al., *Role of virus-induced apoptosis in a host defense mechanism against virus infection*. J Med Invest, 1998. **45**(1-4): p. 37-45.
97. Guidotti, L.G., et al., *Viral cross talk: intracellular inactivation of the hepatitis B virus during an unrelated viral infection of the liver*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(10): p. 4589-94.
98. Guidotti, L.G. and F.V. Chisari, *Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 65-91.
99. Schultz, U., et al., *Elimination of duck hepatitis B virus RNA-containing capsids in duck interferon-alpha-treated hepatocytes*. J Virol, 1999. **73**(7): p. 5459-65.
100. Protzer, U., et al., *Interferon gene transfer by a hepatitis B virus vector efficiently suppresses wild-type virus infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(19): p. 10818-23.
101. Moskophidis, D., et al., *Resistance of lymphocytic choriomeningitis virus to alpha/beta interferon and to gamma interferon*. J Virol, 1994. **68**(3): p. 1951-5.
102. Muller, U., et al., *Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense*. Science, 1994. **264**(5167): p. 1918-21.
103. Leib, D.A., et al., *Interferons regulate the phenotype of wild-type and mutant herpes simplex viruses in vivo*. J Exp Med, 1999. **189**(4): p. 663-72.
104. McClary, H., et al., *Relative sensitivity of hepatitis B virus and other hepatotropic viruses to the antiviral effects of cytokines*. J Virol, 2000. **74**(5): p. 2255-64.
105. Guidotti, L.G., et al., *High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice*. J Virol, 1995. **69**(10): p. 6158-69.
106. Tough, D.F., et al., *Stimulation of naive and memory T cells by cytokines*. Immunol Rev, 1999. **170**: p. 39-47.
107. Deonarain, R., et al., *Impaired antiviral response and alpha/beta interferon induction in mice lacking beta interferon*. J Virol, 2000. **74**(7): p. 3404-9.
108. Hogg, J.C., *Role of latent viral infections in chronic obstructive pulmonary disease and asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(10 Pt 2): p. S71-5.
109. Chahal, J.S., et al., *The repression domain of the E1B 55-kilodalton protein participates in countering interferon-induced inhibition of adenovirus replication*. J Virol, 2013. **87**(8): p. 4432-44.

110. Hendrickx, R., et al., *Innate immunity to adenovirus*. Hum Gene Ther, 2014. **25**(4): p. 265-84.
111. Smith, J.G. and G.R. Nemerow, *Mechanism of adenovirus neutralization by Human alpha-defensins*. Cell Host Microbe, 2008. **3**(1): p. 11-9.
112. Heemskerk, B., et al., *Adenovirus-specific CD4+ T cell clones recognizing endogenous antigen inhibit viral replication in vitro through cognate interaction*. J Immunol, 2006. **177**(12): p. 8851-9.
113. Leen, A.M., et al., *Identification of hexon-specific CD4 and CD8 T-cell epitopes for vaccine and immunotherapy*. J Virol, 2008. **82**(1): p. 546-54.
114. Veltrop-Duits, L.A., et al., *Human CD4+ T cells stimulated by conserved adenovirus 5 hexon peptides recognize cells infected with different species of human adenovirus*. Eur J Immunol, 2006. **36**(9): p. 2410-23.
115. Serangeli, C., et al., *Ex vivo detection of adenovirus specific CD4+ T-cell responses to HLA-DR-epitopes of the Hexon protein show a contracted specificity of T(HELPER) cells following stem cell transplantation*. Virology, 2010. **397**(2): p. 277-84.
116. Hutnick, N.A., et al., *Adenovirus-specific human T cells are pervasive, polyfunctional, and cross-reactive*. Vaccine, 2010. **28**(8): p. 1932-41.
117. Leen, A.M., et al., *Conserved CTL epitopes on the adenovirus hexon protein expand subgroup cross-reactive and subgroup-specific CD8+ T cells*. Blood, 2004. **104**(8): p. 2432-40.
