



Universidad de Alcalá

Ciencias de la Salud

CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y CELULAR DESARROLLADA TRAS LA VACUNACIÓN PARA COVID-19 EN PACIENTES CON NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

Tesis Doctoral presentada por
MAGDALENA CORONA DE LAPUERTA

Directores

Dr. José Valentín García Gutiérrez
Dra. María Teresa Coiras López

Alcalá de Henares, 2023



Universidad de Alcalá

Ciencias de la Salud

**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL
Y CELULAR DESARROLLADA TRAS LA VACUNACIÓN
PARA COVID-19 EN PACIENTES CON NEOPLASIAS
HEMATOLÓGICAS**

Tesis Doctoral presentada por
MAGDALENA CORONA DE LAPUERTA

2023

*“Y aun así siempre luchando, siempre reafirmando,
siempre retomando su marcha en el camino que estaba iluminado por la luz;
a menudo deteniéndose, vagabundeando, extraviándose, retrasándose,
volviendo, pero jamás siguiendo otro camino”.*

*T. S. Elliot
“La Roca”. Coros.*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, gracias a mis tutores, Valentín y Mayte, por estos años de apoyo y enseñanza, en lo personal y lo profesional. Gracias por tener la paciencia de enseñarme y ayudarme desde que empecé en el hospital y todavía hoy. Gracias por los consejos en cualquier momento y el privilegio de haberme incorporado a un equipo de investigación de tan altísimo nivel, y continuar sorprendiéndome y dándome vuestra confianza para participar en nuevos proyectos. Teniéndooos delante he aprendido a dar siempre más que lo justamente necesario y he disfrutado muchísimo del lujo de aprender con vosotros. Gracias también a vuestros dos equipos: al del ISCIII por la enorme paciencia que habéis mostrado todos al intentar enseñar vuestra magia a una pobre “muggle” que apenas había cogido una pipeta en su vida, y al del RyC, que ha sido mi casa y refugio durante 4 años.

Por supuesto a mis padres, sencillamente por todo, pero sobre todo por formar la mejor familia que una podría tener y que ahora todos vuestros hijos deseamos: habéis dejado el listón muy alto. Por querernos lo suficiente como para enseñarnos a volar y, ahora que nos vamos, irnos con la seguridad de que tenemos siempre la “casa dove posso tornare”. Especialmente también por quererme con mis “cosas”... que son muchas.

A mis cuatro hermanos, compañeros de fechorías y viajes. Fuisteis mi gran decepción cuando, parto tras parto, comprendí que no íbamos a incorporar otra mujer a la familia, pero crecer con vosotros ha sido la aventura más divertida que se pueda imaginar. No ha sido fácil seguiros el ritmo, pero soy mucho mejor por teneros y haberos tenido conmigo. Sé que me esperarán años de burla por esta cursilería.

A los abuelos del cielo y la abuela Marilena, especialmente por enseñarnos que la sencillez de un “sí” aparentemente pequeño, puede dar lugar a una inmensa y desproporcionada obra. Gracias por ser los fans más incondicionales y orgullosos de vuestros nietos.

A “los pantuflos” o “los innombrables”. Recuerdo especialmente esos primeros meses de pandemia en los que vuestros Zoom semanales me ayudaban a levantar la mirada más allá de la aparente desolación del hospital. Sin eso no hubiera podido empezar el proyecto de los COVID y esta tesis no existiría.

Por supuesto, a nuestros queridos pacientes. Nada de esto tendría sentido si no es por y para vosotros. Mil gracias por todo lo que nos enseñáis y por recordarnos que es por vosotros que tenemos la profesión más bonita del mundo. Particularmente gracias por estar siempre dispuestos a participar en todo lo que os pidamos, incluso en tiempos de pandemia, en los que el solo hecho de venir al hospital daba pavor.

