



TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Biotecnología

**Caracterización de la respuesta inmunológica
desarrollada en pacientes oncohematológicos,
tras recibir dos dosis de la vacuna frente al
SARS-CoV-2**

Autora: MIRIAM SOLERA SAINERO

Villaviciosa de Odón, *Julio 2022.*

Título del Trabajo: Caracterización de la respuesta inmunológica desarrollada en pacientes oncohematológicos, tras recibir dos dosis de la vacuna frente al SARS-CoV-2.

Este trabajo ha sido realizado en el Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III, en el grupo de Inmunopatología del SIDA liderado por María Teresa Coiras López.



Tutor/es: Sara Rodríguez Mora y Manuel Olazábal Morán.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 Los coronavirus	7
1.2 SARS-CoV-2.....	8
1.3 Patogenia de la infección por SARS-CoV-2.....	8
1.4 Vacunas contra el SARS-CoV-2	10
1.5 Grupos de población vulnerables a la COVID-19: pacientes con enfermedades oncohematológicas	11
1.5.1 Leucemia Mieloide Crónica	11
1.5.2 Mieloma Múltiple.....	13
1.6 SARS-CoV-2 y pacientes con EOH.....	15
1.7 Evaluación de la respuesta inmunológica	15
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1 Líneas celulares	17
3.2 Medios de cultivo	17
3.3 Generación del SARS-CoV-2 pseudotipado	18
3.4 Anticuerpos y análisis por citometría de flujo.....	18
3.5 Poblaciones de estudio	19
3.6 Aislamiento de linfocitos de muestras de sangre de pacientes mediante <i>Buffy coat</i>	20
3.7 Caracterización de la respuesta humoral.....	20
3.7.1 Serología SARS-CoV-2.....	20
3.7.2 Ensayo de neutralización.....	21
3.8 Caracterización de la respuesta celular.....	21
3.8.1 Ensayo de ADCC	21
3.8.2 Ensayo DCC.....	22
3.9 Caracterización de las poblaciones celulares.....	23
3.10 Análisis estadístico	23
4. RESULTADOS	24
4.1 Participantes en el estudio.....	24
4.2 Caracterización de la respuesta humoral.....	25
4.2.1 Análisis serológico antes y después de la vacunación contra el SARS-CoV-2	25
4.2.2 Niveles de linfocitos B post-vacunales contra el SARS-CoV-2	26
4.3 Caracterización de la respuesta celular.....	27
4.3.1 Análisis de la ADCC.....	27

4.3.2 Análisis de la DCC	32
5. DISCUSIÓN.....	37
6. CONCLUSIONES	41
7. BIBLIOGRAFÍA	42
8. ANEXO I. Estrategia de gateo para citometría de flujo	46
9. ANEXO II. Características sociodemográficas de los participantes en el estudio	48
10. ANEXO III. Sostenibilidad social.....	50
11. ANEXO IV. Agradecimientos.....	50

RESUMEN

Los pacientes con enfermedades oncohematológicas, como la leucemia mieloide crónica (LMC) y el mieloma múltiple (MM), han sido excluidos de los ensayos clínicos para evaluar la respuesta que provocan las vacunas contra el SARS-CoV-2. Aunque existen algunos estudios realizados con estos pacientes, se centran en analizar la respuesta humoral, sin evaluar la respuesta celular, que podría ser determinante frente a la infección. En este estudio se ha evaluado la respuesta inmunológica frente al SARS-CoV-2 en pacientes LMC (n=23) y MM (n=19), antes de la vacunación y tres semanas después de que reciban la segunda dosis, en comparación con donantes sanos (n=10).

Para analizar la respuesta humoral, se realizaron pruebas serológicas y se cuantificó el porcentaje de linfocitos B presentes en las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de las muestras de los grupos de estudio. Por otro lado, para evaluar la respuesta celular se realizaron estudios de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) utilizando células Raji como diana de las PBMCs, cuantificando la inducción de apoptosis mediante anexina V y caracterizando las subpoblaciones de las PBMCs mediante citometría de flujo. También se determinó la citotoxicidad celular directa (DCC) frente a células VERO E6 infectadas con SARS-CoV-2 pseudotipado, midiendo la activación de Caspasa-3 y caracterizando las subpoblaciones de las PBMCs mediante citometría de flujo.

Los resultados de este estudio sugieren que las vacunas contra el SARS-CoV-2 provocan mayoritariamente la generación de anticuerpos (respuesta humoral), y no parece tener un efecto determinante en la respuesta celular. A pesar de que los Linfocitos T CD8+ y TCR $\gamma\delta$ + si podrían mejorar la respuesta producida por la vacuna en los pacientes con MM, es probable que estos niveles estuviesen aumentados debido a la enfermedad y al tratamiento que reciben, y no a la presencia de la vacuna contra el SARS-CoV-2.

PALABRAS CLAVE: Leucemia mieloide crónica, mieloma múltiple, vacunas, SARS-CoV-2, respuesta inmunológica celular, respuesta inmunológica humoral.

ABSTRACT

Patients with oncohematological diseases, such as chronic myeloid leukemia (CML) and multiple myeloma (MM), have been excluded from clinical trials to assess the response caused by vaccines against SARS-CoV-2. Although there are some studies carried out with these patients, these are focused on analyzing the humoral response, without evaluating the cellular response, which could be decisive against infection. In this study, the immune response against SARS-CoV-2 has been evaluated in CML (n=23) and MM (n=19) patients, before vaccination and three weeks after receiving the second dose, compared to healthy donors (n=10).

To analyze the humoral response, serological tests were performed and the percentage of B lymphocytes present in the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of the samples was quantified. To evaluate the cellular response, antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) studies were carried using Raji cells as the target of PBMCs, quantifying the induction of apoptosis by annexin V and characterizing the PBMCs subpopulations by flow cytometry. Direct cellular cytotoxicity (DCC) against VERO E6 cells infected with pseudotyped SARS-CoV-2 was also determined by measuring Caspase-3 activation and characterizing PBMCs subpopulations by flow cytometry.

The results of this study suggest that SARS-CoV-2 vaccines mainly cause the generation of antibodies (humoral response), and do not seem to have a determining effect on the cellular response. Although CD8⁺ T lymphocytes and TCR $\gamma\delta$ ⁺ could improve the response produced by the vaccine in patients with MM, it is likely that these levels were increased due to the disease and the treatment received, and not due to the presence of the vaccine against SARS-CoV-2.

KEY WORDS: Chronic myeloid leukemia, multiple myeloma, SARS-CoV-2, vaccines, cellular immune response, humoral immune response.

GLOSARIO

ACE2: gen que contiene la información necesaria para producir la enzima convertidora de angiotensina 2.

ACE2: enzima convertidora de angiotensina 2.

ADCC: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

CD107a: marcador de superficie que muestra la desgranulación celular, necesario para producir citotoxicidad.

CD19: marcador de superficie para determinar el porcentaje total de linfocitos B en citometría de flujo.

CD3: marcador de superficie para determinar el porcentaje total de linfocitos T en citometría de flujo.

CD3+CD56+: marcadores de superficie para determinar el porcentaje de NKTs en citometría de flujo.

CD3+CD8+: marcadores de superficie para determinar el porcentaje de linfocitos T citotóxicos en citometría de flujo.

CD3-CD56+: marcadores de superficie para determinar el porcentaje de NKs en citometría de flujo.

DCC: citotoxicidad celular directa.

EOH: enfermedades oncohematológicas.

IgG: Inmunoglobulina G. Esta proteína es una de las cinco clases de anticuerpos humorales que desarrolla el organismo cuando entra en contacto con un antígeno. Las IgG son el anticuerpo mayoritario del organismo, pudiendo alcanzar valores del 80% del total de anticuerpos. Su medición se utiliza para determinar la inmunidad serológica.

ITK: inhibidores de tirosina-kinasas.

LMC: Leucemia Mieloide Crónica.

MM: Mieloma Múltiple.

NK: células *Natural Killer*, que producen una respuesta citotóxica frente a las células infectadas.

NKT: linfocitos T Natural Killer. Este tipo de células son una combinación entre los linfocitos T y las células NK, por lo que generan una respuesta inmunológica tanto innata como adaptativa.

PBMCs: células monoclonales de sangre periférica.

Rituximab: anticuerpo monoclonal que reconocen las células Raji (por presentar el receptor CD19) para generar una respuesta celular citotóxica mediada por anticuerpos.

RLU: unidad relativa de luz.

SEM: error estándar de la media.

TCR $\gamma\delta$: marcador de superficie para determinar el porcentaje de linfocitos T que presentan en sus receptores las cadenas γ (gamma) y δ (delta).

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Los coronavirus

Los coronavirus son virus con genoma de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva, que pertenecen a la subfamilia *Orthocoronavirinae*, en la familia *Coronaviridae*, orden *Nidovirales* y reino *Riboviria* (1). Estos virus pertenecen al género *Betacoronavirus* (2), capaz de infectar células de mamíferos. Son virus con envuelta cuyo genoma es un ARN monocatenario de cadena positiva (ARNm+) que presentan una cápside esférica con simetría helicoidal. Son una familia de virus caracterizada por tener una morfología similar a una corona, producida por unas estructuras abultadas denominadas espículas virales o peplómeros que forman parte de la proteína espicular o *spike* (S).

Estos virus están constituidos por cuatro proteínas estructurales (Figura 1):

- La proteína de la nucleocápside (N): forma la cápside helicoidal que engloba el genoma del virus. Las funciones de la proteína N incluyen la replicación y transcripción del ARN viral, y su presencia es fundamental para mantener la estructura del genoma (3). Además, esta proteína está involucrada en la interacción célula huésped-virus, modulando en esta el ciclo celular, incluida la apoptosis, para facilitar la multiplicación y propagación del virus (4).
- Toda la estructura está rodeada por una envuelta, formada por una bicapa lipídica y las proteínas S (*spike*), E (*envelope*) y M (*membrane*) (5). Las proteínas de la membrana y la envuelta son necesarias para el ensamblaje del virus, mientras que la proteína S es necesaria para la entrada del virus y el reconocimiento de la célula huésped, confiriendo especificidad al virión (6). La proteína S está formada por dos dominios funcionales: el dominio subunidad 1 (S1) y un tallo trimérico (S2).

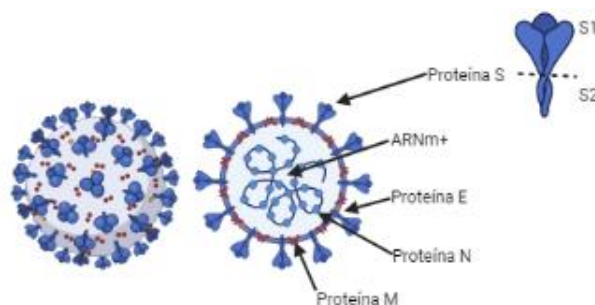


Figura 1 | Estructura general de los coronavirus. Realizado con la aplicación BioRender. Adaptado de (7).

Hasta el 2019, se reportaron varios procesos infectivos de coronavirus, entre los que destacan el brote de síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV, 2002) y el síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV, 2012). Ambas situaciones se consideraron un problema general de salud pública (8).

1.2 SARS-CoV-2

A finales de 2019 se reportaron en Wuhan, China, los primeros casos de un tipo de neumonía de origen desconocido (9). Se secuenció el genoma de este patógeno y se descubrió que compartía un 79,6% de homología con el SARS-CoV y un 96% con un coronavirus del murciélago *Rhinolophus affinis*, (BatCoV RaTG13) (10). A este nuevo coronavirus se le denominó SARS-CoV-2, y a la enfermedad que causa, COVID-19 (*Coronavirus Disease 2019*).

El SARS-CoV-2 se expandió rápidamente por la mayoría de territorios del mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS), declaró la alerta por Emergencia de Salud Pública de Importancia Internacional (ESPII o PHEIC en inglés) el 30 de enero de 2020 (9). El 11 de marzo del 2020, la OMS declaró al SARS-CoV-2 como pandemia, con más de 100.000 casos reportados de infección y 4.000 muertes hasta el momento (11).

Actualmente, la pandemia continúa siendo un problema de salud pública, con más de 447 millones de casos confirmados y 6 millones de muertes en todo el mundo, según la Asociación Americana de Microbiología (*American Society for Microbiology, ASM*).

La infección por SARS-CoV-2 está dirigida a determinados tipos de células y órganos diana, los cuales expresan el gen de la enzima convertidora de angiotensina 2 (*ACE2*). El receptor ACE2 está presente en las membranas celulares de múltiples órganos, incluidos los pulmones, las arterias, los riñones, el corazón y los intestinos (12–14). Además, la alta expresión de *ACE2* en el transcriptoma de la mucosa de la cavidad oral probablemente facilite las rutas de entrada del SARS-CoV-2 (15).

1.3 Patogenia de la infección por SARS-CoV-2

El proceso infectivo del SARS-CoV-2 comienza con la interacción de la región S1 de la proteína S del virus con el receptor ACE2 de las células diana (16). El S1 de la proteína S presenta dos dominios, el dominio N-terminal (NTD) y dominio C-terminal (CTD) (17). El S1-CTD actúa como un dominio de unión al receptor (*receptor binding domain, RBD*),

que reconoce de manera específica el receptor ACE2 para infectar a las células diana (17). S2 se activa por la proteasa transmembrana de serina 2 asociada a la superficie del huésped (TMPRSS29) (18).

La combinación de los dos procesos mediados por S1 y S2 provocan la fusión de la envuelta del virus con la membrana de la célula diana, y la consecuente liberación del genoma del virus en el citoplasma (17). Además, el virus tiene la capacidad de utilizar la maquinaria de la célula huésped para traducir proteasas virales y otras proteínas no estructurales (Figura 2). Mediante este proceso, se forma el complejo de replicación que, junto con la ARN polimerasa dependiente de ARN, sintetiza una hebra de ARN de polaridad negativa, que se utiliza para producir más copias de ARN+. Dichas copias permiten sintetizar proteínas estructurales y otros tipos de proteínas no esenciales para la replicación (19). Una vez se lleva a cabo este proceso, las proteínas interactúan con el ARN+ viral en un compartimento del citoplasma celular denominado compartimento intermedio del retículo endoplásmico-Golgi (ERGIC). La encapsidación se produce en la misma localización, fragmentando las membranas del aparato de Golgi que utilizan los virus para ensamblarse. Por último, los virus son secretados al medio extracelular por exocitosis y empiezan un nuevo ciclo infeccioso (2).

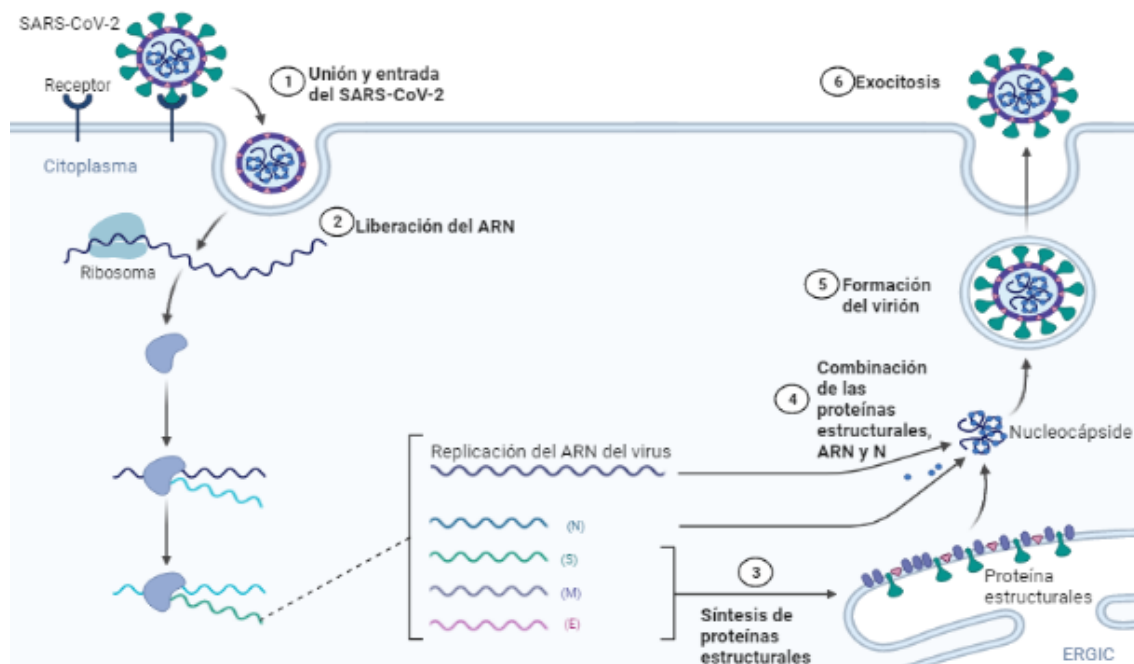


Figura 2| Ciclo infeccioso del SARS-CoV-2. 1) Entrada en la célula diana. 2) Liberación del ARN viral. 3) Síntesis de las proteínas estructurales. 4) Combinación de todos los elementos sintetizados. 5) Formación del virión. 6) Exocitosis. Realizado con la aplicación BioRender. Adaptación de (7).