118. Heemskerk, B., et al., *Extensive cross-reactivity of CD4+ adenovirus-specific T cells: implications for immunotherapy and gene therapy*. J Virol, 2003. **77**(11): p. 6562-6.
119. Feuchtinger, T., et al., *Detection of adenovirus-specific T cells in children with adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation*. Br J Haematol, 2005. **128**(4): p. 503-9.
120. Geyeregger, R., et al., *Short-term in-vitro expansion improves monitoring and allows affordable generation of virus-specific T-cells against several viruses for a broad clinical application*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e59592.
121. Zandvliet, M.L., 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**(11): p. 1943-51.

122. Murphy, G.F., et al., *Adenovirus-associated hemorrhagic cystitis treated with intravenous ribavirin*. J Urol, 1993. **149**(3): p. 565-6.
123. Hromas, R., et al., *Failure of ribavirin to clear adenovirus infections in T cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation*. Bone Marrow Transplant, 1994. **14**(4): p. 663-4.
124. Naesens, L., et al., *Antiadenovirus activities of several classes of nucleoside and nucleotide analogues*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(3): p. 1010-6.
125. Lenaerts, L. and L. Naesens, *Antiviral therapy for adenovirus infections*. Antiviral Res, 2006. **71**(2-3): p. 172-80.
126. Safrin, S., J. Cherrington, and H.S. Jaffe, *Cidofovir. Review of current and potential clinical uses*. Adv Exp Med Biol, 1999. **458**: p. 111-20.
127. Sanchez-Cespedes, J., et al., *Inhibition of adenovirus replication by a trisubstituted piperazin-2-one derivative*. Antiviral Res, 2014. **108**: p. 65-73.
128. Lion, T., et al., *Monitoring of adenovirus load in stool by real-time PCR permits early detection of impending invasive infection in patients after allogeneic stem cell transplantation*. Leukemia, 2010. **24**(4): p. 706-14.
129. Ying, B., et al., *Ganciclovir inhibits human adenovirus replication and pathogenicity in permissive immunosuppressed Syrian hamsters*, in *Antimicrob Agents Chemother*. 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.: United States. p. 7171-81.
130. Hostetler, K.Y., *Alkoxyalkyl prodrugs of acyclic nucleoside phosphonates enhance oral antiviral activity and reduce toxicity: current state of the art*. Antiviral Res, 2009. **82**(2): p. A84-98.
131. Wold, W.S. and K. Toth, *Chapter three--Syrian hamster as an animal model to study oncolytic adenoviruses and to evaluate the efficacy of antiviral compounds*. Adv Cancer Res, 2012. **115**: p. 69-92.
132. Toth, K., et al., *Hexadecyloxypropyl-cidofovir, CMX001, prevents adenovirus-induced mortality in a permissive, immunosuppressed animal model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(20): p. 7293-7.
133. Painter, W., et al., *First pharmacokinetic and safety study in humans of the novel lipid antiviral conjugate CMX001, a broad-spectrum oral drug active against double-stranded DNA viruses*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(5): p. 2726-34.

134. Lenaerts, L., et al., *Mouse adenovirus type 1 infection in SCID mice: an experimental model for antiviral therapy of systemic adenovirus infections*, in *Antimicrob Agents Chemother*. 2005: United States. p. 4689-99.
135. Graci, J.D. and C.E. Cameron, *Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses*. *Rev Med Virol*, 2006. **16**(1): p. 37-48.
136. Morfin, F., et al., *In vitro susceptibility of adenovirus to antiviral drugs is species-dependent*. *Antivir Ther*, 2005. **10**(2): p. 225-9.
137. Bruno, B., et al., *Adenovirus infection in hematopoietic stem cell transplantation: effect of ganciclovir and impact on survival*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2003. **9**(5): p. 341-52.