ABREVIATURAS

ABVD	Adriamicina, Bleomicina, Vinblastina, Dacarbazina
ADCC	Antibody Dependent Cytotoxic Cellular Response / Respuesta Celular Citotóxica dependiente de anticuerpos
AgII	Angiotensina II
AgII-AT1R	Vía de la angiotensina II-Receptor de la angiotensina tipo 1
AHAI	Anemia Hemolítica Autoinmune
AIHA	Autoimmune Hemolytic Anemia / Anemia Hemolítica Autoinmune
ALL	Acute Lymphoblastic Leukemia / Leucemia Linfoblástica Aguda
Allo-HSCT	Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant / Trasplante Hematopoyético Alogénico de Médula Ósea
Alo-TPH	Trasplante Alogénico de Médula Ósea
APA	Advance Purchase Agreement / Acuerdos de Adquisición Anticipada
APC	Aloficocianina
ASCT	Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplant / Trasplante Hematopoyético Autólogo de Médula Ósea
AT2	Células Alveolares tipo II
Auto-HSCT	Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplant / Trasplante Hematopoyético Autólogo de Médula Ósea
BTKis	Bruton Tyrosin-Kinase Inhibitors / Inhibidores Tirofín Kinasa de Bruton
BV-B	Brentuximab Vedotín, Bendamustina
BV-ESHAP	Brentuximab Vedotin, Etopósido, Cisplatino, Citarabina, Prednisona
cGvHD	Chronic Graft versus Host Disease / Enfermedad Injerto contra Receptor Crónica
CI	Confidence Interval/ Intervalo de Confianza
CIBMTR	Center for International Blood and Marrow Transplant Research
CLL	Chronic Lymphocytic Leukemia / Leucemia Linfocítica Crónica
CML	Chronic Myeloid Leukemia / Leucemia Mieloide Crónica
cMPN	Chronic Myeloproliferative Neoplasms / Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas
CMV	Cytomeglovirus / Citomeglovirus

CPAP	Continuous Positive Airway Pressure / Presión Positiva Continua en la Vía Respiratoria
Cy	Cyclophosphamide / Ciclofosfamida
CyBorD	Ciclofosfamida, Bortezomib, Dexametasona
DCC	Direct Cellular Cytotoxicity / Citotoxicidad Celular Directa
DL	Dislipemia
DLBCL	Diffuse Large B Cell Lymphoma / Linfoma B Difuso de Célula Grande
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DVMP	Daratumumab, Bortezomib, Melfalán, Prednisona
EBMT	European Society of Bone Marrow Transplantation
ECA2	Enzima Convertidora de la Angiotensina 2
EEUU	Estados Unidos de América
EGFR	Epidermic Growth Factor Receptor / Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico
EICR	Enfermedad Injerto contra Huesped Crónica
ELN	European Leukemia Net
EMA	European Medicines Agency / Agencia Europea del Medicamento
ESPII	Emergencia de Salud Pública de Importancia Internacional
EUA	Emergency Use Authorization / Autorización de Uso de Emergencia
EUL	Emergency Use Listing Procedure
FDA	Food and Drug Administration / Agencia de Alimentos y Medicamentos
FiO2	Fracción de Oxígeno Inspirado
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
H2O	Agua
HBV	Hepatitis B Virus / Virus Hepatitis B
HCQ	Hidrocloroquina
HepB-CpG	Vacuna recombinante de la Hepatitis B
HIV	Human Immunodeficiency Virus / Virus de la Inmunodeficiencia Humana
HL	Hodgkin Lymphoma / Linfoma de Hodgkin

HLA	Human Leukocyte Antigen / Antígeno Leucocitario Humano
HRyC	Hospital Ramón y Cajal
HSCT	Hematopoietic Stem Cell Transplant / Trasplante Hematopoyético de Médula Ósea
Hsp70	Proteína de choque térmico de 70 dalton
HTA	Hipertensión arterial
ICU	Intensive Care Unit / Unidad de Cuidados Intensivos
ID50	Dosis Inhibitoria al 50%
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleukin / Interleuquina
IQR	Interquartile range / Rango Intercuartílico
ISCI	Instituto de Salud Carlos III
IT	Immune Thrombopenia / Trombopenia inmune
ITK	Inhibidores de Tirocín Kinasa
KDRd	Carfilzomib, Lenalidomida, Dexametasona, Daratumumab
Ld	Lenalidomida, Dexametasona
LH	Linfoma de Hodgkin
LLC	Leucemia Linfocítica Crónica
LMC	Leucemia Mieloide Crónica
LNH	Linfoma No Hodgkin
MDS	Myelodysplastic Syndrome / Síndrome Mielodisplásico
MHC	Major Histocompatibility Complex / Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MM	Mieloma Múltiple
MMF	Mycophenolate mofetil / Micofenolato Mofetilo
mmHg	Miligramos de Mercurio
mRNA	RNA mensajero
MTX	Methotrexate / Metotrexato