1.4 Vacunas contra el SARS-CoV-2

Debido a la necesidad de la obtención de una vacuna como medida de prevención y al solapamiento de varias etapas en la producción de las mismas, las vacunas se regularon y comercializaron en tiempo récord, facilitando así la vacunación masiva con el objetivo de reducir los contagios.

Se han desarrollado numerosas vacunas contra el SARS-CoV-2 mediante diversas estrategias, aunque con un objetivo común: promover una respuesta inmunológica adaptativa y producir memoria a través de la generación de anticuerpos. Actualmente, se pueden diferenciar dos tipos de vacunas (Figura 3):

- **Basadas en ARNm:** en este grupo se incluyen las vacunas BNT162b2 ARNm COVID-19 (Pfizer-BioNTech) y mRNA-1273 (Moderna). Este tipo de vacunas se basan en incluir el ARNm de la proteína S del virus con un coadyuvante para que se introduzca el material genético en las células. Una vez se produce la proteína, el sistema inmunológico la reconoce como un patógeno y genera una respuesta inmunológica contra la misma. Si después de la vacunación se produce la infección por COVID-19, el organismo ha generado los anticuerpos necesarios para combatir el virus. Ambas vacunas presentan una efectividad superior al 90% según los ensayos realizados en individuos sanos (20,21). Son vacunas muy seguras, ya que el ARNm no se integra en el núcleo de las células.
- **Basadas en vectores virales:** es el caso de las vacunas JNJ-78436735 (*Janssen Pharmaceuticals Companies of Johnson & Johnson*) y ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222; Oxford-AstraZeneca), cuya efectividad es del 70% (22). En este caso, las vacunas contienen ADN, concretamente el gen que produce la proteína S del SARS-CoV-2. Este ADN se introduce en un vector viral, generalmente un adenovirus, modificado para que infecte a las células diana, pero sin que tenga la capacidad de replicarse. De esta manera, las células producen copias de la proteína S para favorecer una respuesta inmunológica en el organismo y la generación de anticuerpos, que actuarán más rápido si se produce una infección.

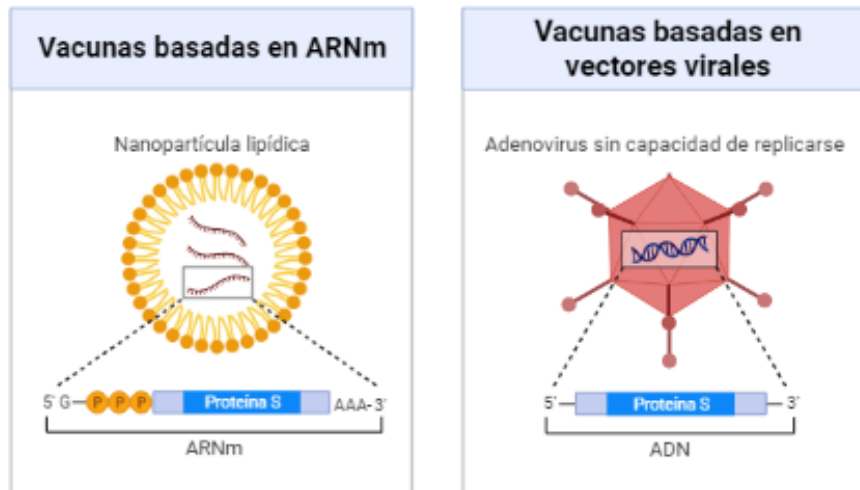


Figura 3| Representación del contenido de las vacunas contra el SARS-CoV-2 basadas en ARNm (A) y basadas en vectores virales (B). Realizado con la aplicación BioRender. Adaptación de una de las plantillas disponibles, sujeta a licencia Creative Commons.

1.5 Grupos de población vulnerables a la COVID-19: pacientes con enfermedades oncohematológicas

Uno de los grupos de población más afectados por esta pandemia es el formado por los pacientes que presentan un estado de salud que compromete el correcto funcionamiento del sistema inmunológico.

Las enfermedades oncohematológicas (EOH) son un grupo de enfermedades neoplásicas que afectan a las células plasmáticas, causando detrimento en la salud física y psicológica. Los pacientes EOH tienen un alto riesgo de desarrollar complicaciones graves por la COVID-19, con una tasa de mortalidad estimada superior al 30% (23,24), principalmente debido a la inmunosupresión causada por su enfermedad y los tratamientos que reciben. Forman parte de las hemopatías malignas las leucemias agudas y los síndromes mielodisplásicos. En este último, se distinguen los síndromes mieloproliferativos crónicos, los síndromes linfoproliferativos y las gammopatías monoclonales (25).

1.5.1 Leucemia Mieloide Crónica

La leucemia mieloide crónica (LMC) es un síndrome mieloproliferativo crónico que se caracteriza por un crecimiento anormal de glóbulos blancos tumorales. La LMC es producida por una mutación espontánea en los genes *BCR* (cromosoma 22) y *ABL* (cromosoma 9), que intercambian material genético (translocación), dando como resultado el oncogén *BCR-ABL*, que se codifica en el denominado cromosoma Filadelfia

(Ph) (26) (Figura 4). Debido a este intercambio, las células madre hematopoyéticas de la médula ósea presentan un crecimiento incontrolado, por lo que eventualmente sustituyen a las células normales y se producen cantidades excesivas de granulocitos, que invaden y dañan los tejidos (27).

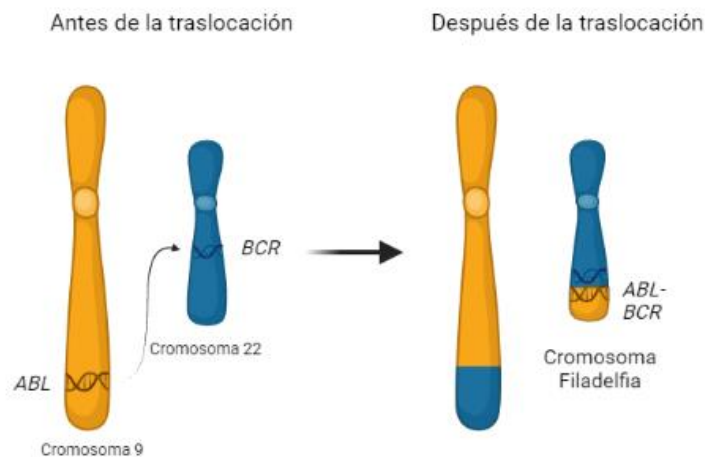


Figura 4| Representación de la traslocación que padecen los pacientes con LMC, con la generación del cromosoma Filadelfia. Elaboración propia utilizando BioRender. Adaptado de Mayo Foundation for Medical Education and Research (MFMER)

Esta enfermedad es de progresión lenta, y se suele diagnosticar tras una presencia elevada de leucocitos en un análisis de sangre rutinario, asociado a otras pruebas que confirmen la sospecha de LMC, como un tamaño excesivo del bazo (28). Además, se realizan estudios con muestras de médula ósea para descartar otras patologías. Generalmente, el diagnóstico de la enfermedad se estipula cuando el paciente no presenta síntomas y el número de células anormales representa menos del 10%. Esta fase puede alargarse un tiempo variable, normalmente varios años, permitiendo al paciente realizar vida normal. Sin embargo, la enfermedad evoluciona a una fase más agresiva, denominada fase acelerada, en la que el paciente puede comenzar a tener síntomas como cansancio, anemia, sudoración o malestar general (29).

El tratamiento actual que se suministra a estos pacientes pertenece a la primera línea de inhibidores de tirosina-kinasas (ITKs) con diana en BCR-ABL. Los ITKs son un grupo de fármacos cuya función consiste en eliminar las células que presenten esta mutación sin afectar a las células normales (30). El objetivo es destruir por completo estas células malignas, tanto de la médula ósea como de la sangre, y repoblar la médula ósea con células madre hematopoyéticas normales. Este grupo de medicamentos se administran

por vía oral y son altamente eficaces en la fase crónica de la enfermedad, provocando menos efectos secundarios que otros tratamientos (31). Actualmente los fármacos de primera línea administrados para estos pacientes con LMC son imatinib, dasatinib y nilotinib, así como otros fármacos de generaciones más avanzadas como bosutinib, ponatinib y asciminib (32).

Pese a la efectividad de los ITKs, su capacidad de erradicar la enfermedad no está confirmada, por lo que el tratamiento no se puede interrumpir sin un motivo justificado. Hay estudios clínicos (33–35) que están evaluando la interrupción del tratamiento en pacientes que han presentado una excelente respuesta al mismo, aunque por el momento, el único tratamiento con capacidad curativa demostrada es el trasplante de médula ósea alogénico. Tras un periodo largo después del trasplante, los pacientes con LMC pueden dejar el tratamiento con ITKs y aproximadamente el 50% de ellos consiguen mantener la respuesta antileucémica frente a las células tumorales residuales en ausencia de ITKs (36).

Los efectos secundarios son menores que con otros tratamientos, pero hay que considerar que estos podrían aumentar el riesgo de padecer COVID-19 de forma grave o crítica. Entre otros se encuentran:

- Neutropenia al comienzo del tratamiento: disminución del número de granulocitos, por lo que la respuesta inmunológica podría verse comprometida frente a una infección.
- Problemas pulmonares que pueden agravar los causados por el SARS-CoV-2.

1.5.2 Mieloma Múltiple

El mieloma múltiple (MM) es una enfermedad neoplásica de la sangre que se caracteriza por la proliferación descontrolada de las células plasmáticas, una subpoblación de linfocitos B encargada de la secreción de anticuerpos en grandes cantidades (37). La transformación de las células plasmáticas en células malignas es debida a la adquisición de diversas mutaciones, que las llevan a generar un tipo de inmunoglobulinas no funcionales denominadas paraproteínas (38) (Figura 5). Además, las células plasmáticas malignas impiden la proliferación de las células plasmáticas normales y la generación de otro tipo de anticuerpos (39). Debido a estos eventos, los pacientes que padecen esta

enfermedad son más propensos a tener infecciones. Aunque existen varios factores de riesgo a considerar, se desconocen las causas exactas de aparición del MM.

El MM se desarrolla de manera diferente en cada paciente, por lo que se necesitan varias pruebas diagnósticas para detectarlo (40). Estas pruebas también ayudan a encontrar el tratamiento más eficaz contra la enfermedad. Los problemas más comunes en el momento del diagnóstico se relacionan con la acumulación de las paraproteínas en la sangre u orina y el crecimiento anormal de las células del mieloma en la médula. Sus síntomas asociados más relevantes son: dolor óseo, bajo recuento sanguíneo, hipercalcemia, problemas renales e infecciones recurrentes (41).

Uno de los tratamientos más comunes es el trasplante autólogo de células madre, que consiste en obtener células madre sanas del propio paciente y aplicar quimioterapia de alta dosis para eliminar las células plasmáticas defectuosas (42). Posteriormente, las células madre del paciente se trasplantan para que generen células plasmáticas sanas. Con este método se puede alcanzar una recuperación completa en dos semanas, aunque los pacientes suelen permanecer ingresados aproximadamente cuatro semanas por el riesgo de infección y los efectos secundarios de la quimioterapia (43).

Este tratamiento presenta ventajas muy notables, pero la toxicidad de la quimioterapia es considerablemente elevada y el riesgo de infecciones es significativo. Además, podría ocurrir una recaída, por lo que estos pacientes a menudo reciben un tratamiento de mantenimiento tras el trasplante, que frecuentemente consiste en administrar lenalidomida (44), un principio activo que ejerce su acción estimulando el sistema inmunológico. Aunque sus efectos son muy positivos para el tratamiento del MM, podrían aumentar el riesgo de padecer la COVID-19 de una manera más agresiva porque provoca una respuesta inmunológica exacerbada (45).

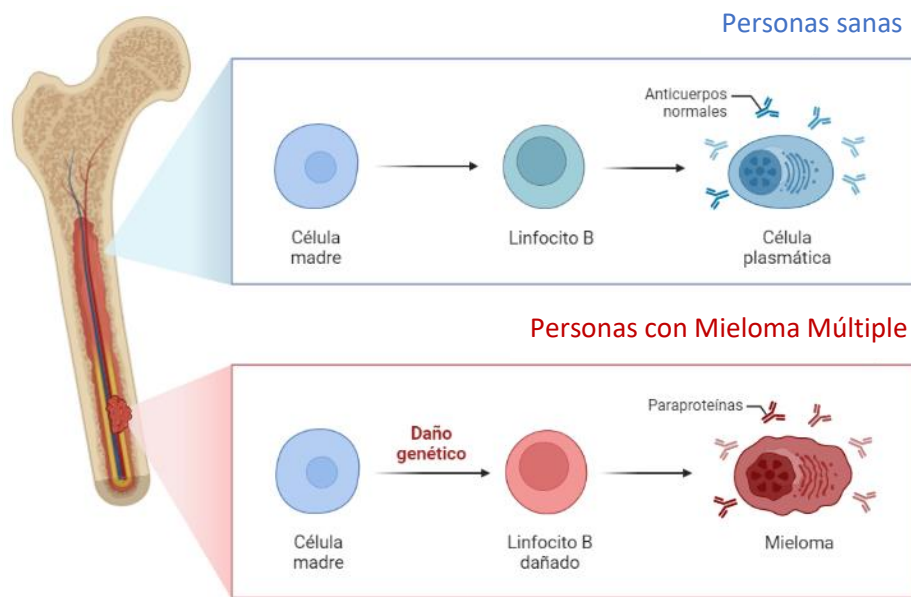


Figura 5| Diferencias entre la diferenciación de las células madre normales y la sufrida por los pacientes con MM. Realizado con la aplicación BioRender, Adaptado de (38).

1.6 SARS-CoV-2 y pacientes con EOH

Los pacientes que presentan una EOH son más propensos a padecer la COVID-19 de una manera agresiva, debido principalmente a que las EOH comprometen el correcto funcionamiento del sistema inmunológico y los tratamientos suelen ser agresivos, aumentando las probabilidades de que la infección tenga un curso más grave (46).

Es por ello que se priorizó la vacunación de estos pacientes frente al SARS-CoV-2, aunque los ensayos clínicos que aprobaron las vacunas excluyeron a los pacientes inmunocomprometidos. Por este motivo, se desconoce la eficacia de la vacunación en pacientes oncohematológicos con vacunas frente al SARS-CoV-2, pero se espera que, aunque esta respuesta se viera alterada como ocurre con otras vacunas estudiadas en diferentes EOH (22,47) supusiese una mejora significativa si padecen COVID-19.

1.7 Evaluación de la respuesta inmunológica

El sistema inmunológico es el sistema que se encarga de producir una respuesta frente a un agente patológico, como puede ser una infección por SARS-CoV-2. Para ello, utiliza dos tipos de respuestas:

- Respuesta humoral: producida por las células plasmáticas, generadas a partir de los linfocitos B, en la que se generan anticuerpos que actúan frente al patógeno.

- Respuesta celular: producida principalmente por los Linfocitos T (respuesta adaptativa) y las *Natural Killer* (NK, respuesta innata). Estas células producen una respuesta citotóxica que provoca la muerte de las células infectadas. Dentro de este tipo de respuesta, se distinguen dos clases:
 - Citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC): las células infectadas exponen antígenos del patógeno en su superficie para que sean reconocidos por anticuerpos específicos, que recubren a las células y son reconocidos por las células citotóxicas NK. De este modo, células que pertenecen al sistema inmunológico innato, y por lo tanto son inespecíficas, pueden destruir específicamente las células infectadas mediante el reconocimiento de anticuerpos.
 - Citotoxicidad celular directa (DCC): las células citotóxicas reconocen los antígenos presentes en las células infectadas y las atacan para eliminarlas.