138. Toth, K., et al., *Valganciclovir inhibits human adenovirus replication and pathology in permissive immunosuppressed female and male Syrian hamsters*. *Viruses*, 2015. **7**(3): p. 1409-28.
139. Razonable, R.R. and A.J. Eid, *Viral infections in transplant recipients*. *Minerva Med*, 2009. **100**(6): p. 479-501.
140. Preiksaitis, J.K., et al., *Canadian society of transplantation consensus workshop on cytomegalovirus management in solid organ transplantation final report*. *Am J Transplant*, 2005. **5**(2): p. 218-27.
141. Fischer, S.A., *Emerging viruses in transplantation: there is more to infection after transplant than CMV and EBV*. *Transplantation*, 2008. **86**(10): p. 1327-39.
142. Long, S.S., L.K. Pickering, and C.G. Prober. *Principles and practice of pediatric infectious diseases*. 2012; Available from: <http://www.clinicalkey.com/dura/browse/bookChapter/3-s2.0-C20090414806>.
143. Gustafson, I., et al., *Quantification of adenovirus DNA in unrelated donor hematopoietic stem cell transplant recipients*. *J Clin Virol*, 2008. **43**(1): p. 79-85.
144. Lion, T., et al., *Molecular monitoring of adenovirus in peripheral blood after allogeneic bone marrow transplantation permits early diagnosis of disseminated disease*. *Blood*, 2003. **102**(3): p. 1114-20.
145. Erard, V., et al., *Quantitative real-time polymerase chain reaction for detection of adenovirus after T cell-replete hematopoietic cell transplantation: viral load as a marker for invasive disease*. *Clin Infect Dis*, 2007. **45**(8): p. 958-65.
146. La Rosa, A.M., et al., *Adenovirus Infections in Adult Recipients of Blood and Marrow Transplants*. *Clinical Infectious Diseases*, 2001. **32**(6): p. 871-876.

147. Henke-Gendo, C., et al., *Improved quantitative PCR protocols for adenovirus and CMV with an internal inhibition control system and automated nucleic acid isolation*. J Med Virol, 2012. **84**(6): p. 890-6.
148. Hiwarkar, P., 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**(6): p. 803-8.
149. Saliba, R.M., et al., *General and Virus-Specific Immune Cell Reconstitution after Double Cord Blood Transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2015. **21**(7): p. 1284-90.
150. Guerin-El Khourouj, V., 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**(4): p. 476-85.
151. Matthes-Martin, S., 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**(6): p. 555-63.
152. Caruso Brown, A.E., et al., *Pharmacokinetics and safety of intravenous cidofovir for life-threatening viral infections in pediatric hematopoietic stem cell transplant recipients*. Antimicrob Agents Chemother, 2015. **59**(7): p. 3718-25.
153. Paolino, K., et al., *Eradication of disseminated adenovirus infection in a pediatric hematopoietic stem cell transplantation recipient using the novel antiviral agent CMX001*. J Clin Virol, 2011. **50**(2): p. 167-70.
154. Moss, P. and A. Rickinson, *Cellular immunotherapy for viral infection after HSC transplantation*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(1): p. 9-20.
155. Nakazawa, Y., et al., *Urinary excretion of ganciclovir contributes to improvement of adenovirus-associated hemorrhagic cystitis after allogeneic bone marrow transplantation*. Pediatr Transplant, 2009. **13**(5): p. 632-5.
156. Chen, F.E., et al., *Treatment of adenovirus-associated haemorrhagic cystitis with ganciclovir*. Bone Marrow Transplant, 1997. **20**(11): p. 997-9.
157. Ljungman, P., et al., *Cidofovir for adenovirus infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a survey by the Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2003. **31**(6): p. 481-6.
158. Neofytos, D., et al., *Treatment of adenovirus disease in stem cell transplant recipients with cidofovir*. Biol Blood Marrow Transplant, 2007. **13**(1): p. 74-81.