N/A	No Aplica
NK	Natural Killer
NF-κB	Factor Nuclear Potenciador de las Cadenas Ligeras Kappa de las Células B Activadas
NHL	Non-Hodgkin Lymphoma / Linfoma No Hodgkin
NO	Óxido Nitroso
OHD	Oncohematological Diseases / Enfermedades Oncohematológicas
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Open Reading Frame / Marco Abierto de Lectura
PaO2	Presión Parcial de Oxígeno
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells / Células Mononucleares de Sangre Periférica
PBR	Polatuzumab Vedotin, Bendamustina, Rituximab
PCV	Pneumococcal Conjugate Vaccine / Vacuna Conjugada del Neumococco
PE	Phycoerythrin / Ficoeritrina
PEEP	Positive End-Expiratory Pressure / Presión Positiva al final de la Espiración
PerCP	Proteína Clorofila Peridinina
Proteína E	Proteína de la Envoltura
Proteína M	Proteína de la Membrana
Proteína N	Proteína de la Nucleocápside
Proteína S	Proteína de la Superficie
PS	Vacuna Polisacárida del Pneumococco
PTI	Primary Immune Thrombocytopenia / Trombopenia Primaria Inmune
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction / Reacción Cuantitativa en Cadena de la Polimerasa
R	Rituximab
R-CHOP	Rituximab, Ciclofosfamida, Vincristina, Doxorrubicina, Prednisona
RBD	Receptor Binding Domain / Dominio de Unión al Receptor
RC	Respuesta Completa
RLUs	Relative Light Unit / Unidad de Luz Relativa

RNA	Ácido Ribonucleico
RP	Respuesta Parcial
Rs-IL-6	Receptor Soluble de la Interleuquina 6
RT-qPCR	Quantitative Reverse Transcription PCR / PCR con Transcriptasa Inversa Cuantitativa
RZV	Recombinant Zoster Varicella Virus Vaccine / Vacuna Recombinante del Virus Varicella Zoster
SARS	Síndrome Respiratorio Agudo Severo
SARS-CoV	Síndrome Respiratorio Agudo Severo Coronavirus
SARS-CoV-2	Síndrome Respiratorio Agudo Severo Coronavirus 2
SEHH	Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia
SEM	Standard Deviation of the Mean / Error Medio Estándar
SLE	Systemic Lupus Erythematosus / Lupus Eritematoso Sistémico
SpO2	Saturación de Oxígeno
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3 / Transductor de señal y activador de la transcripción 3
TASPE	Trasplante Autólogo de Médula Ósea
TFR	Treatment-Free Remission / Remisión Libre de Tratamiento
TGF	Tumor Growth Factor / Factor de Crecimiento Tumoral
TKI	Tyrosin Kinase Inhibitors / Inhibidores de Tirocín Kinasa
TMPRSS2	Transmembrane Serine Protease 2 / Serina Proteasa Celular de Transmembrana
TNF	Tumor Necrosis Factor / Factor de necrosis tumoral
Ud	Undefined / Indeterminado
UVI	Unidad de Vigilancia Intensiva
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor / Factor de Crecimiento Vascular Endotelial
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VOC	Variant of Concern / Variante Preocupante
VOI	Variant of Interest / Variante de Interés
VRd	Bortezomib, Lenalidomida, Dexametasona

VSV	Vesicular Stomatitis Virus / Virus de la estomatitis vesicular
VUM	Variant Under Monitoring / Variante Bajo Vigilancia
WHO	World Health Organization / Organización Mundial de la Salud
WW	Watch and wait