La mayoría de los estudios sobre la respuesta inmunológica desarrollados en individuos con EOH se han centrado en la respuesta humoral, sin relacionar esta respuesta con la respuesta celular, la cual es esencial para controlar la infección por SARS-CoV-2 y evitar la enfermedad grave (48). Con frecuencia se practican pruebas serológicas, que son útiles para conocer el estado de la inmunidad humoral, pero no son un indicativo específico de infección, ya que un resultado de inmunoglobulina G (IgG) positivo podría persistir meses sin que se produzca una carga viral detectable.

Es importante valorar tanto la respuesta humoral como la respuesta celular porque el SARS-CoV-2 es un patógeno intracitoplasmático. Por tanto, la respuesta de defensa del organismo es la citotoxicidad, llevada a cabo por las NK (49) y los linfocitos T (50). A su vez, los linfocitos T *helper* coordinan la respuesta humoral, ya que promueven que los linfocitos B desarrollen anticuerpos que puedan bloquear la entrada del virus a las células (51). Estos anticuerpos actúan como neutralizantes, pero no eliminan la infección, solo bloquean la propagación y eliminan el virus en los espacios extracelulares.

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo ha consistido en analizar la respuesta inmunológica de pacientes con EOH antes y 3 semanas después de recibir la pauta de dos dosis de vacunación frente al SARS-CoV-2, en comparación con la respuesta desarrollada en donantes sanos.

Objetivos secundarios:

1. Analizar la respuesta humoral de las células de sangre periférica de los pacientes con LMC o MM 3 semanas después de recibir dos dosis de una vacuna frente al SARS-CoV-2.
2. Analizar la respuesta celular DCC y ADCC de las células de sangre periférica de los pacientes con LMC o MM 3 semanas después de recibir dos dosis de una vacuna frente al SARS-CoV-2.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Líneas celulares

Se han utilizado diversas líneas celulares:

- Línea epitelial de riñón de mono verde VERO E6 (ECACC 85020206). Donada por el Dr. Antonio Alcamí (CBM Severo Ochoa, Madrid).
- Línea humana de linfoma Raji (ATCC CCL-86). Proporcionada por la colección existente del Instituto de Salud Carlos III (Madrid, España).
- Línea humana de células *Natural Killer* NKL (PTA-6967). Se utilizó como control interno en todos los experimentos.

Todas las células se mantuvieron en condiciones estándar de cultivos celulares: 5% CO₂, 37 °C, 95% de humedad.

3.2 Medios de cultivo

- *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) suplementado con suero bovino fetal (FCS) al 10 %, L-glutamina 2 mM y 100 unidades/ml de penicilina/estreptomicina (Lonza, Basilea, Suiza). Este medio se utilizó en el cultivo de las células Raji y NKL, que crecen en suspensión, y expresan el receptor de superficie CD19, analizado en la respuesta celular ADCC.

- *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado con FCS al 10 %, L-glutamina 2 mM y 100 unidades/ml de penicilina/estreptomicina (Lonza, Basilea, Suiza). Este medio se utilizó en el cultivo de las células VERO E6, que crecen adheridas formando una monocapa y expresan el receptor ACE2, diana del SARS-CoV-2 el cual fue analizado en la respuesta células DCC.

3.3 Generación del SARS-CoV-2 pseudotipado

El sobrenadante infeccioso del virus SARS-CoV-2 pseudotipado fue obtenido a partir de la transfección con fosfato de calcio de células HEK293T (proporcionadas por la colección del Instituto de Salud Carlos III) con el plásmido pNL4-3Δenv_SARS-CoV-2-SΔ19(G614) _Ren pJR-FL-Renilla, el cual contiene gen de la luciferasa de *Renilla* como reportero (52) y la proteína S (D614G) del SARS-CoV-2.

3.4 Anticuerpos y análisis por citometría de flujo

Se realizaron diferentes marcajes para analizar las poblaciones celulares de los linfocitos de sangre periférica (*peripheral blood mononuclear cell*, PBMCs), las células Raji y las células Vero. Los anticuerpos se obtuvieron de la casa comercial BD Biosciences (San José, CA) (Tabla 1). La adquisición de datos se realizó en un citómetro de flujo BD LSRFortessa X-20 con el software FACS Diva (BD Biosciences, San Jose, CA) y el análisis de los resultados se realizó mediante el software FlowJo (TreeStar).

	Anticuerpo	Fluorocromo
Marcaje PBMCs	CD3	PE
	CD19	BV711
Marcaje Raji	CD3	BV510
	CD8	APC-H7
	TCRγδ	PE
	CD107a	PECy7
	CD56	Bv605
Marcaje VERO E6	CD3	PE
	CD8	APC-H7
	TCRγδ	FITC
	CD107a	PECy7
	CD56	Bv605

Tabla 1| Descripción de los anticuerpos y los fluorocromos utilizados para el análisis de las poblaciones celulares de PBMCs, células Raji y células Vero mediante citometría de flujo.

3.5 Poblaciones de estudio

Se obtuvieron 23 muestras de sangre de pacientes con LMC y 19 muestras de sangre de pacientes con MM, todas ellas reclutadas en el Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Universitario Ramón y Cajal entre febrero y abril de 2021. Todos los pacientes eran mayores de 18 años, no presentaban COVID-19 al inicio del estudio y estaban vacunados a través del Sistema de Vacunación Española. Además, como grupo control, se reclutaron 10 voluntarios sanos que donaron sangre en el Centro de Transfusiones de Madrid, entre abril y julio de 2021. Todos eran mayores de 18 años, no habían padecido COVID-19 anteriormente y se vacunaron a través del Sistema de Vacunación Española. El programa de dos dosis de las vacunas aprobadas en ese momento para estos pacientes era: COMINARTY (BNT162b2, BioNTech-Pfizer), Spikevax (mARN-1273, Moderna) o Vaxzevria (AZD1222, AstraZeneca).

Se obtuvieron muestras de sangre de todos los pacientes participantes en el estudio antes de la vacunación y 3 semanas después de recibir la segunda dosis de la vacuna. La segunda muestra se obtuvo entre mayo y agosto de 2021 para los pacientes oncohematológicos y entre mayo y septiembre en el caso de los voluntarios sanos.

Se determinó la ausencia de infección por SARS-CoV-2 previa a la vacunación en todos los participantes (donantes sanos, pacientes LMC y pacientes MM) mediante serología basal frente a la COVID-19 en la primera muestra de sangre para descartar infección asintomática.

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario Ramón y Cajal (informe favorable número 053-21) y todas las personas dieron su consentimiento informado por escrito para participar de acuerdo con la declaración de Helsinki. Así mismo, la confidencialidad y el anonimato están protegidos por las Leyes de Protección de Datos española y europea vigentes.

3.6 Aislamiento de linfocitos de muestras de sangre de pacientes mediante *Buffy coat*

Las PBMCs fueron aisladas de las muestras de sangre periférica a través de un gradiente Ficoll-Hypaque (Pharmacia Corporation, North Peapack, NJ) en proporción 1:1 y centrifugadas a 1800 rpm durante 35 minutos. El plasma fue recuperado y congelado a -80°C para su posterior análisis y las PBMCs fueron aisladas de la capa intermedia, lavadas con tampón fosfato salino (PBS 1x) y criopreservadas en nitrógeno líquido CryoPlus 3 (Thermo Scientific), utilizando suero bovino fetal (FBS) suplementado con 10% de dimetil sulfóxido (DMSO), hasta el momento del análisis.

3.7 Caracterización de la respuesta humoral

3.7.1 Serología SARS-CoV-2

Para medir las IgG contra la proteína S del SARS-CoV-2 se utilizó el plasma criopreservado de todos los individuos incluidos en el estudio. Se realizó un ensayo ELISA Euroimmun Anti-SARS-CoV-2 (Euroimmun, Lübeck, Alemania). Una vez descongelados, los plasmas se diluyeron en proporción 1:101 con el buffer tampón de muestra y se incubaron durante 60 minutos a 37°C en placas multipocillo. Después, las muestras se lavaron con tampón de lavado y se incubaron con anticuerpos anti-IgG humana conjugados a peroxidasa durante 30 minutos a 37°C. Tras ello, se realizó un último lavado y para la detección de IgG se añadió el sustrato de la peroxidasa durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se paró la reacción con solución de parada y se midieron los resultados con una medición fotométrica a 450nm. Los resultados se analizaron con el software EUROLabWorkstation ELISA y la interpretación de los resultados se realizó de manera semicuantitativa, calculando un ratio de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\frac{\textit{Extinción del control o la muestra del individuo}}{\textit{Extinción del calibrador}} = \textit{Ratio}$$

La casa comercial Euroinmmun recomienda interpretar las muestras como positivas con un título superior a 1,1; indeterminadas con valores entre 0,8 y 1,1; y negativos cuando los valores IgG <0,8.

3.7.2 Ensayo de neutralización

Tras analizar los valores de IgG, se procedió a la cuantificación de la actividad de neutralización del plasma en aquellas muestras con un título de IgG positivo (ratio >1,1). Dichas muestras fueron previamente descomplementadas a 56°C durante 45 minutos y, posteriormente, se realizó una preincubación a 37 °C durante una 1 hora con el pseudovirus (10 ng p24 Gag por pocillo) en 4 diluciones en serie (1/32 a 1/8192) para determinar a qué titulación se obtiene la neutralización. A continuación, esta mezcla se añadió a un cultivo de células VERO E6 y se incubó durante 48 horas. Posteriormente, se lisaron las células VERO E6 con buffer de lisis de *Renilla* durante 10 minutos a 4°C y luego se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 minutos. Después, se evaluó la infectividad viral midiendo la actividad de la luciferasa de *Renilla* (*Renilla Luciferase Assay*, Promega, Madison, WI) a 280 nm en los lisados celulares.

Los títulos de anticuerpos neutralizantes se representaron como una dosis inhibitoria del 50% (NT50) utilizando el software GraphPad (GraphPad Software Inc., California, EEUU). Esta es la dilución de plasma más alta que dio como resultado una reducción del 50% de la actividad de la luciferasa en comparación con el control sin suero, usando regresión no lineal.

3.8 Caracterización de la respuesta celular

3.8.1 Ensayo de ADCC

La línea celular Raji se utilizó como diana para medir la ADCC de las PBMCs de los pacientes y donantes sanos, como se describió anteriormente (53).

Inicialmente, las células Raji se marcaron con PKH67 *Green Fluorescent Cell Linker Kit for General Cell Membrane Labeling* (Sigma-Aldrich), y se incubaron con 50 µg/ml rituximab (Selleckhem, Houston, TX) durante 4 horas para favorecer la ADCC. A continuación, las células Raji marcadas y las PBMCs de donantes sanos, pacientes LMC o MM se cocultivaron a 37°C durante 18 horas en proporción 1:2, respectivamente.

Los valores de apoptosis de las células Raji se cuantificaron mediante tinción con Anexina V conjugada con ficoeritrina 1.5µM (PE) (Immunostep, Salamanca, España). Para ello, la mitad del cocultivo fue lavado con 1ml PBS 1x y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. El pellet obtenido fue resuspendido con 200µL de *binding buffer* de anexina. Posteriormente se añadieron 2µL de Anexina-PE y se incubó a temperatura

ambiente durante 5 minutos y en oscuridad. Tras la incorporación de 250 μ L de *binding buffer* las muestras fueron inmediatamente medidas en el citómetro de flujo BD LSRFortessa X-20. La estrategia de gateo utilizada aparece representado en el Anexo 1A.

3.8.2 Ensayo DCC

Para el análisis de la DCC, se infectaron células VERO E6 con el pseudovirus (100 ng p24 Gag/pocillo) en placas de 48 pocillos. Tras 48 horas de incubación, las células VERO E6 se cocultivaron durante 1 hora con las PBMCs de donantes sanos o pacientes en proporción 1:1. A continuación, se recuperó el sobrenadante para realizar marcajes de superficie de las PBMCs con el objetivo de caracterizar las diferentes poblaciones celulares implicadas en la respuesta antiviral.

Las células VERO E6 de la monocapa se levantaron utilizando la solución de tripsina-EDTA (Sigma Aldrich-Merck, Darmstadt, Alemania) y se utilizaron para cuantificar la replicación viral midiendo los niveles de citotoxicidad celular a través de la actividad de Caspasa-3 y la bioluminescencia emitida por la luciferasa de *Renilla*.

La actividad de Caspasa-3 se midió por quimioluminiscencia utilizando el kit *Caspase-Glo® 3/7 Assay System* (Promega) a 280 nm. Para ello, una parte de las células VERO E6 tripsinizadas se incubaron con el *buffer* de Caspasa 3/7 1x a temperatura ambiente durante 10 minutos y en oscuridad. Se cuantificó la actividad Caspasa-3 en un luminómetro de placas.

Los niveles de producción de luminiscencia, para comprobar la replicación viral, se midieron mediante quimioluminiscencia utilizando el reactivo *Renilla-Glo® Luciferase Assay System* (Promega) a 280 nm. La otra parte de las células tripsinizadas se centrifugaron y, tras retirarse el sobrenadante, el pellet se lisó con buffer de lisis de *Renilla* 1x. Tras dejarlo incubar durante 10 minutos a 4°C, se centrifugaron a 14000 rpm durante 5 minutos. El lisado celular fue usado para cuantificar las unidades relativas de luz (RLUs) tras incorporar el sustrato de la luciferasa en luminómetro de placas.

3.9 Caracterización de las poblaciones celulares

Las PBMCs se descongelaron previamente al marcaje y se lavaron con DMEM para eliminar el DMSO. Posteriormente, se cultivaron en RPMI durante una hora, cuando se extrajo una muestra para hacer el marcaje de CD19+ flujo siguiendo la estrategia de gateo representada en el Anexo 1B.

Las células Raji, previamente recubiertas con Rituximab y marcadas con PKH como se describió anteriormente, se cocultivaron con las PBMCs a 37 °C durante 16 horas. Posteriormente, se extrajo una muestra para hacer el marcaje para su análisis mediante citometría de flujo. La estrategia de gateo utilizada aparece representado en el Anexo 1C. El resto de las células en cultivo fueron utilizadas para realizar el ensayo ADCC, anteriormente explicado.

Las células VERO E6 infectadas con el pseudovirus se cocultivaron con las PBMCs para promover la respuesta antiviral específica. Pasada 1 hora del cocultivo, se retiraron las células en suspensión para realizar su caracterización fenotípica mediante el marcaje y análisis por citometría de flujo. La estrategia de gateo utilizada aparece representado en el Anexo 1C. Las células adheridas a la placa fueron utilizadas para medir la respuesta DCC, previamente explicada.

Los marcajes de PBMCs, células Raji y células VERO E6 se realizaron lavando inicialmente con PBS 1x y después incubando los anticuerpos explicados en la Tabla 1 con las células a 4 °C durante 20 minutos en oscuridad para favorecer el marcaje. A continuación, las células se lavaron con PBS 1x y se fijaron con PBS-PFA1% hasta el momento de la adquisición de los datos con el citómetro de flujo. La estrategia de gateo utilizada aparece representada en el Anexo 1.

3.10 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Las variables cuantitativas se representaron como media y desviación estándar de la media (SEM). La significación en la comparación entre grupos se analizó mediante ANOVA de una vía. Los valores de p valor se consideraron estadísticamente significativos cuando $p < 0,05$. En las figuras, la representación de los valores de p es la siguiente: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$.

4. RESULTADOS

4.1 Participantes en el estudio

En este estudio participaron en total 52 voluntarios, divididos en tres grupos. Sus principales datos clínicos y sociodemográficos aparecen explicados en el Anexo II y se resumidos en la Tabla 2.

- 10 donantes sanos que recibieron pauta completa de vacuna ARNm COVID-19 (10/10; 100% COMINARTY, BioNTech-Pfizer). Su edad promedio fue 42,05 años, siendo 3 hombres (30%) y 7 mujeres (70%).
- 23 pacientes con LMC en tratamiento con ITKs (n=20) o sin tratar (n=3) después de haber recibido dos dosis del esquema vacunal COVID-19. 12/23 pacientes (52,17%) recibieron Spikevax (Moderna), 8/ 23 pacientes (34,79%), obtuvieron COMINARTY (BioNTech-Pzifer) y 3/23 (13,04%) fueron vacunados con AstraZeneca. La edad promedio de estos pacientes fue de 65 años, y en el estudio participaron 10 hombres (43%) y 13 mujeres (57%).
- 19 pacientes con MM trasplantados (n=12) o sin trasplante (n=7) después de haber recibido dos dosis del esquema vacunal frente a la COVID-19. 16/19 (82,21%) recibieron Spikevax (Moderna) y 3/19 (15,79%) fueron vacunados con COMINARTY (BioNTech-Pzifer). Su edad promedio fue de 69,4 años, y en el estudio participaron 9 hombres (47%) y 10 mujeres (53%).