159. Kosulin, K., et al., *Intestinal Adenovirus Shedding Before Allogeneic Stem Cell Transplantation Is a Risk Factor for Invasive Infection Post-transplant*. EBioMedicine, 2018. **28**: p. 114-119.
160. Okada, M., et al., *Detection and sequence-based typing of human adenoviruses using sensitive universal primer sets for the hexon gene*. Arch Virol, 2007. **152**(1): p. 1-9.
161. Molina-Ortega, A., et al., *Impact of pretransplant CMV-specific T-cell immune response in the control of CMV infection after solid organ transplantation: a prospective cohort study*. Clin Microbiol Infect, 2019. **25**(6): p. 753-758.
162. Cheng, H.Y., C.C. Lin, and T.C. Lin, *Antiherpes simplex virus type 2 activity of casuarinin from the bark of Terminalia arjuna Linn*. Antiviral Res, 2002. **55**(3): p. 447-55.
163. Marrugal-Lorenzo, J.A., et al., *Repositioning salicylanilide anthelmintic drugs to treat adenovirus infections*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 17.
164. Reed, L.J. and H. Muench, *A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS*. American Journal of Epidemiology, 1938. **27**(3): p. 493-497.
165. Ying, B., et al., *Ganciclovir inhibits human adenovirus replication and pathogenicity in permissive immunosuppressed Syrian hamsters*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(12): p. 7171-81.
166. Cesaro, S., et al., *A survey on incidence and management of adenovirus infection after allogeneic HSCT*. Bone Marrow Transplant, 2018.
167. Chakrabarti, S., et al., *Adenovirus infections following allogeneic stem cell transplantation: incidence and outcome in relation to graft manipulation, immunosuppression, and immune recovery*. Blood, 2002. **100**(5): p. 1619-27.
168. Hiwarkar, P., et al., *Management of adenovirus infection in patients after haematopoietic stem cell transplantation: State-of-the-art and real-life current approach: A position statement on behalf of the Infectious Diseases Working Party of the European Society of Blood and Marrow Transplantation*. Rev Med Virol, 2018. **28**(3): p. e1980.
169. Kosulin, K., et al., *Diagnostic Parameters of Adenoviremia in Pediatric Stem Cell Transplant Recipients*. Front Microbiol, 2019. **10**: p. 414.
170. Piatti, G., *Pre-Transplant Screening for Latent Adenovirus in Donors and Recipients*. Open Microbiol J, 2016. **10**: p. 4-11.

171. La Rosa, A.M., et al., *Adenovirus infections in adult recipients of blood and marrow transplants*. Clin Infect Dis, 2001. **32**(6): p. 871-6.
172. Ip, W., et al., *Multicenter phase 1/2 application of adenovirus-specific T cells in high-risk pediatric patients after allogeneic stem cell transplantation*. Cytotherapy, 2018. **20**(6): p. 830-838.
173. Lee, Y.J., S.E. Prockop, and G.A. Papanicolaou, *Approach to adenovirus infections in the setting of hematopoietic cell transplantation*. Curr Opin Infect Dis, 2017. **30**(4): p. 377-387.
174. Gonzalez-Vicent, M., et al., *Current practices in the management of adenovirus infection in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients in Europe: The AdVance study*. Eur J Haematol, 2019. **102**(3): p. 210-217.
175. Sedlacek, P., et al., *Incidence of Adenovirus Infection in Hematopoietic Stem Cell Transplantation Recipients: Findings from the AdVance Study*. Biol Blood Marrow Transplant, 2019. **25**(4): p. 810-818.
176. Kit, S., K. Nakajima, and D.R. Dubbs, *Origin of thymidine kinase in adenovirus-infected human cell lines*. J Virol, 1970. **5**(4): p. 446-50.
177. Cheetham, B.F., D.C. Shaw, and A.J. Bellett, *Adenovirus type 5 induces progression of quiescent rat cells into S phase without polyamine accumulation*. Mol Cell Biol, 1982. **2**(10): p. 1295-8.