Índice

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	25
1.1. Virus SARS-CoV-2	27
1.1.1. Historia del virus SARS-CoV-2.....	27
1.1.2. Estructura del SARS-CoV-2	27
1.1.3. Patogenia del SARS-CoV-2	29
1.1.4. Tormenta de citoquinas e hiperinflamación secundaria a infección por SARS-CoV-2....	29
1.1.4.1. Hipercoagulabilidad.....	31
1.1.4.2. Síndrome respiratorio agudo severo	31
1.1.5. Clasificación de la gravedad de la infección COVID-19	32
1.2. Pacientes oncohematológicos y COVID-19	33
1.2.1. Pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica (LLC).....	33
1.2.2. Pacientes con Leucemia Mieloide Crónica (LMC)	34
1.2.3. Pacientes con Mieloma Múltiple (MM).....	34
1.2.4. Pacientes que reciben un trasplante alogénico de médula ósea (Alo-TPH).....	35
1.2.5. Pacientes que reciben un trasplante autólogo de médula ósea (TASPE).....	35
1.2.6. Pacientes que reciben tratamiento con rituximab	35
1.3. Vacunación frente a la COVID-19	36
1.3.1. Vacunas frente a la COVID-19 comercializadas en España.....	36
1.3.1.1. Comirnaty (BNT162b2 mRNA, Pfizer-BioNTech)	36
1.3.1.2. Spikevax (mRNA-1273, Moderna)	37
1.3.1.3. Vaxzevria (ChAdOx1 nCoV-19, AstraZeneca).....	38
1.3.1.4. Jcovden (Ad26.COV2-S, Janssen)	38
1.3.2. Campaña de vacunación frente al SARS-CoV-2 en España: vacunación de pacientes hematológicos.....	39
1.3.3. Eficacia de las vacunas frente a las nuevas variantes.....	39
1.4. Respuesta inmune a otras vacunas en pacientes con neoplasias oncohematológicas.	42
CAPÍTULO 2. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	45
CAPÍTULO 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	51
CAPÍTULO 4. MATERIAL Y MÉTODOS	55
4.1. Diseño del estudio	57
4.2. Grupos poblacionales	57

4.3. Análisis de la respuesta inmune	58
4.3.1. Procesamiento de las muestras.....	58
4.3.2. Subpoblaciones linfocitarias de estirpe B	59
4.3.3. Respuesta serológica de SARS-CoV-2	59
4.3.4. Capacidad neutralizante de los anticuerpos	59
4.3.5. Respuesta celular citotóxica dependiente de anticuerpos (ADCC).	61
4.3.6. Respuesta celular citotóxica directa	62
4.3.7. Caracterización de poblaciones citotóxicas: linfocitos T, células NK y células NKT	62
4.4. Infecciones de brecha	63
4.5. Análisis estadístico	63
4.6. Aspectos Éticos y financiación	63

CAPÍTULO 5. RESULTADOS

5.1. “Strong cellular immune response, but not humoral, against SARS-CoV-2 in oncohematological patients with Autologous Stem Cell Transplantation after Natural Infection”	67
5.1.0. PRESENTACIÓN.....	69
5.1.1. RESULTS	69
5.1.1.1. Patient Cohorts	69
5.1.1.2. Changes in B Cells Subpopulations in Individuals after ASCT.....	71
5.1.1.3. Effect of ASCT on the Levels of IgG against SARS-CoV-2 and Their Neutralization Capacity	72
5.1.1.4. Enhanced ADCC Activity in PBMCs from Oncohematological Individuals after ASCT..	73
5.1.1.5. Direct Cytotoxic Activity of PBMCs against SARS-CoV-2-Infected Cells	74
5.1.1.6. Synthesis of Cytokines by Cytotoxic Populations	74
5.1.2. DISCUSSION	76
5.2. “Early cellular and humoral responses developed in oncohematological patients after vaccination with one dose against COVID-19”	79
5.2.0. PRESENTACIÓN	81
5.2.1. RESULTS.....	81
5.2.1.1. Patients’ Cohorts	81
5.2.1.2. Early Serological Response after One Dose of SARS-CoV-2 Vaccine	83
5.2.1.3. Early Changes in B Cell Subpopulations after One Dose of SARS-CoV-2 Vaccine...84	
5.2.1.4. Impaired Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in PBMCs from Individuals with OHD	86
5.2.1.5. Viral Neutralization and Direct Cellular Cytotoxicity against Cells Infected with Pseudotyped SARS-CoV-2.....	86