	Voluntarios sanos	Pacientes LMC	Pacientes MM
n	10	23	19
Edad (promedio, años)	42,05	65	69,4
Género	Hombre	3/10 (30%)	10/23 (43%)
	Mujer	7/10 (70%)	13/23 (57%)
Vacuna	Moderna	0	12/23 (52,17%)
	Pfizer	10/10 (100%)	8/23 (34,79%)
	Astra Zeneca	0	3/23 (13,04%)
Tratamiento	En tratamiento	0	20/23 (87%)
	No tratados	10/10 (100%)	3/23 (13%)
Trasplante	Trasplantados	0	12/19 (63%)
	No trasplantados	0	7/19 (37%)

Tabla 2| Datos clínicos de los individuos presentes en el estudio.

4.2 Caracterización de la respuesta humoral

4.2.1 Análisis serológico antes y después de la vacunación contra el SARS-CoV-2

Para analizar la respuesta serológica, se midieron los niveles de anticuerpos IgG del plasma de los individuos incluidos en el estudio mediante un ensayo ELISA Euroimmun Anti-SARS-CoV-2. En la Figura 6A se representan los resultados de los valores de IgG en los tres grupos de individuos analizados (donantes sanos, pacientes LMC y pacientes MM) antes y después de recibir la pauta completa de vacunación. Estos datos indican que ninguno de los tres grupos presentó una titulación de IgG por encima del límite de detección antes de la vacuna. Sin embargo, tres semanas después de la segunda dosis, tanto los controles como los pacientes mostraron niveles elevados de IgG siendo 37,8, 38,3 y 36,1 veces mayor, respectivamente, en la muestra post vacuna de los controles, pacientes LMC y MM, en comparación con el resultado pre-vacuna ($p < 0,0001$).

Además, la capacidad neutralizante de las IgG frente al SARS-CoV-2 de los individuos analizados también se cuantificó en el plasma de aquellas muestras cuyo valor de IgG estaba por encima de 1,1, coincidiendo con que todas ellas eran muestras post-vacuna (Figura 6B). Todos los donantes sanos (10/10; 100%) con IgG detectables desarrollaron anticuerpos neutralizantes por encima del umbral de detección ($NT_{50}=32$), al igual que los pacientes con LMC (23/23; 100%). De los 19 pacientes con MM, 18 superaron el límite de detección (94,7%), mientras que uno de ellos obtuvo un valor indeterminado (en el límite de detección). Una vez analizados los diferentes grupos se observó una menor tasa de neutralización en los pacientes con LMC y MM con respecto a los individuos del grupo control tras la segunda dosis de la vacuna, pero esta diferencia no alcanzó significación estadística.

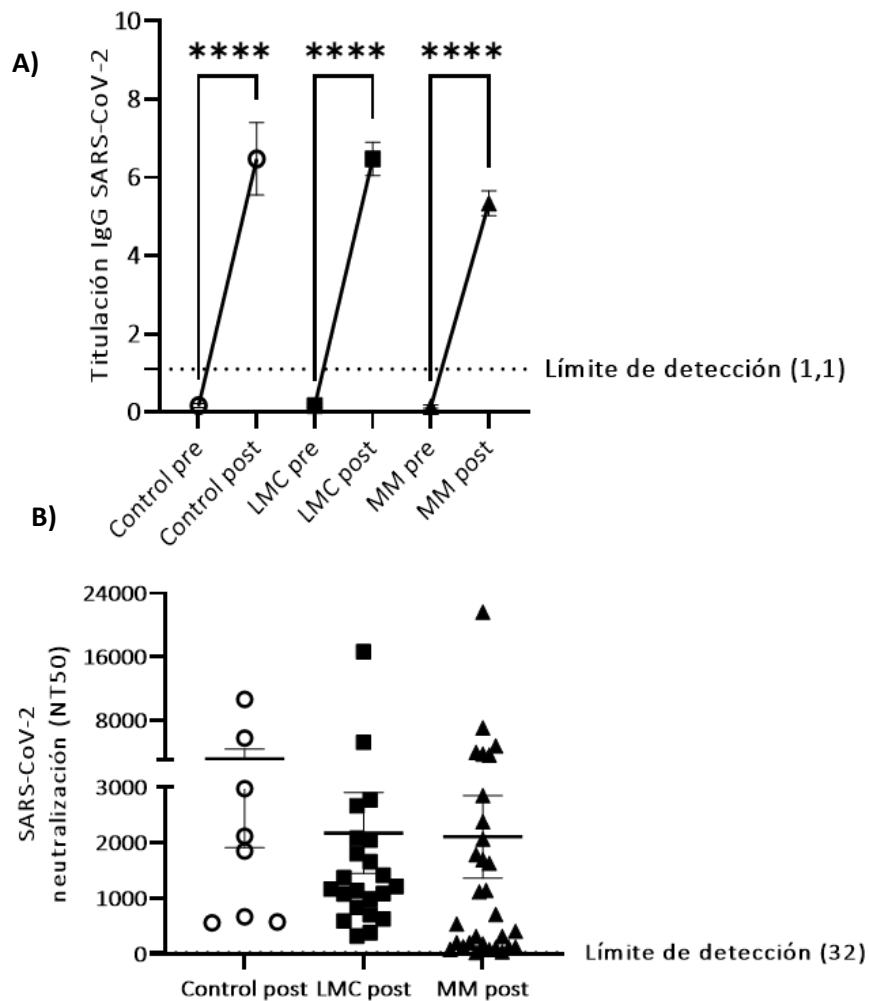


Figura 6 | Respuesta serológica frente a vacuna SARS-CoV-2 en plasma. A) Títulos de IgG en plasma de donantes sanos e individuos con LMC y MM antes y después de recibir la segunda dosis de la vacuna contra el SARS-CoV-2. Se representa como la media \pm error estándar de la media (SEM). B) Actividad neutralizante contra el SARS-CoV-2 de IgG positivas de donantes sanos y pacientes con LMC o MM después de dos dosis de vacunación. Cada punto representa el valor de una muestra analizada. La significación estadística entre los grupos se calculó mediante la prueba ANOVA de una vía. Pre: sin vacunar; Post: vacunados. (n Control=10; n LMC=23; n MM=19).

4.2.2 Niveles de linfocitos B post-vacunales contra el SARS-CoV-2

Para comprobar los niveles de linfocitos B (CD19+) que presentaban los tres grupos de estudio, las PBMCs se extrajeron de las muestras de sangre donadas y se realizó un marcaje de superficie mediante los anticuerpos descritos en la Tabla 1, antes y después de recibir las dos dosis.

Los valores iniciales del recuento de células B en donantes sanos y pacientes con LMC fueron similares. Sin embargo, hubo una diferencia significativa en el recuento de estas células en los pacientes de MM y los de LMC, siendo 2,15 veces menor ($p < 0,05$) en los primeros. Tras la vacunación, el recuento total de células B se mantuvo similar con respecto a las muestras pre vacuna en los tres grupos (Figura 7).

Después de la vacunación, los pacientes con MM continuaron con un recuento inferior de células B en relación con los otros grupos, siendo significativa su comparación con los pacientes de LMC, que obtuvieron un porcentaje 3,1 veces mayor ($p < 0,001$) que los MM.

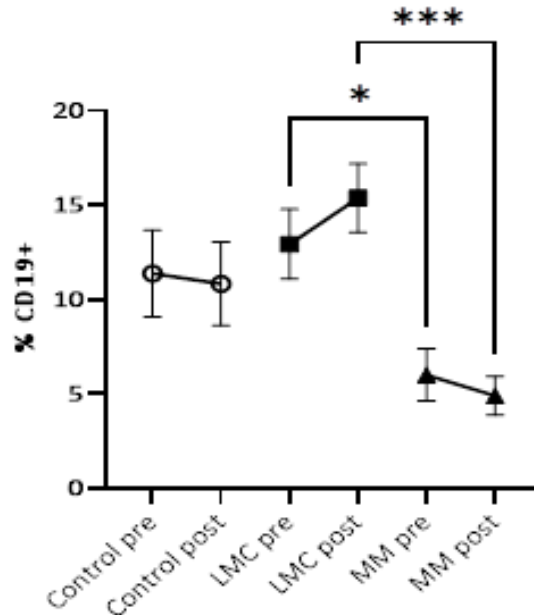


Figura 7 | Niveles totales de células B en PBMCs de donantes sanos en comparación con personas con EOH, antes y después de recibir la segunda dosis de la vacuna contra el SARS-CoV-2. Se representa como la media \pm SEM. La significación estadística entre los grupos se calculó mediante la prueba ANOVA de una vía. (n Control=10; n LMC=23; n MM=19).

4.3 Caracterización de la respuesta celular

4.3.1 Análisis de la ADCC

Las PBMCs de todos los pacientes se cocultivaron con las células Raji recubiertas con rituximab para cuantificar la capacidad citotóxica inespecífica de las PBMCs de los pacientes EOH después de la vacunación. Para ello, se determinó la citotoxicidad midiendo los niveles de muerte celular producidos en las células Raji mediante la expresión de Anexina V, marcador de apoptosis temprana. Los niveles de Anexina V se mantuvieron similares en las tres poblaciones de estudio, aunque en los dos grupos de pacientes EOH la respuesta es superior a la de los controles, tanto antes de la vacuna como después de las dos dosis (Figura 8). Sin embargo, esta diferencia no alcanzó significación estadística.

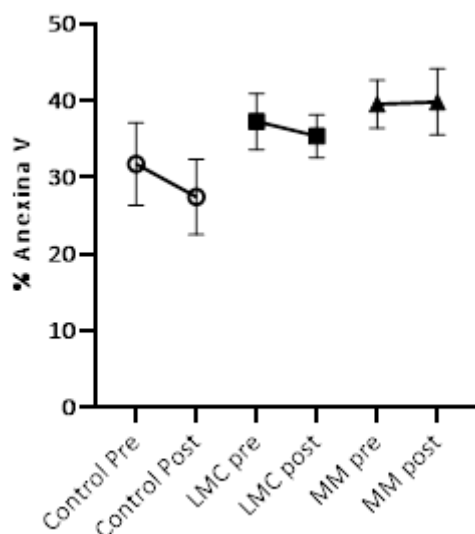


Figura 8| Respuesta ADCC en PBMCs de individuos sanos y con EOH. Cuantificación por citometría de flujo de la expresión de los niveles de Anexina V (%) en células Raji tratadas con rituximab y cocultivadas con PBMCs de individuos sanos, LMC o MM, antes y después de recibir dos dosis de la vacuna contra el SARS-CoV-2. Cada punto en los gráficos corresponde a la media \pm SEM. (n Control=10; n LMC=23; n MM=19).

Para caracterizar las poblaciones citotóxicas de las PBMCs que habían inducido la activación de la Anexina V, se analizaron mediante citometría de flujo las poblaciones responsables de la respuesta ADCC.

Por un lado, se analizó el porcentaje total de linfocitos T (células con el marcador de superficie CD3+), tanto antes como después de la vacunación en los tres grupos de estudio (Figura 9A). Los donantes sanos y los pacientes con MM presentaron un porcentaje de células CD3+ en torno al 50-60%, que se mantuvo similar después de la vacunación. Antes de ser vacunados, los individuos con LMC presentaban linfopenia, con una reducción significativa en los niveles de linfocitos T CD3+ de 1,8 veces ($p < 0,001$) en comparación con los donantes sanos y 1,53 veces con los pacientes con MM. Esta linfopenia de linfocitos T se normalizó tras la vacunación, alcanzando valores similares a los de los controles y pacientes MM.

Por otro lado, se cuantificaron los niveles de linfocitos T citotóxicos (células con los marcadores de superficie CD3+CD8+) por citometría de flujo, en las muestras de los donantes sanos y con EOH, antes y después de la vacunación (Figura 9B). Los donantes sanos y los pacientes con LMC mostraron valores similares antes y después de la vacunación (alrededor del 35%). En el caso de los pacientes con MM, el porcentaje de CD3+CD8+ fue similar entre las dos muestras. Sin embargo, los niveles pre vacunación

fueron 1,68 veces mayores ($p < 0,01$) que en los controles y 1,86 veces mayores ($p < 0,001$) que en los pacientes con LMC. A su vez, el nivel post-vacuna aumentó 1,56 veces ($p < 0,05$) en comparación con los voluntarios sanos y 1,48 ($p < 0,01$) con respecto a los pacientes con LMC.

Por último, se analizó también la actividad de los linfocitos T citotóxicos mediante la presencia del marcador de superficie CD107a. Esta proteína de superficie es necesaria para que los linfocitos CD8+ degranulen sus enzimas citolíticas como las grazimas, las proteasas y las perforinas, proceso clave en la inducción de citotoxicidad. Se observó que este marcador también se encontraba aumentado significativamente (1,9 veces) en pacientes con MM ($p < 0,05$), en comparación con los donantes sanos antes de la vacunación (Figura 9C).

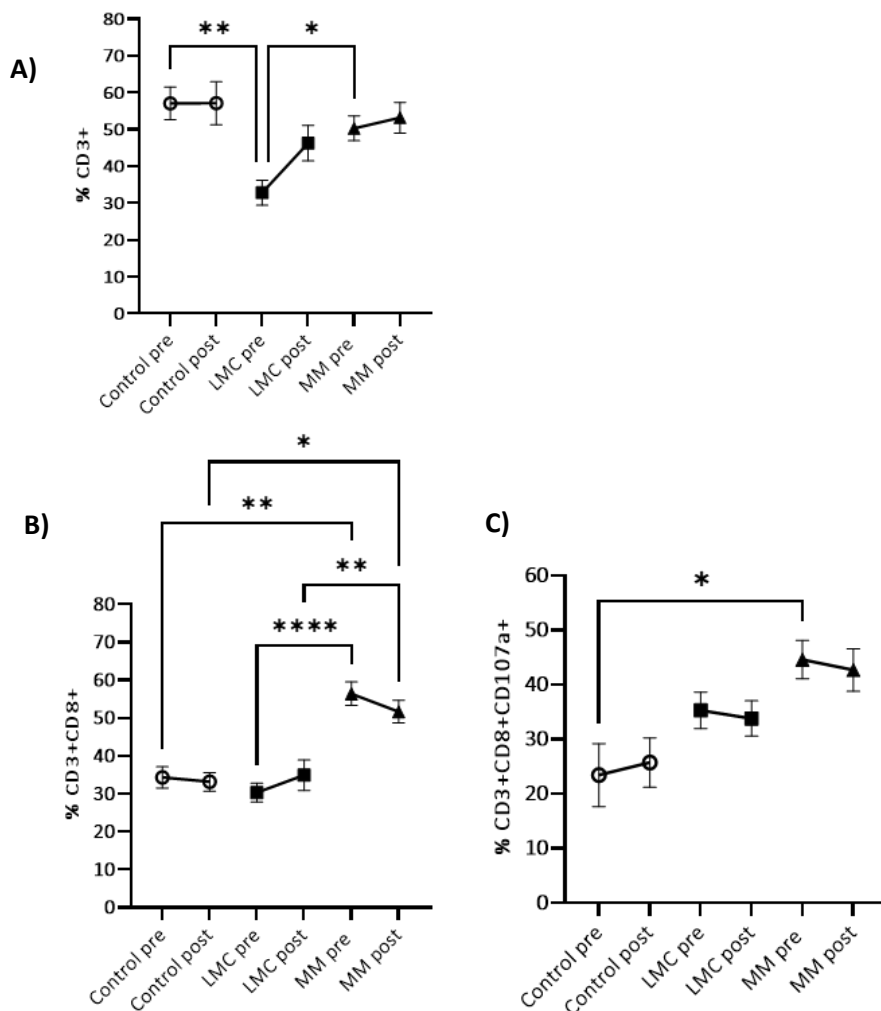


Figura 9| Caracterización de las poblaciones celulares citotóxicas en PBMCs de individuos con EOH antes y después de recibir dos dosis de vacuna. A) Las células T CD3+ totales en PBMCs de individuos con EOH se evaluaron mediante citometría de flujo, en comparación con donantes sanos. B) Recuento de CD3+CD8+ C) Expresión de CD3+CD8+CD107a+ en estas células en PBMCs de individuos sanos en comparación con pacientes EOH. Cada punto en los gráficos corresponde a la media \pm SEM. La significación estadística entre los grupos se calculó mediante la prueba ANOVA de una vía. (n Control=10; n LMC=23; n MM=19).

Para determinar la relevancia de las diferentes poblaciones en la respuesta ADCC se cuantificaron también otras poblaciones de células citotóxicas como son las células NKs (CD3-CD56+) y NKTs (CD3+CD56+), antes y después de la vacunación de los tres grupos de estudio.

Antes de la vacunación, los niveles de NKs eran dispares entre los tres grupos de estudio, siendo los pacientes con LMC los que contaban con un menor porcentaje de células NKs (7%). Los pacientes con MM presentaban unos niveles aumentados 2,94 veces ($p < 0,0001$) con respecto a los pacientes de LMC (Figura 10A). Tanto el marcador de desgranulación de las NKs como las NKTs no parecen ser especialmente determinantes en la eficacia de la vacunación, ya que mostraron resultados similares entre grupos y antes y después de la vacunación (Figura 10B, 10C, 10D).

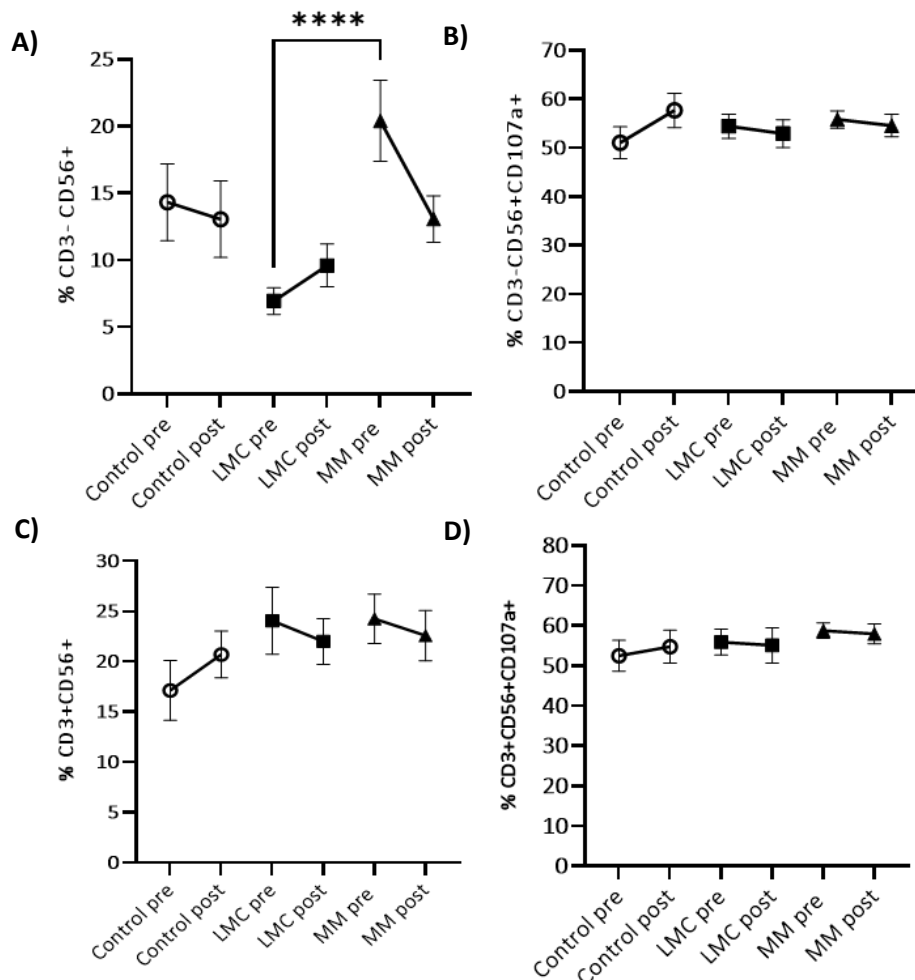


Figura 10| Análisis de poblaciones NKs y NKTs. A) Recuento de células NK. B) Expresión de CD107a en PBMCs de donantes sanos, en comparación con pacientes EOH. C) Porcentaje de células NKT. D) CD107a+ en PBMCs de individuos con EOH, en comparación con donantes sanos. Cada punto en los gráficos corresponde a la media \pm SEM. La significación estadística entre los grupos se calculó mediante la prueba ANOVA de una vía. (n Control=10; n LMC=23; n MM=19).

Debido a su alta capacidad citotóxica, también se analizaron las poblaciones de los linfocitos TCR $\gamma\delta$ y el factor de desgranulación CD3+CD8+TCR $\gamma\delta$ + CD107a+.

En la Figura 11 se representan los niveles de CD3+CD8+TCR $\gamma\delta$ + de los donantes sanos y de los pacientes con LMC y con MM, antes y después de dos dosis de la vacuna. Los donantes sanos y los pacientes con LMC presentaban unos valores similares de CD3+CD8+TCR $\gamma\delta$ +, tanto antes como después de la vacunación. En el caso de los pacientes con MM, la similitud entre las dos muestras también se mantuvo, pero el nivel pre vacunación fue 2,46 veces mayor ($p < 0,001$) con respecto a los donantes sanos y 2,24 veces mayor ($p < 0,001$) que los pacientes con LMC. A su vez, los niveles post-vacuna aumentaron 1,95 veces ($p < 0,05$) en comparación con los voluntarios sanos y 1,9 ($p < 0,01$) con respecto a los pacientes con LMC (Figura 11A). Aunque los datos no muestran diferencias significativas al analizar la expresión de células CD3+CD8+TCR $\gamma\delta$ +CD107a+ antes y después de las vacunas, se puede observar cómo los controles sanos aumentan dichos valores y los pacientes con EOH mostraron una reducción no significativa después de la vacunación (Figura 11B).

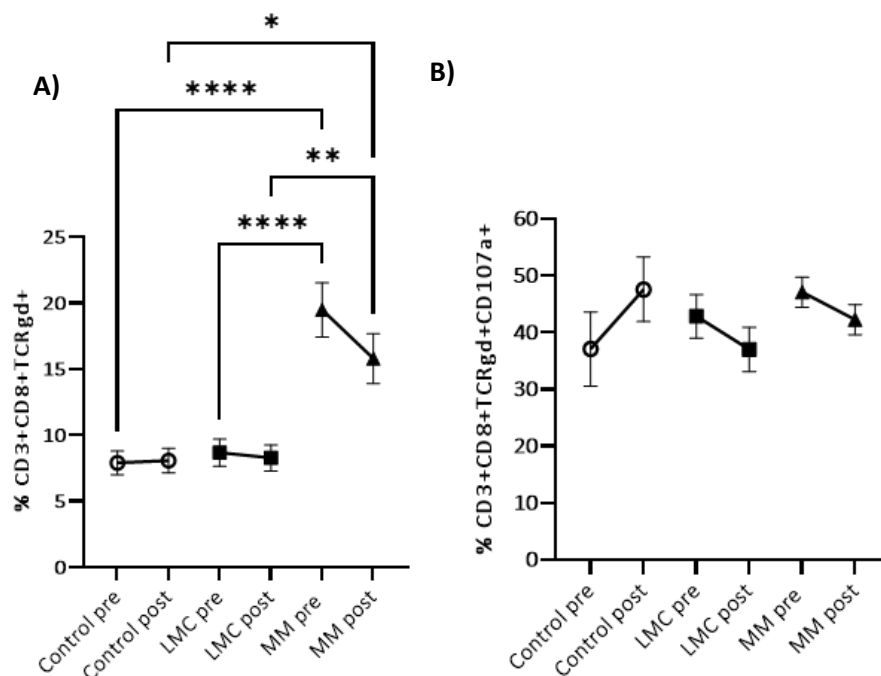


Figura 11| A) Recuento de células CD3+CD8+TCR $\gamma\delta$ + B) Expresión de CD3+CD8+TCR $\gamma\delta$ +CD107a+ en PBMCs de donantes sanos en comparación con pacientes EOH. Cada punto en los gráficos corresponde a la media \pm SEM. La significación estadística entre los grupos se calculó mediante la prueba ANOVA de una vía. (n Control=10; n LMC=23; n MM=19).

En la Figura 12 se muestran los niveles de las células CD3+CD8-TCR $\gamma\delta$ + de los tres grupos de estudio, antes y después de la vacunación. Se observó un aumento significativo de 1,72 veces ($p < 0,05$) en pacientes LMC, con respecto a los pacientes de MM antes de la vacunación (Figura 12A). Los niveles de células CD3+CD8-TCR $\gamma\delta$ +CD107a+ se mantuvieron similares antes y después de la vacunación en todos los casos, pero al comparar los datos tres semanas después de la vacunación, los niveles de CD3+CD8-TCR $\gamma\delta$ +CD107a+ eran superiores en pacientes con LMC 1,26 veces ($p < 0,05$) en comparación con los pacientes con MM (Figura 12B).

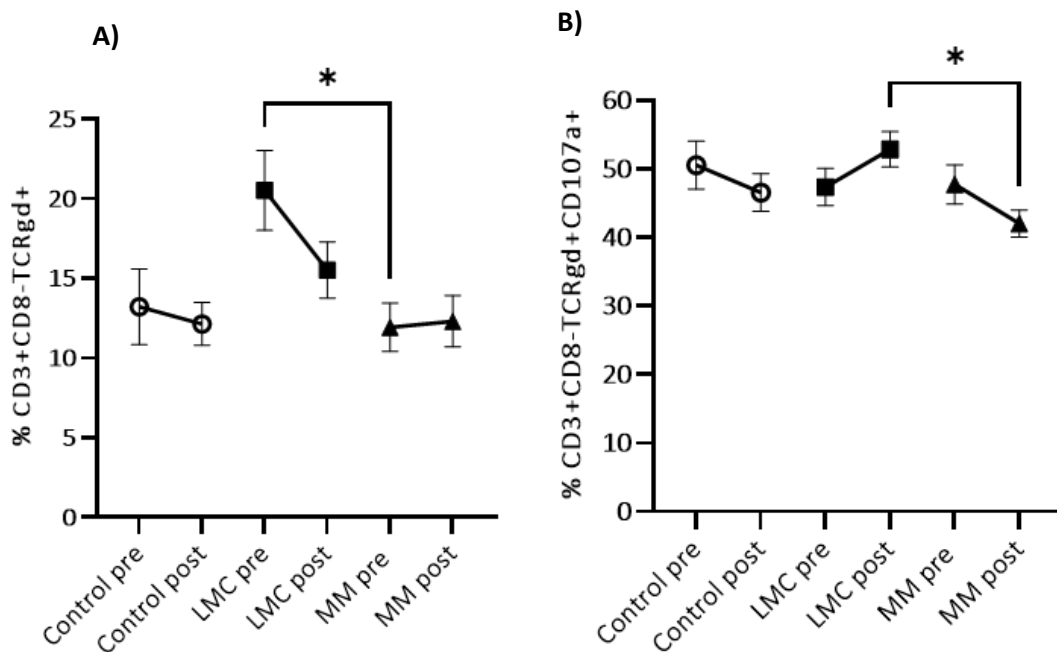


Figura 12| A) Determinación del recuento celular CD3+CD8-TCR $\gamma\delta$ +. B) Expresión de CD107a en PBMCs de donantes sanos en comparación con pacientes EOH. Cada punto en los gráficos corresponde a la media \pm SEM. La significación estadística entre los grupos se calculó mediante la prueba ANOVA de una vía. (n Control=10; n LMC=23; n MM=19).

4.3.2 Análisis de la DCC

Teniendo como objetivo determinar la DCC de las PBMCs, se analizó la actividad de Caspasa-3 en células infectadas con SARS-CoV2. Para ello, se infectó la monocapa de células Vero E6 durante 48 horas con el virus pseudotipado y se cocultivó con las PBMCs de los pacientes y los donantes sanos. La Caspasa-3 es un indicador de inicio de apoptosis, por lo que se relaciona de manera directa con la respuesta citotóxica en las células Vero E6 inducida por las PBMCs, y de manera indirecta con la producción de proteínas virales (Renilla) por las células infectadas de la monocapa. Se ha detectado que la citotoxicidad de las muestras de pacientes MM se incrementó 1,46 veces antes

de la vacuna y 3,83 veces después de la misma con respecto al grupo de donantes sanos (Figura 13A). Además, la actividad Caspasa-3 aumentó después de la vacunación en el grupo de pacientes MM, a diferencia de lo que ocurrió en el grupo de donantes sanos y de pacientes LMC, que disminuyó la actividad de manera no significativa.

Por otro lado, se determinó la carga viral de los lisados de las células Vero E6. Para ello, se midieron los niveles de RLUs, determinándose así la capacidad de las PBMCs para eliminar células VERO E6 infectadas con SARS-CoV-2 pseudotipado. No se observaron diferencias significativas entre los donantes sanos y los pacientes con LMC, aunque los valores de replicación viral estaban disminuidos en los pacientes con MM 1,52 veces antes de la vacunación y 1,78 después de la misma en comparación con los LMC (Figura 13B).

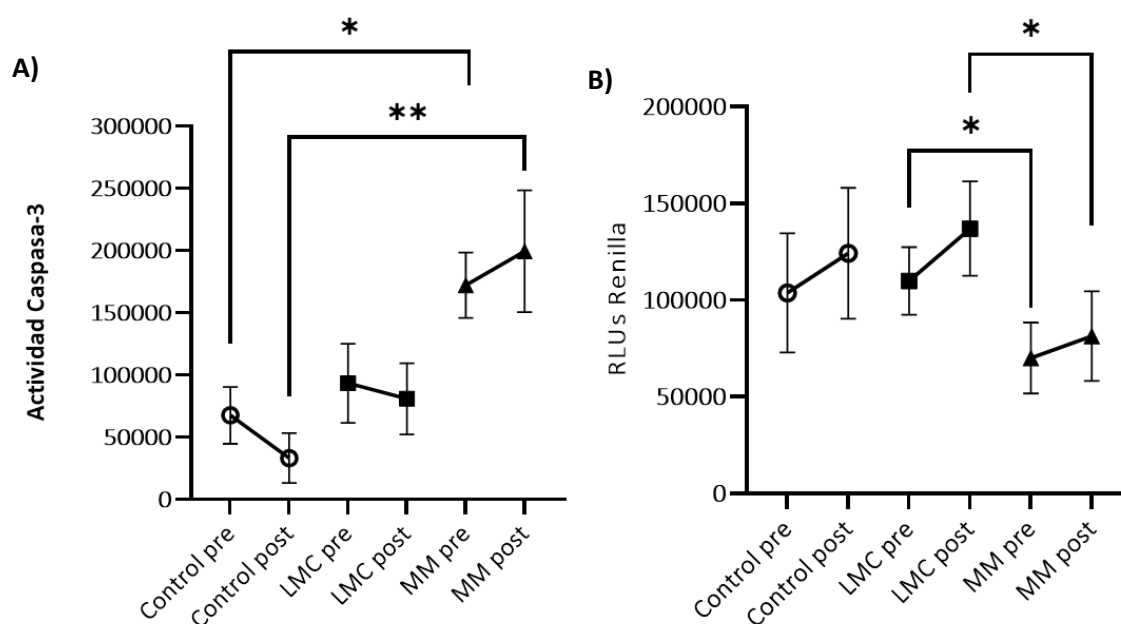


Figura 13 | Análisis de DCC y actividad de neutralización viral contra células infectadas por SARS-CoV-2 de PBMCs de individuos con EOH antes y después de recibir la vacuna de dos dosis. A) Actividad de neutralización mediante la medición de Caspasa-3 en células Vero E6 infectadas con SARS-CoV-2 cocultivadas con PBMCs de voluntarios sanos, pacientes LMC y pacientes MM. B) Cuantificación de la producción de Renilla (RLU) después del cocultivo durante 1 hora de células VERO E6 con PBMCs de donantes sanos y pacientes con LMC y MM. Cada punto en los gráficos corresponde a la media \pm SEM. La significación estadística entre los grupos se calculó mediante la prueba ANOVA de una vía. (n Control=10; n LMC=23; n MM=19).

Para caracterizar las poblaciones citotóxicas de las PBMCs, que habían inducido la activación de Caspasa-3 en las células VERO E6, se analizaron las poblaciones responsables de la respuesta DCC mediante citometría de flujo con los anticuerpos mencionados anteriormente (Tabla 1).

Al determinar el porcentaje total de células CD3+ (linfocitos T), se observó una misma tendencia en los tres grupos de estudio al comparar los niveles antes y después de la vacunación. Después de la vacunación los niveles de Linfocitos T aumentaron de manera no significativa en los tres grupos de estudio (Figura 14A).