5.2.1.6. Characterization of Cellular Cytotoxic Populations	88
5.2.2. DISCUSSION	90
5.2.3. CONCLUSIONS.....	92
5.3. “Persistent immunity against SARS-CoV-2 in individuals with oncohematological diseases who underwent autologous or allogeneic stem cell transplantation after vaccination”	93
5.3.0. PRESENTACIÓN	95
5.3.1. RESULTS.....	95
5.3.1.1. Patients’ Cohorts	95
5.3.1.2. SARS-CoV-2 Breakthrough Infection.....	98
5.3.1.3. Levels of IgGs against SARS-CoV-2 before and after HSCT.....	99
5.3.1.4. Changes in B Cell Subpopulations after HSCT	100
5.3.1.5. Cytotoxic Cellular Immune Responses against SARS-CoV-2 before and after HSCT	101
5.3.1.6. Characterization of Cytotoxic Cell Populations in PBMCs of Transplanted Individuals.....	103
5.3.2. DISCUSSION	107
5.3.3. CONCLUSIONS.....	108
5.4. “Strong humoral but not cellular immune responses against SARS-CoV-2 in individuals with oncohematological disease who were treated with rituximab before receiving a vaccine booster” .	109
5.4.0. PRESENTACIÓN	111
5.4.1. RESULTS.....	111
5.4.1.1. Patients’ Characteristics	111
5.4.1.2. Serological Response against COVID-19 Vaccination.....	113
5.4.1.3. Analysis of B-Cell Subpopulations	113
5.4.1.4. Antibody-Dependent Cellular Cytotoxic Response of PBMCs from Rituximab-Treated Individuals.....	115
5.4.1.5. Specific Direct Cellular Cytotoxicity of PBMCs and Viral Neutralization	117
5.4.3.6. Breakthrough Infections.....	119
5.4.2. DISCUSSION	119
5.4.3. CONCLUSIONS.....	122
5.5. Infecciones de brecha.....	123
CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN	127
6.1. Bloque I: Determinación de la respuesta inmune celular y humoral de pacientes con neoplasias hematológicas que se someten a un TASPE tras padecer una infección natural por COVID-19.	129

6.2. Bloque II: Determinación de la respuesta inmune celular y humoral temprana de pacientes con LMC, MM, LLC y Alo-TPH tras la primera dosis de la vacuna frente a la COVID-19..... 131

6.3. Bloque III: Determinación de la respuesta inmune celular y humoral de pacientes vacunados para la COVID-19 que se someten posteriormente a un trasplante de médula ósea 132

6.4. Bloque IV: Determinación de la respuesta inmune celular y humoral tras el booster para la COVID-19 en pacientes tratados previamente con rituximab..... 133

6.5. Bloque V: Infecciones de brecha 134

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES 137

CAPÍTULO 8. REFERENCIAS 141

CAPÍTULO 9. PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES 167

Índice de tablas

Tabla 1. Definición de Berlín para SARS.....	32
Tabla 2. Clasificación de la gravedad del COVID-19 en adultos	33
Table 3. Clinical characteristics of oncohematological patients with post-COVID-19 autologous transplantation and healthy donors	70
Table 4. Baseline demographic and clinical characteristics of the individuals with oncohematological diseases (OHD)	82
Table 5. Sociodemographic and clinical data of the individuals with allogeneis or autologous transplantation	97
Table 6. Sociodemographic and clinical data of the healthy donors.	98
Table 7. Baseline sociodemographic and clinical characteristics of the individuals with hematological disease.....	112
Table 8. Infecciones de brecha en pacientes oncohematológicos.....	126