Además, se analizaron los linfocitos T citotóxicos (CD3+CD8+) en los tres grupos de estudio antes y después de la vacunación mediante citometría de flujo. En este caso, los donantes sanos y los pacientes con LMC presentaron niveles similares de linfocitos T citotóxicos, en torno a un 30-35%. Sin embargo, los pacientes con MM mostraron niveles de células T CD8+ aumentados antes de la vacunación en comparación con los otros dos grupos de estudio: 1,58 veces ($p < 0,0001$) con respecto a los controles y 1,50 veces ($p < 0,001$) en relación con los pacientes con LMC (Figura 14B). La activación de los linfocitos T CD8+ se evaluó mediante la expresión del marcador de desgranulación CD107a, que se mantuvo similar en los tres grupos de estudio, tanto antes como después de la vacunación (Figura 14C).

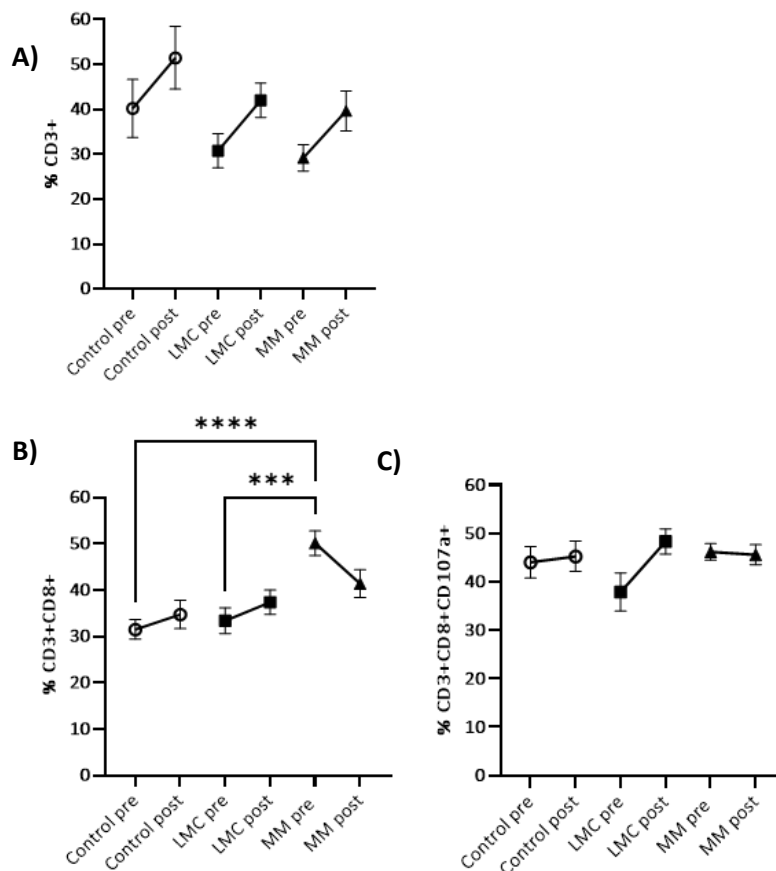


Figura 14| Caracterización de las poblaciones celulares citotóxicas en PBMCs de individuos sanos y con EOH antes y después de recibir dos dosis de vacunación. A) Representación de las células T CD3+ totales B) Recuento de células CD8+. C) Expresión de CD107a en PBMCs de pacientes sanos y con LMC o MM. Cada punto en los gráficos corresponde a la media \pm SEM. La significación estadística entre los grupos se calculó mediante la prueba ANOVA de una vía. (n Control=10; n LMC=23; n MM=19).

Para determinar la relevancia de estas poblaciones en la respuesta DCC, se cuantificaron también las poblaciones de NKs (CD3-CD56+) y NKTs (CD3+CD56+) y el marcador de desgranulación CD107a+, antes y después de la vacunación.

No hubo variabilidad entre los niveles de células NKs entre los grupos antes y después de la vacuna (Figura 15A). Los LMC mostraron niveles reducidos de expresión de CD107a+, en comparación con los donantes sanos y los pacientes MM, tanto antes de la vacunación como después (Figura 15B), pero estos resultados no alcanzaron relevancia significativa.

Los niveles de células NKTs (CD3+CD56+) no cambiaron significativamente intragrupo. Sin embargo, antes de la vacunación, los niveles de CD3+CD56+ estaban aumentados en pacientes con MM 2,11 veces ($p < 0,0001$) con respecto a los pacientes de LMC (Figura 15C). El factor de desgranulación CD107a se mantuvo similar en todos los casos (Figura 15D).

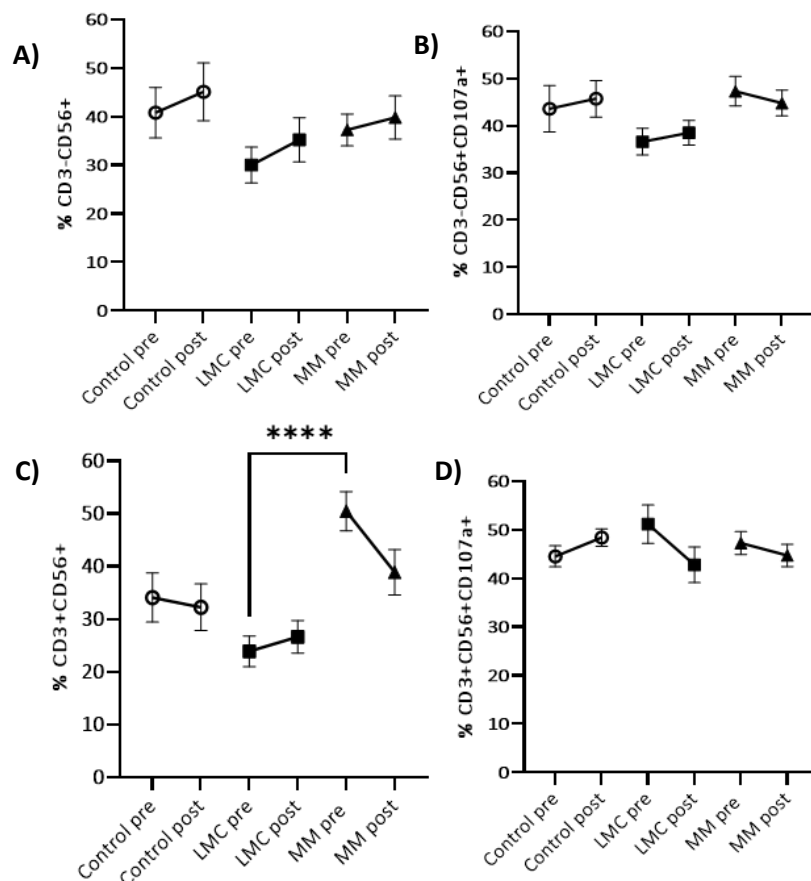


Figura 15| Caracterización de las poblaciones celulares citotóxicas en PBMCs de individuos sanos y con EOH antes y después de recibir dos dosis de vacunación. A) Recuento de células NK B) Expresión de CD3-CD56+CD107a+ en estas células en donantes sanos y pacientes con LMC y MM. C) Recuento de células NKT D) Expresión de CD3+CD56+CD107a+ en estas células en PBMCs de individuos sanos y con EOH. Cada punto en los gráficos corresponde a la media \pm SEM. La significación estadística entre los grupos se calculó mediante la prueba ANOVA de una vía. (n Control=10; n LMC=23; n MM=19).

Por otro lado, debido a su capacidad citotóxica, se analizaron los niveles de linfocitos $TCR\gamma\delta^+$ y la expresión del factor de desgranulación CD107a en los mismos (Figura 16).

Los individuos de todas las cohortes tenían niveles similares de células $CD3+CD8+TCR\gamma\delta^+$ (Figura 16A). Los pacientes con LMC mostraron una reducción no significativa en la expresión de células $CD3+CD8+TCR\gamma\delta^+CD107a^+$ después de la vacunación, similar a la que mostraron también los controles sanos (Figura 16B). Todos los grupos de estudio presentaron niveles similares de $CD3+CD8-TCR\gamma\delta^+$ (Figura 16C), al igual que los niveles de expresión de células $CD3+CD8-TCR\gamma\delta^+CD107a^+$, tanto antes como después de la vacunación (Figura 16D). Por tanto, no se observaron diferencias significativas en ninguna de las subpoblaciones de linfocitos $TCR\gamma\delta$ descritas.

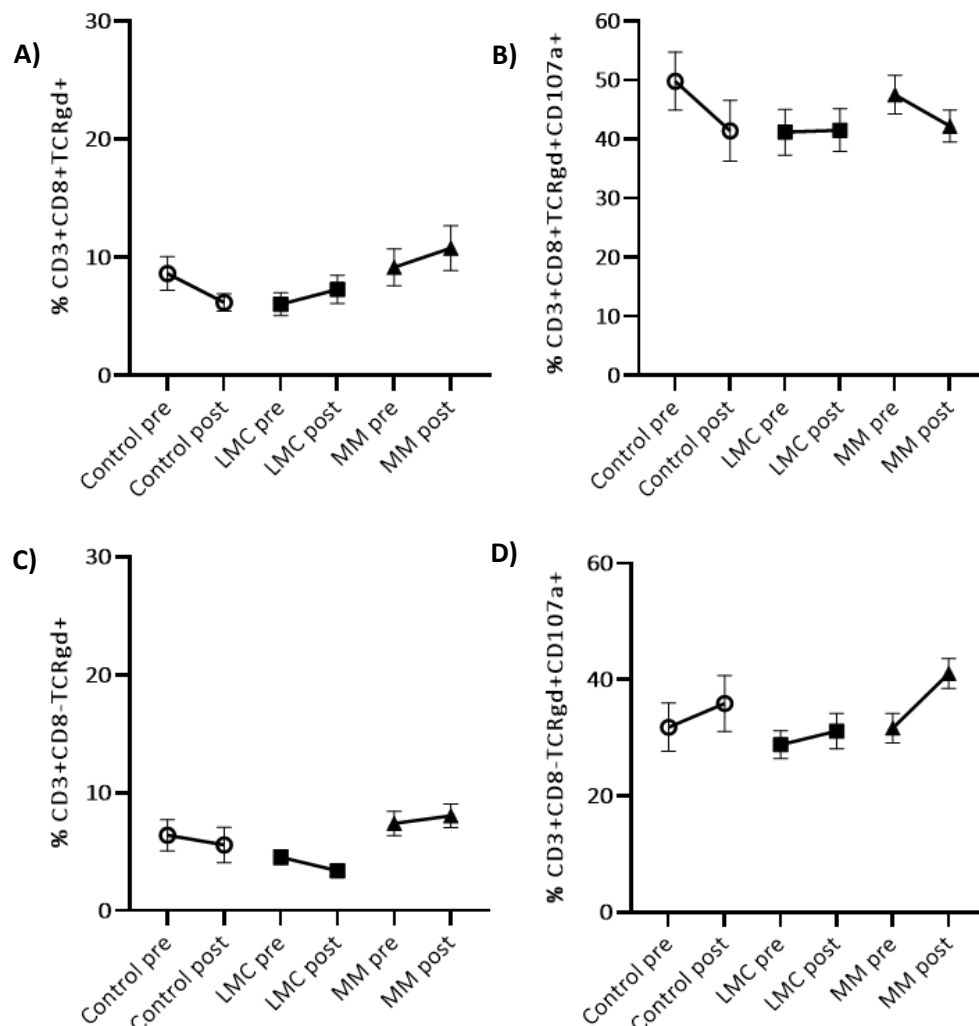


Figura 16] Caracterización de células $CD3+CD8\pm TCR\gamma\delta^+$ en PBMCs de individuos con EOH antes y después de recibir dos dosis de vacunación. A) Recuento de células $CD3+CD8+TCR\gamma\delta^+$ B) Expresión de CD107a en PBMCs de individuos con EOH, en comparación con donantes sanos. C) Recuento de células $CD3+CD8-TCR\gamma\delta^+$ D) Expresión de CD107a en PBMCs de individuos con EOH, en comparación con donantes sanos. Cada punto en los gráficos corresponde a la media \pm SEM. La significación estadística entre los grupos se calculó mediante la prueba ANOVA de una vía. (n Control=10; n LMC=23; n MM=19).

5. DISCUSIÓN

En investigaciones anteriores, se ha determinado que los pacientes que padecen una EOH presentan respuestas inmunológicas alteradas, tanto por la enfermedad como por los tratamientos que reciben. En un primer momento, los pacientes con EOH, como es el caso de las personas con LMC o MM, se excluyeron de los ensayos clínicos que determinaban la eficacia de la vacunación. Sin embargo, se esperaba que su administración resultase beneficiosa, aunque no fuese igual de eficaz que en personas sanas como ocurre con otras vacunas como la de la varicela zóster o la hepatitis B (54).

No obstante, debido a la probabilidad de que las vacunas contra el SARS-CoV-2, al igual que otras utilizadas anteriormente, produjeran una respuesta inmunitaria reducida de tanto de tipo humoral como de tipo celular, es necesario analizar la calidad de la respuesta desarrollada en este tipo de pacientes para poder garantizar su eficacia o, en su caso, administrar nuevas dosis de refuerzo. Sin embargo, los estudios publicados hasta la fecha han centrado sus investigaciones en analizar la calidad de la respuesta humoral contra la COVID-19, pero no en caracterizar la respuesta inmunológica celular y, si lo hacen, se limitan a evaluar de la reactividad de los linfocitos T a través de la cuantificación de citoquinas después de la estimulación con un péptido antigénico (55,56), generalmente la proteína S. La evaluación de la respuesta celular es especialmente importante en este tipo de vacunas en las que no se administra el patógeno completo en forma inactivada o atenuada, sino que solamente se administra una subunidad o una proteína específica.

Uno de los propósitos más importantes de las vacunas preventivas, como las de SARS-CoV-2, es la capacidad de generar anticuerpos que permanezcan en el organismo durante un largo periodo de tiempo, a veces indeterminado, que respondan frente a una posible infección del patógeno para el que se ha generado una respuesta.

Los resultados de este trabajo no se han compartimentalizado según la vacuna recibida porque diversos estudios han sugerido que no existen diferencias significativas en la respuesta que generan las vacunas basadas en ARNm (70). A su vez, los 3 pacientes con LMC vacunados con AstraZeneca (vacuna basada en vector viral) que se incluyen en el estudio se han analizado con el resto de pacientes con LMC y por separado, sin encontrar diferencias en los análisis obtenidos (resultados no mostrados).

Los resultados de este trabajo demuestran que la producción de IgG frente a SARS-CoV-2 en el plasma de las tres poblaciones del estudio es excelente tras la vacunación, aunque la capacidad neutralizante de los pacientes con MM es ligeramente menor, sin ser relevante estadísticamente. Como se ha descrito en otras investigaciones (58,59), en general, los pacientes con MM también presentan menor capacidad neutralizante debido a que los tratamientos que se les administran suelen ser agresivos y dañan a los linfocitos B en el proceso, que son las células productoras de los anticuerpos neutralizantes. Estos trabajos apoyan los resultados obtenidos en este estudio, en el que los pacientes con MM presentan un porcentaje de linfocitos B del 5%, lo que sugiere que estos individuos padecen linfopenia para este tipo de células. Esta linfopenia está descrita en otras investigaciones (60) como algo no solo característico de estos pacientes por el tratamiento que reciben, sino también por la propia enfermedad, ya que el mieloma genera células plasmáticas defectuosas que desplazan a las células normales. A pesar de estos bajos niveles de linfocitos B, los resultados obtenidos de IgG demuestran que estos son funcionales y capaces de generar anticuerpos después de recibir las dos dosis de la vacuna y, en caso de una infección por SARS-CoV-2, la respuesta humoral estará preparada para actuar. Para determinar por qué los pacientes con MM pudieron generar niveles tan elevados de anticuerpos neutralizantes con citopenia de linfocitos B sería necesario realizar un análisis exhaustivo de las subpoblaciones de linfocitos B en experimentos futuros.

Por otro lado, los linfocitos B de los pacientes con LMC se encuentran aumentados con respecto a los otros grupos, llegando a alcanzar niveles por encima del 15% después de la vacunación. Estos valores pueden deberse al tratamiento con ITKs que reciben estos pacientes, que potencian la producción de linfocitos B y, por tanto, de anticuerpos (61).

Sin embargo, el papel de las IgGs para proteger al organismo contra la infección por SARS-CoV-2 no se basa solo en su capacidad neutralizante para evitar la infección de las células, sino también en su capacidad para activar el sistema del complemento y la respuesta ADCC ejercida por las células NK y los linfocitos T CD8+, con el objetivo de eliminar las células infectadas (62).

En este sentido, se ha observado que los pacientes con MM presentan unos niveles de linfocitos T CD8+ superiores a los otros dos grupos (en torno a un 55%, en comparación

con un 35% que desarrollan los donantes sanos y los pacientes con LMC) que, además, tienen una mayor capacidad citotóxica, debido al aumento en la expresión del marcador de desgranulación CD107a. Esta mayor actividad citotóxica en pacientes con MM puede ser debida a distintos factores como son la propia EOH, que estimula la producción de células citotóxicas con capacidad de eliminar células cancerosas, así como a algunos tratamientos que reciben estos pacientes después del trasplante autólogo, como es la lenalidomida. Este fármaco puede potenciar la inmunidad celular mediada por los linfocitos T y las células NK, además de aumentar el número de células NKT (63), como también ocurre en los resultados presentados en este estudio. Además, los pacientes MM también presentaban altos niveles de células CD3+CD8+TCR $\gamma\delta$ +, que también podría ser debido al tratamiento con lenalidomida, o a la presencia de las células cancerosas (64). Sin embargo, estos factores estarían contribuyendo al desarrollo de una respuesta ADCC efectiva en estos pacientes, que es comparable a la de los donantes sanos.

Con respecto a la respuesta citotóxica directa (no mediada por anticuerpos) los pacientes con MM presentaron un aumento significativo en la capacidad para eliminar las células infectadas por SARS-CoV-2 pseudotipado. Esta respuesta también parece ser debida a los altos niveles de linfocitos T CD8+ (50% antes de la vacunación), en comparación con los donantes sanos (30%) y los pacientes con LMC (30%). Este fenómeno puede estar relacionado con la administración de lenalidomida que reciben estos pacientes (63), así como el aumento en los niveles de NKTs.

Sin embargo, y a diferencia de la respuesta ADCC, los linfocitos TCR $\gamma\delta$ + no parecen tener relevancia en la respuesta DCC, ya que los valores permanecieron similares entre los grupos, antes y después de la vacunación. Tampoco parecen tener importancia los niveles de NKs y NKTs (excepto en los pacientes MM). Estos resultados concuerdan con lo esperado por parte de una vacuna con la que se pretende potenciar una respuesta de memoria frente a un patógeno, que recae principalmente sobre células del sistema inmunológico adquirido como lo son los linfocitos T CD8+, aunque recientemente se ha demostrado que tanto NKs como NKTs también pueden adquirir memoria inmunológica de forma similar a los linfocitos B o T (65).

En el caso de los pacientes con LMC, el tratamiento con los ITKs es muy efectivo para disminuir y controlar las células cancerosas, por lo que estos pacientes consiguen llevar una calidad de vida muy similar a las personas sanas (61). Esto se traduce en que, de acuerdo con nuestros resultados, la respuesta a la vacuna frente a la COVID-19 ha sido muy similar a la producida en donantes sanos, tanto en la calidad de la respuesta humoral y celular, como en las proporciones de poblaciones celulares en sangre periférica.

En resumen, las personas con LMC o MM mostraron respuestas inmunitarias tempranas variables tres semanas después de recibir dos dosis de la vacuna contra el SARS-CoV-2. A diferencia de los donantes sanos, que mostraron una respuesta humoral temprana eficiente y una respuesta celular más retardada, la respuesta humoral obtuvo una seroconversión ligeramente menor en los pacientes oncohematológicos. Esto es especialmente visible en los pacientes con MM, aunque en estos últimos fue contrarrestado por una potente respuesta celular temprana basada, principalmente, en niveles aumentados de linfocitos T CD8+ funcionales, células T CD8+TCR $\gamma\delta$ + y células NKTs. Dada la naturaleza de la enfermedad que padecen y a su tratamiento, no se puede descartar que la respuesta mejorada frente a la vacuna del SARS-CoV-2 observada en pacientes con MM se deba a la presencia estimuladora de las células cancerosas o a determinados tratamientos antineoplásicos potenciadores de la respuesta inmune como la lenalidomida.

Clínicamente, la vacunación parece ser útil en pacientes con LMC o MM para prevenir infecciones graves, al menos parcialmente (66), y para evitar la gravedad de las infecciones brecha, que son aquellas que suceden en individuos vacunados. Además, la mortalidad debida a la COVID-19 en individuos con EOH parece estar disminuyendo según avanzamos en el tiempo (67), hecho que puede estar relacionado con un número cada vez mayor de pacientes con calendarios de vacunación parciales o completos y con un mayor conocimiento sobre los abordajes terapéuticos de la infección por SARS-CoV-2.

Finalmente, como se describe en otros estudios (56,68,69), los resultados demuestran que la seroconversión no siempre se correlaciona con la respuesta inmune celular después de la vacunación. Ambos aspectos son fundamentales para la protección

inmunológica ejercida tras la administración de una vacuna, puesto que no solamente es necesaria una capacidad neutralizante para impedir la infección de nuevas células diana, sino también una capacidad citotóxica que permita eliminar las células infectadas. Es por ello que los estudios orientados a valorar la respuesta frente a las vacunas deberían contener ambos aspectos de la respuesta inmune y no solamente cuantificar la producción de anticuerpos, como se hace habitualmente.

6. CONCLUSIONES

1. Los pacientes con LMC presentan niveles de seroconversión frente a SARS-CoV-2 comparables a los donantes sanos 3 semanas después de recibir la segunda dosis de la vacuna frente a la COVID-19. Aunque estos niveles presentados por los pacientes con MM eran inferiores respecto a los donantes sanos, la diferencia no presenta significación estadística.
2. La respuesta celular de tipo citotóxico de las PBMCs de pacientes con MM es muy superior a la de los donantes sanos y personas con LMC, principalmente debido a niveles aumentados de linfocitos T CD8+ totales, linfocitos CD8+TCR $\gamma\delta$ + y células NKTs. Esto se traducía tanto en una mejor respuesta ADCC frente a una diana inespecífica de células Raji recubiertas de rituximab, como en una mejor respuesta DCC frente a una diana específica de células Vero E6 infectadas con SARS-CoV-2 pseudotipado.
3. La respuesta inmunitaria de tipo celular aumentada presentada por los pacientes con MM podría deberse tanto al propio proceso canceroso como al tratamiento con fármacos inmunomodulares como lenalidomida que reciben estos pacientes.
4. La respuesta inmunitaria humoral y celular desarrollada por pacientes con LMC es muy similar a los donantes sanos, probablemente gracias al tratamiento crónico que reciben estos pacientes con fármacos ITKs.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Smitha T, Thomas A. A brief outlook on the current emerging trends of COVID 19 vaccines. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2020;24(2).
2. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. Available from: www.nature.com/nrmicro
3. Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S, et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*. 2020;581(7807).
4. McBride R, van Zyl M, Fielding BC. The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. Vol. 6, *Viruses*. 2014.
5. Kadam SB, Sukhramani GS, Bishnoi P, Pable AA, Barvkar VT. SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. Vol. 61, *Journal of Basic Microbiology*. 2021.
6. Li F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. Vol. 3, *Annual Review of Virology*. 2016.
7. Soto GP. Bases Genéticas y Moleculares del COVID-19 (SARS-CoV-2). *Mecanismos de Patogénesis y de Respuesta Inmune Genetic and Molecular Basis of COVID-19 (SARS-CoV-2) Mechanisms of Pathogenesis and Immune*. Vol. 14, *Int. J. Odontostomat*. 2020.
8. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. Vol. 19, *Nature Reviews Microbiology*. 2021.
9. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020;
10. Wahba L, Jain N, Fire AZ, Shoura MJ, Artiles KL, McCoy MJ, et al. An Extensive Meta-Metagenomic Search Identifies SARS-CoV-2-Homologous Sequences in Pangolin Lung Viromes. *mSphere*. 2020;5(3).
11. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. *Bangladesh Physiother J*. 2020;10(1).
12. Zhang H, Kang Z, Gong H, Xu D, Wang J, Li Z, et al. The digestive system is a potential route of 2019-nCov infection: a bioinformatics analysis based on single-cell transcriptomes. *bioRxiv*. 2020;
13. Zhao Y, Zhao Z, Wang Y, Zhou Y, Ma Y, Zuo W. Single-Cell RNA Expression Profiling of ACE2, the Receptor of SARS-CoV-2. Vol. 202, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2020.
14. Zou X, Chen K, Zou J, Han P, Hao J, Han Z. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Front Med*. 2020;14(2).
15. Xu H, Zhong L, Deng J, Peng J, Dan H, Zeng X, et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci*. 2020;12(1).
16. Hamming I, Timens W, Bulthuis MLC, Lely AT, Navis GJ, van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol*. 2004;203(2).
17. Li F, Li W, Farzan M, Harrison SC. Structural biology: Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. *Science* (80-). 2005;309(5742).
18. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020;181(2).
19. Liu C, Zhou Q, Li Y, Garner L V., Watkins SP, Carter LJ, et al. Research and Development on Therapeutic Agents and Vaccines for COVID-19 and Related Human Coronavirus Diseases. *ACS Cent Sci*. 2020;6(3).
20. Kow CS, Hasan SS. Real-world effectiveness of BNT162b2 mRNA vaccine: a meta-analysis of large observational studies. *Inflammopharmacology*. 2021;29(4).
21. Puranik A, Lenehan P, Silvert E, Niesen MJ, Corchado-Garcia J, O'Horo JC, et al.

- Comparison of Two Highly-Effective mRNA Vaccines for COVID-19 During Periods of Alpha and Delta Variant Prevalence. SSRN Electron J. 2021;
22. Voysey M, Clemens SAC, Madhi SA, Weckx LY, Folegatti PM, Aley PK, et al. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. *Lancet*. 2021;397(10269):99–111.
 23. Gong IY, Vijenthira A, Betschel SD, Hicks LK, Cheung MC. COVID-19 vaccine response in patients with hematologic malignancy: A systematic review and meta-analysis. Vol. 97, *American Journal of Hematology*. 2022.
 24. Chen L, Liu HG, Liu W, Liu J, Liu K, Shang J, et al. [Analysis of clinical features of 29 patients with 2019 novel coronavirus pneumonia]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. 2020;43(3).
 25. Patnaik MM, Lasho T. Myelodysplastic syndrome/myeloproliferative neoplasm overlap syndromes: A focused review. Vol. 20, *Hematology (United States)*. 2020.
 26. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. *Am J Hematol*. 2018;93(3).
 27. Houshmand M, Simonetti G, Circosta P, Gaidano V, Cignetti A, Martinelli G, et al. Chronic myeloid leukemia stem cells. *Leukemia [Internet]*. 2019;33:1543–56. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0490-0>
 28. Vosberg S, Greif PA. Clonal evolution of acute myeloid leukemia from diagnosis to relapse. *Genes Chromosom Cancer*. 2019;58(12).
 29. Minciacchi VR, Kumar R, Krause DS. Chronic myeloid leukemia: A model disease of the past, present and future. Vol. 10, *Cells*. 2021.
 30. Claudiani S, Apperley JF. The argument for using imatinib in CML. *Hematol (United States)*. 2018;2018(1).
 31. Thompson PA, Kantarjian HM, Cortes JE. Diagnosis and Treatment of Chronic Myeloid Leukemia in 2015. Vol. 90, *Mayo Clinic Proceedings*. 2015.
 32. Miura M. Therapeutic drug monitoring of imatinib, nilotinib, and dasatinib for patients with chronic myeloid leukemia. Vol. 38, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2015.
 33. Sauße S, Richter J, Hochhaus A, Mahon FX. The concept of treatment-free remission in chronic myeloid leukemia. Vol. 30, *Leukemia*. 2016.
 34. Cortes J, Rea D, Lipton JH. Treatment-free remission with first- and second-generation tyrosine kinase inhibitors. Vol. 94, *American Journal of Hematology*. 2019.
 35. Narra RK, Flynn KE, Atallah E. Chronic Myeloid Leukemia-The Promise of Tyrosine Kinase Inhibitor Discontinuation.
 36. Stuckey R, López Rodríguez JF, Gómez-Casares MT. Discontinuation of Tyrosine Kinase Inhibitors in Patients with Chronic Myeloid Leukemia: a Review of the Biological Factors Associated with Treatment-Free Remission. Vol. 24, *Current Oncology Reports*. 2022.
 37. Rajkumar SV, Kumar S. Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. Vol. 91, *Mayo Clinic Proceedings*. 2016.
 38. Castaneda O, Baz R. Multiple Myeloma Genomics-A Concise Review. *Narrat Rev Acta Medica Acad*. 2019;48(1):57–67.
 39. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2020 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2020;95(5).
 40. Rajkumar SV. Updated Diagnostic Criteria and Staging System for Multiple Myeloma. *Am Soc Clin Oncol Educ B*. 2016;(36).
 41. Eslick R, Talaulikar D. Multiple myeloma: From diagnosis to treatment. *Aust Fam Physician*. 2013;42(10).
 42. Minnie SAMinnie SA HG. Immunotherapy of multiple myeloma. *J Clin Invest [Internet]*. 2020; Available from: <https://doi.org/10.1172/JCI129205>.
 43. Minnie SA, Hill GR. Autologous Stem Cell Transplantation for Myeloma: Cyto-reduction or an Immunotherapy? *Front Immunol*. 2021;12.
 44. Zhu YX, Kortuem KM, Stewart AK. Molecular mechanism of action of immune-modulatory

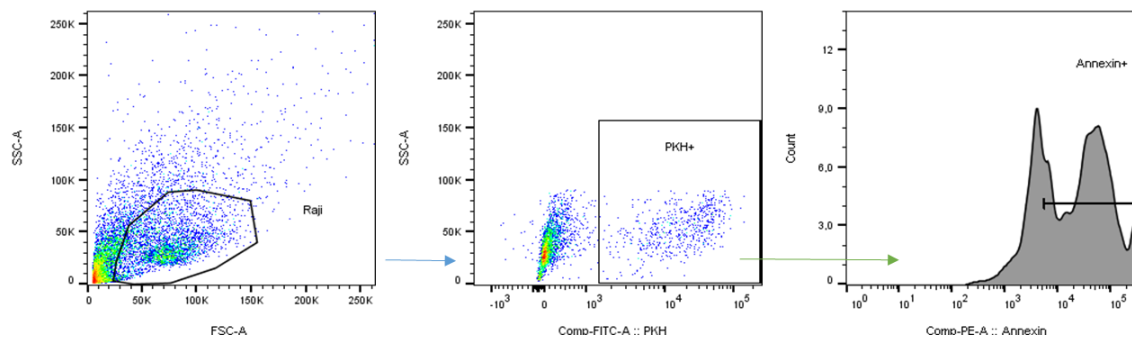
- drugs thalidomide, lenalidomide and pomalidomide in multiple myeloma. Vol. 54, *Leukemia and Lymphoma*. 2013.
45. Blimark C, Holmberg E, Mellqvist UH, Landgren O, Bjorkholm M, Hultcrantz M, et al. Multiple myeloma and infections: A population-based study on 9253 multiple myeloma patients. *Haematologica*. 2015;100(1).
 46. Tang L V., Hu Y. Poor clinical outcomes for patients with cancer during the COVID-19 pandemic. *Lancet Oncol*. 2020;21(7):862–4.
 47. Ludwig H, Boccadoro M, Moreau P, San-Miguel J, Cavo M, Pawlyn C, et al. Recommendations for vaccination in multiple myeloma: a consensus of the European Myeloma Network. Vol. 35, *Leukemia*. 2021.
 48. Laing AG, Lorenc A, del Molino del Barrio I, Das A, Fish M, Monin L, et al. A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. *Nat Med*. 2020;26(10).
 49. Birra D, Benucci M, Landolfi L, Merchionda A, Loi G, Amato P, et al. COVID 19: a clue from innate immunity. Vol. 68, *Immunologic Research*. 2020.
 50. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*. 2020;181(7).
 51. Bastard P, Rosen LB, Zhang Q, Zhang Y, Dorgham K, Béziat V, et al. IgG autoantibodies against type I IFNs in patients with severe COVID-19. *Science* (80-). 2020;4585(September).
 52. Garcia-Perez J, Sanchez-Palomino S, Perez-Olmeda M, Fernandez B, Alcami J. A new strategy based on recombinant viruses as a tool for assessing drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1. *J Med Virol*. 2007;79(2).
 53. Vigón L, Fuertes D, García-Pérez J, Torres M, Rodríguez-Mora S, Mateos E, et al. Impaired Cytotoxic Response in PBMCs From Patients With COVID-19 Admitted to the ICU: Biomarkers to Predict Disease Severity. *Front Immunol*. 2021;12.
 54. Pinaña JL, Perez A, Montoro J, Gimenez E, Gómez MD, Lorenzo I, et al. Clinical Effectiveness of Influenza Vaccination after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Cross-sectional, Prospective, Observational Study. *Clin Infect Dis*. 2019;68(11).
 55. Harrington P, de Lavallade H, Doores KJ, O'Reilly A, Seow J, Graham C, et al. Single dose of BNT162b2 mRNA vaccine against SARS-CoV-2 induces high frequency of neutralising antibody and polyfunctional T-cell responses in patients with myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2021;35(12).
 56. Ehmsen S, Asmussen A, Jeppesen SS, Nilsson AC, Østerlev S, Vestergaard H, et al. Antibody and T cell immune responses following mRNA COVID-19 vaccination in patients with cancer. Vol. 39, *Cancer Cell*. 2021.
 57. Anka AU, Tahir MI, Abubakar SD, Alsabbagh M, Zian Z, Hamedifar H, et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): An overview of the immunopathology, serological diagnosis and management. Vol. 93, *Scandinavian Journal of Immunology*. 2021.
 58. Stampfer SD, Goldwater MS, Jew S, Bujarski S, Regidor B, Daniely D, et al. Response to mRNA vaccination for COVID-19 among patients with multiple myeloma. *Leukemia*. 2021;35(12).
 59. Ludwig H, San-Miguel J, Munshi N, Sonneveld P, Mateos MV, Moreau P, et al. Covid-19 vaccination in patients with multiple myeloma: Focus on immune response. Vol. 96, *American Journal of Hematology*. 2021.
 60. Shimizu Y, Inoue H, Hishinuma S, Shoji M. Nadir lymphocytopenia as a risk factor of bloodstream infection during molecular targeting pharmacotherapy in multiple myeloma. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2019;57(11).
 61. Babaei MA, Kamalidehghan B, Saleem M, Huri HZ, Ahmadipour F. Receptor tyrosine kinase (c-Kit) inhibitors: A potential therapeutic target in cancer cells. Vol. 10, *Drug*