Índice de figuras

Figura 1. Estructura y patogénesis del SARS-CoV-2	28
Figura 2. Mecanismo de acción de las vacunas mRNA.....	37
Figura 3. Mecanismo de acción de vacunas con virus modificados.....	38
Figura 4. Variantes predominantes en España e infecciones reportadas de septiembre de 2020 a mayo de 2022	40
Figura 5. Hospitalizaciones en EEUU durante el período de la variante delta y ómicron para pacientes vacunados y no vacunados	41
Figura 6. Diseño del estudio	57
Figura 7. Determinación de la capacidad neutralizante del plasma.....	60
Figura 8. Respuesta celular citotóxica dependiente de anticuerpos (ADCC)	61
Figura 9. Respuesta celular citotóxica directa (DCC).....	62
Figura 10. Diseño del estudio del capítulo 5.1	69
Figure 11. Analysis of the distribution of B cell subpopulations in individuals with oncohematological neoplasms after ASCT	71
Figure 12. Levels of IgGs and neutralizing activity against SARS-CoV-2 in individuals with oncohematological neoplasms before and after ASCT.....	72
Figure 13. Analysis of ADCC in individuals with oncohematological neoplasms after ASCT	73
Figure 14. Analysis of DCC and cytotoxic cell populations in individuals with oncohematological neoplasms after ASCT	74
Figure 15. Analysis of NK, NKT and CD8+ T cell functionality in individuals with oncohematological neoplasms after ASCT	75
Figura 16. Diseño del estudio del capítulo 5.2.....	81
Figure 17. Serological response against SARS-CoV-2 in plasma from individuals with OHD	84
Figure 18. Total levels and subpopulations of B cells in PBMCs of individuals with OHD before and after receiving one-dose vaccine against SARS-CoV-2.....	85
Figure 19. ADCC response against SARS-CoV-2 vaccine of PBMCs from individuals with OHD	86
Figure 20. DCC and viral neutralization activity against SARS-CoV-2 infected cells of PBMCs of individuals with OHD before and after receiving one-dose vaccine	87

Figure 21. Characterization of the cellular cytotoxic populations in PBMCs from individuals with OHD before and after receiving one-dose vaccination	89
Figure 22. Characterization of CD3+CD8 TCR $\gamma\delta$ + cells in PBMCs from individuals with OHD before and after receiving one-dose vaccination.....	90
Figura 23. Diseño del estudio del capítulo 5.3.	95
Figure 24. Serological response against SARS-CoV-2 in plasma from individuals with OHD subjected to Allo- and Auto-HSCT	99
Figure 25. Total levels and subpopulations of B cells in PBMCs of individuals with OHD before and after receiving HSCT	100
Figure 26. ADCC and DCC responses against SARS-CoV-2 of PBMCs from individuals with OHD subjected to HSCT.....	102
Figure 27. Characterization of total lymphocytes and CD8+ T cells in PBMCs from individuals with OHD before and after receiving Allo- or Auto-HSCT	104
Figure 28. Characterization of TCR $\gamma\delta$ + cells in PBMCs from individuals with OHD before and after receiving Allo- or Auto-HSCT	105
Figure 29. Characterization of NK and NKT-like cells in PBMCs from individuals with OHD before and after receiving Allo- or Auto-HSCT	106
Figure 30. Diseño del estudio del capítulo 5.4.	111
Figure 31. Serological response against COVID-19 vaccine in plasma of rituximab-treated patients and healthy donor before and after receiving the booster dose.....	113
Figure 32. Total levels of B cells and distribution of B-cell subpopulations in PBMCs of rituximab-treated patients and healthy donors before and after receiving the booster dose.....	114
Figure 33. Analysis of ADCC response of PBMCs from rituximab-treated patients and healthy donors before and after receiving the booster dose of COVID-19 vaccine	116
Figure 34. Analysis of DCC response of PBMCs from rituximab-treated patients and healthy donors before and after receiving the booster dose of COVID-19 vaccine	118

RESUMEN

Los pacientes oncohematológicos han sido una población especialmente susceptible a la COVID-19 desde el inicio de la pandemia. Esto ha motivado un interés especial en asegurar en ellos una pronta vacunación frente a la COVID-19, si bien se desconocía la eficacia que se podría obtener en individuos severamente inmunodeprimidos y que habían sido excluidos de los ensayos clínicos de las vacunas.