- Design, Development and Therapy. 2016.
62. Wang TT, Ravetch J V. Functional diversification of IgGs through Fc glycosylation. *J Clin Invest.* 2019;129(9):3492–8.
 63. Ministerio de Sanidad, Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios. Informe de Posicionamiento Terapéutico de lenalidomida mieloma múltiple. 2018;1–7.
 64. Holstein SA, Suman VJ, McCarthy PL. Update on the role of lenalidomide in patients with multiple myeloma. *Ther Adv Hematol.* 2018;9(7).
 65. Timothy E. O’Sullivan, Joseph C. Suna, and LLL. Natural Killer Cell Memory Timothy. *Cell Rep.* 2015;43(4):634–45.
 66. Embi PJ, Levy ME, Naleway AL, Patel P, Gaglani M, Natarajan K, et al. Effectiveness of 2-Dose Vaccination with mRNA COVID-19 Vaccines Against COVID-19–Associated Hospitalizations Among Immunocompromised Adults — Nine States, January–September 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2021;70(44).
 67. Barbui T, Iurlo A, Masciulli A, Carobbio A, Ghirardi A, Carioli G, et al. Second versus first wave of COVID-19 in patients with MPN. Vol. 36, *Leukemia.* 2022.
 68. Jimenez M, Roldan E, Fernandez-Naval C, Villacampa G, Martinez-Gallo M, Medina-Gil D, et al. Cellular and humoral immunogenicity of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine in patients with hematologic malignancies. *Blood Adv.* 2022;6(3).
 69. Harrington P, Doores KJ, Radia D, O’Reilly A, Lam HPJ, Seow J, et al. Single dose of BNT162b2 mRNA vaccine against severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) induces neutralising antibody and polyfunctional T-cell responses in patients with chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2021;194(6).
 70. Bird S, Panopoulou A, Shea RL, Tsui M, Saso R, Sud A, et al. Response to first vaccination against SARS-CoV-2 in patients with multiple myeloma. Vol. 8, *The Lancet Haematology.* 2021.

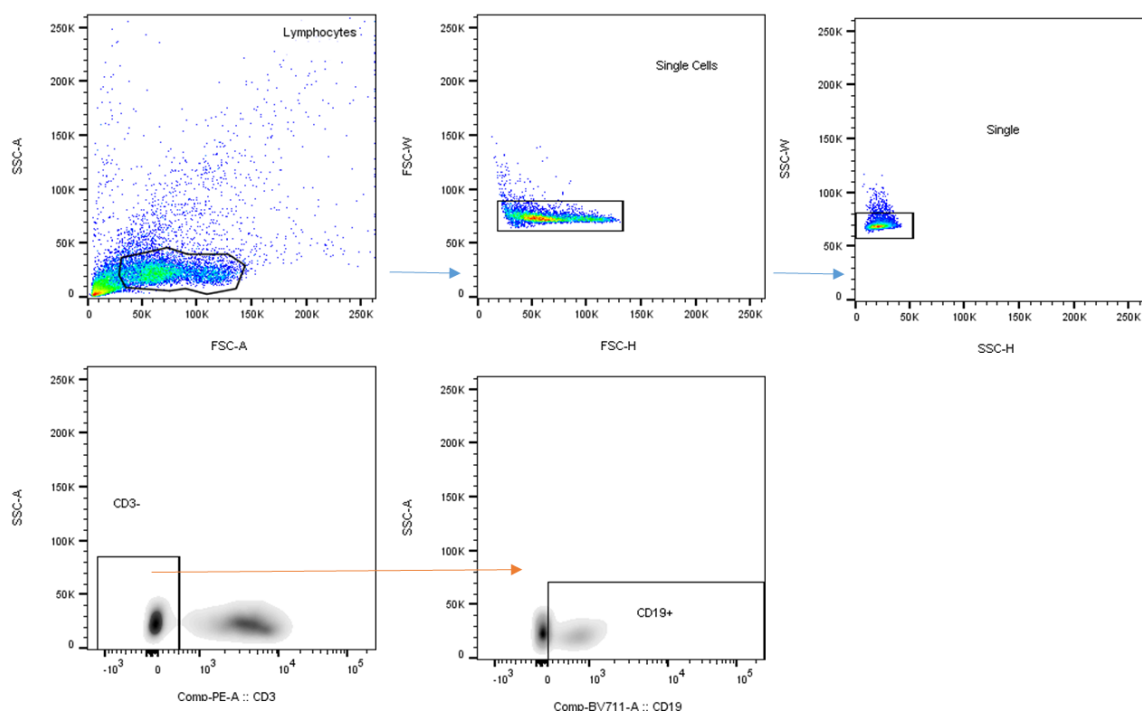
8. ANEXO I. Estrategia de gateo para citometría de flujo

La estrategia de gateo es una técnica que se utiliza en citometría de flujo para analizar las diferentes subpoblaciones celulares. Para ello, se selecciona manualmente la región del espacio que interesa analizar, de acuerdo a los marcadores de superficie y a los fluorocromos utilizados. En el caso de este estudio se han utilizado tres estrategias diferentes según la información que se quisiera obtener:

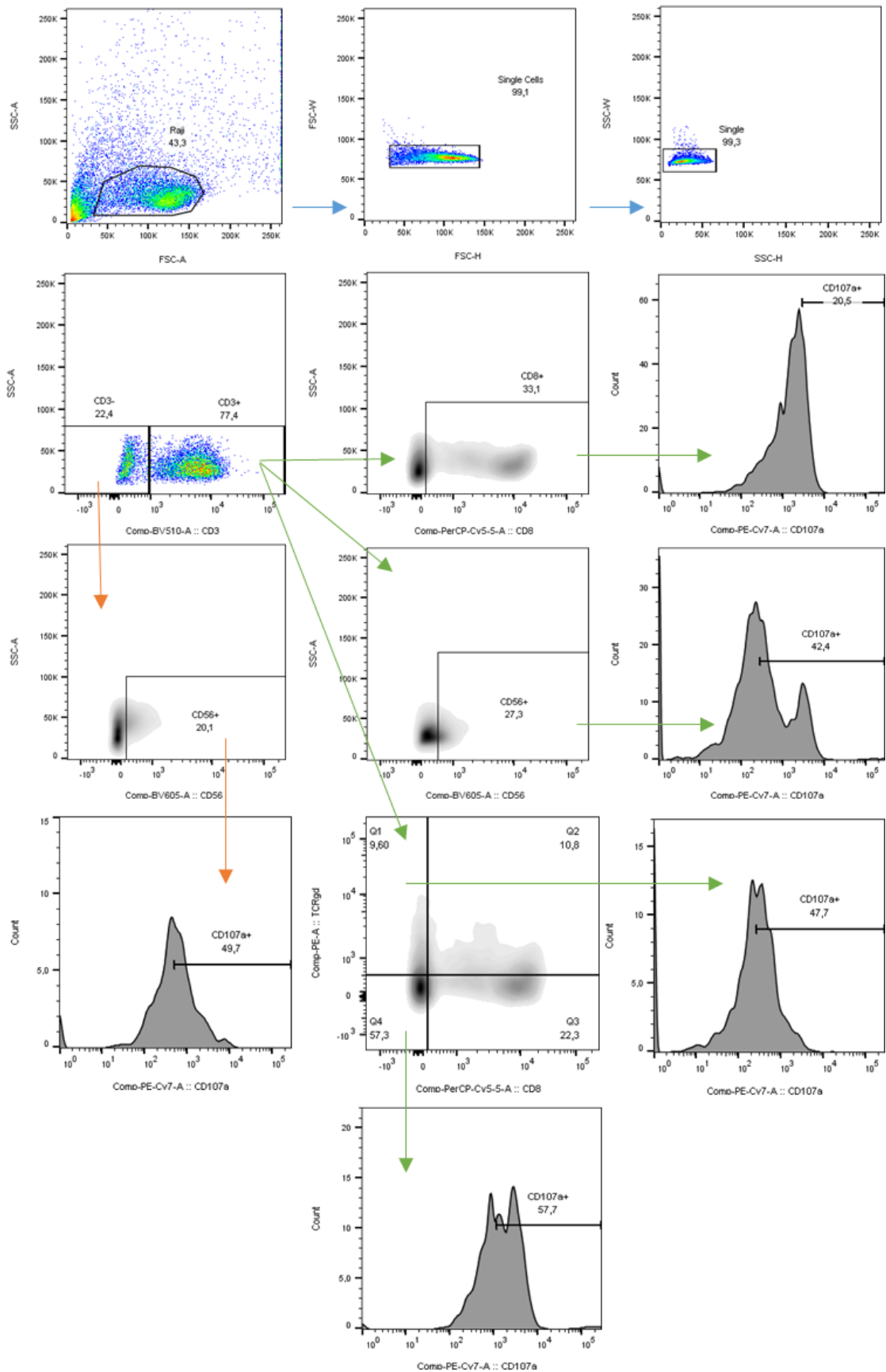
A). Determinación de la apoptosis en células Raji utilizando como marcador la Anexina-V:



B). Determinación del porcentaje de linfocitos B presentes en las PBMCs de los tres grupos de estudio mediante el marcador de superficie CD19+:



C) Determinación de las subpoblaciones celulares para analizar la respuesta ADCC como la DCC:



9. ANEXO II. Características sociodemográficas de los participantes en el estudio

En la siguiente tabla se especifican los datos de los voluntarios en el momento de obtención de las muestras. Los nombres de los participantes han sido sustituidos por un código propio del grupo de Inmunopatología del SIDA por motivos de confidencialidad.

	Código ISCIH	Sexo	Edad (años)	Vacuna	Tratamiento
Voluntarios sanos	CTV_36	M	37	PFIZER	No
	CTV_48	M	40	PFIZER	No
	CTV_49	H	42	PFIZER	No
	CTV_67	M	46	PFIZER	No
	CTV_68	M	24	PFIZER	No
	CTV_75	H	48	PFIZER	No
	CTV_78	M	30	PFIZER	No
	CTV_87	M	36	PFIZER	No
	CTV_88	M	35	PFIZER	No
	CTV_91	H	47	PFIZER	No
Pacientes LMC	OHC_3	H	73	PFIZER	TTO ITK
	OHC_4	M	69	ASTRAZENECA	TTO ITK
	OHC_5	H	57	MODERNA	TTO ITK
	OHC_7	M	48	MODERNA	TTO ITK
	OHC_8	M	75	PFIZER	TTO ITK
	OHC_9	H	82	PFIZER	TTO ITK
	OHC_11	M	85	PFIZER	LMC DISC
	OHC_15	H	83	PFIZER	TTO ITK
	OHC_25	M	68	ASTRAZENECA	TTO ITK
	OHC_28	M	66	MODERNA	TTO ITK
	OHC_32	H	57	MODERNA	TTO ITK
	OHC_34	H	73	MODERNA	TTO ITK
	OHC_35	M	75	PFIZER	LMC DISC
	OHC_37	M	65	MODERNA	TTO ITK
	OHC_41	M	51	MODERNA	TTO ITK
	OHC_47	H	61	ASTRAZENECA	TTO ITK
	OHC_48	M	55	MODERNA	TTO ITK
	OHC_49	M	58	MODERNA	TTO ITK
	OHC_97	H	59	MODERNA	TTO ITK
	OHC_110	H	52	PFIZER	LMC DISC
OHC_153	M	81	PFIZER	TTO ITK	
OHC_163	M	37	MODERNA	TTO ITK	
OHC_169	H	65	MODERNA	TTO ITK	
	OHC_21	M	78	PFIZER	MM NO

Pacientes MM	OHC_43	H	55	MODERNA	MM TASPE
	OHC_56	M	74	PFIZER	MM NO
	OHC_58	M	79	PFIZER	MM NO
	OHC_68	M	73	MODERNA	MM NO
	OHC_75	M	68	MODERNA	MM TASPE
	OHC_82	H	54	MODERNA	MM TASPE
	OHC_94	H	69	MODERNA	MM TASPE
	OHC_109	H	71	MODERNA	MM TASPE
	OHC_111	M	73	MODERNA	MM NO
	OHC_113	H	71	MODERNA	MM TASPE
	OHC_135	M	68	MODERNA	MM TASPE
	OHC_144	H	73	MODERNA	MM TASPE
	OHC_152	H	45	MODERNA	MM TASPE
	OHC_154	M	73	MODERNA	MM TASPE
	OHC_157	H	77	MODERNA	MM NO
	OHC_158	M	78	MODERNA	MM TASPE
	OHC_165	H	74	MODERNA	MM NO
OHC_170	H	65	MODERNA	MM TASPE	

TTO ITK: tratamiento con ITK.

LMC DISC: tratamiento discontinuado.

MM NO: paciente en tratamiento, pero no trasplantado.

MM TASPE: paciente trasplantado.

10. ANEXO III. Sostenibilidad social

Este estudio es innovador y relevante teniendo en cuenta el criterio de sostenibilidad ambiental, que hace referencia a la salud, seguridad y estabilidad de las personas.

Como se ha mencionado a lo largo del trabajo, las personas con EOH no han sido incluidas en los estudios de eficacia de las vacunas contra el SARS-CoV-2 y por ello, es importante determinar qué respuesta genera esta en este tipo de pacientes, con el objetivo de mejorar su calidad de vida y prevenir la COVID-19, que también se ha determinado que es más agresiva en este tipo de pacientes por sus enfermedades y los tratamientos que reciben. Este estudio propone un análisis multidireccional de la respuesta inmunológica que podría ayudar a incrementar el bienestar de los pacientes.

11. ANEXO IV. Agradecimientos

A Sara Rodríguez, por tu generosidad, por acompañarme durante todo el proceso, enseñarme con tanta paciencia e intentar que me lleve la mejor experiencia posible en el camino.

A Manuel Olazábal, por hacer mucho más de lo estrictamente necesario, por todas tus preguntas e interés por el trabajo. Gracias por ser el mejor tutor interno que podía tener.

A María Teresa Coira y al grupo de Inmunopatología del SIDA, por ser tan amables y acogedores, por compartir conocimiento, consejos y cabinas. Sin vuestro apoyo no habría salido un trabajo tan completo.

A Alejandro Ruiz y a mis padres, porque todos mis méritos son también vuestros.

A mí misma, por permitirme DISFRUTAR en el laboratorio.