El propósito de esta tesis, presentada por compendio de 4 artículos, es describir la respuesta inmune humoral y celular de 211 individuos con neoplasias oncohematológicas, divididos en cohortes bien definidas por tipo de enfermedad y tratamiento. Para ello realizamos un seguimiento durante 16 meses estudiando, en distintos momentos de la vacunación, títulos de anticuerpos, capacidad de neutralización, subpoblaciones citotóxicas y de linfocitos B, estudios de inmunidad celular directa sobre células epiteliales infectadas con SARS-CoV-2 e inmunidad celular dependiente de anticuerpos. El objetivo es proporcionar una visión lo más cercana posible a la respuesta inmune real de estos individuos a lo largo del proceso de vacunación.

Nuestros resultados muestran que pacientes oncohematológicos que se someten a un trasplante de médula ósea tras recibir su pauta de vacunación convencional frente a la COVID-19, o haberse infectado de forma natural, van a presentar de forma basal (previa al trasplante) una respuesta tanto humoral como celular inferior a individuos inmunocompetentes. Si bien esta respuesta puede proporcionar cierta protección en el período post-trasplante hasta poder reiniciar la revacunación, la tendencia es que disminuya progresivamente en el tiempo.

Por otro lado, los pacientes con Leucemia Mieloide Crónica que inician su pauta vacunal van a presentar una excelente respuesta humoral y celular tras la primera dosis, al contrario que lo que sucede pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica, que presentarán muy baja tasa de seroconversión (<20%), propia de la severa disfunción de linfocitos B de estos pacientes. Sorprendentemente, en ellos se observa una discrepancia entre la respuesta humoral, claramente insuficiente, con una respuesta celular eficiente, basada en poblaciones citotóxicas efectivas, que puede contrarrestar este déficit humoral. Los pacientes con Mieloma Múltiple y aquellos que inician la primera dosis de la vacuna tras recibir un trasplante alogénico presentan unos datos de seroconversión y citotoxicidad celular intermedios, con una disfunción en la reactividad de las poblaciones citotóxicas que se compensa con un aumento en su número, permitiendo un control apropiado de la replicación viral en células infectadas por SARS-CoV-2.

Por último, analizamos el efecto de la dosis de refuerzo o booster en pacientes tratados con rituximab, que presentan una baja seroconversión por el efecto anti-CD20 del rituximab sobre la línea de linfocitos B. Nuestros resultados confirman que el booster mejora los resultados de respuesta humoral en pacientes que se encuentran en el período de recuperación de la aplasia B, tras casi 12 meses sin recibir rituximab.

Los resultados de infección de brecha durante el seguimiento reflejan una clara mejoría en el pronóstico de los pacientes respecto a los datos obtenidos antes de la aprobación de las vacunas, con una mortalidad inferior al 1.5% e infecciones leves en su mayoría.

En conclusión, los resultados de la vacunación frente a la COVID-19 en pacientes oncohematológicos varía mucho en función del tipo de neoplasia o tratamiento, pero es efectiva. La vacunación frente al SARS-CoV-2 es recomendable para estos pacientes, habiendo un claro beneficio clínico incluso en ausencia de seroconversión, probablemente debido a una respuesta celular subyacente.

ABSTRACT

Oncohematologic patients have been a population especially susceptible to COVID-19 since the beginning of the pandemic. This has motivated a special interest in ensuring early vaccination against COVID-19 in them, although the efficacy that could be obtained in severely immunosuppressed individuals who had been excluded from clinical trials of vaccines was unknown.

The purpose of this thesis, presented as a compendium of 4 articles, is to describe the humoral and cellular immune response of 211 individuals with oncohematological malignancies, divided into well-defined cohorts by type of disease and treatments. For this purpose, we conducted a 16-months follow-up, studying antibody titers, neutralization activity, B-lymphocyte and cytotoxic subpopulations, direct cellular immunity studies on epithelial cells infected with SARS-CoV-2 and antibody-dependent cellular immunity, at different times of vaccination. The aim is to provide a view as close as possible to a real immune response in these individuals through the vaccination process.

Our results revealed that oncohematological patients who have received their conventional COVID-19 vaccination regimen or who have been naturally infected and subsequently undergo a bone marrow transplant will have a lower baseline humoral and cellular response than immunocompetent individuals. Although this response may maintain some protection during the post-transplant phase until revaccination can be restarted, the tendency is for it to progressively decrease through time.

On the other hand, patients with Chronic Myeloid Leukemia starting their vaccination regimen will present an excellent humoral and cellular response after the first dose, contrary to what happens in patients with Chronic Lymphocytic Leukemia, who will present a very low seroconversion rate, due to the severe B lymphocyte dysfunction that these patients present. Surprisingly, in them a discrepancy is observed between the humoral response, clearly insufficient, with an efficient cellular response based on effective cytotoxic populations that may counteract this humoral deficit. Patients with Multiple Myeloma and those who initiate the first dose of the vaccine after receiving an allogeneic transplant present intermediate seroconversion and cellular cytotoxicity data, with a dysfunction in the reactivity of cytotoxic populations that is compensated by an increase in their number, allowing an appropriate control of viral replication in cells infected with SARS-CoV-2.

Finally, we analyzed the effect of the booster dose in patients treated with rituximab, who present a low seroconversion due to the anti-CD20 effect of rituximab on the B lymphocyte line. Our results confirm that the booster improves humoral response outcomes in patients in the recovery period of B-cells aplasia, after almost 12 months without receiving rituximab.

Breakthrough infection results during follow-up reflect a clear improvement in patient prognosis compared to data obtained prior to vaccines approval, with mainly mild infections and less than a 1.5% mortality rate.

In conclusion, the results of vaccination against COVID-19 in oncohematological patients vary greatly depending on the type of neoplasm or treatment, but it is effective. Vaccination against COVID-19 is recommended for these patients, with a clear clinical benefit even in the absence of seroconversion, probably due to an underlying cellular response.

1

INTRODUCCIÓN

1.1. VIRUS SARS-CoV-2

1.1.1. Historia del virus SARS-CoV-2

El 31 de diciembre de 2019 la Comisión Municipal de Salud y Sanidad de Wuhan (provincia de Hubei, China) informó sobre una agrupación de 27 casos de neumonía de etiología desconocida [1,2]. El número de casos en la provincia continuó creciendo, observándose una aparente asociación con un mercado mayorista de Wuhan, que fue cerrado el 1 de enero de 2020 [3]. Durante la primera quincena de enero se identificó que el agente causante era un nuevo betacoronavirus, cuyo genoma fue compartido por las autoridades chinas el 12 de enero [4].

El nuevo coronavirus se expandió rápidamente por el país, causando miles de infectados diarios. El 30 de enero de 2020 el Comité de Emergencias del Reglamento Sanitario Internacional (RSI, 2005) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró el brote del nuevo coronavirus una Emergencia de Salud Pública de Importancia Internacional (ESPII) [5].

A pesar de las estrictas medidas que se tomaron en China para frenar la transmisión, el nuevo coronavirus, renombrado “Síndrome Respiratorio Agudo Severo Coronavirus 2” (“SARS-CoV-2”) por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus [6], se transmitió exponencialmente por todo el mundo, dando lugar a una pandemia mundial en los meses posteriores. La infección, conocida como COVID-19, era asintomática o leve en la mayoría de los casos, pero por razones desconocidas muchos individuos desarrollaban un síndrome respiratorio agudo severo (SARS) de alta morbimortalidad, que, unido a la incidencia masiva y creciente de casos, llevó a la toma de medidas sin precedente en muchos países ante la emergencia y el colapso sanitario. En España, el 14 de marzo de 2020 se declaró el estado de alarma ante la situación sanitaria, que se extendió durante más de 3 meses y trajo consigo una cuarentena nacional conocida como “confinamiento”[7].

Desde el inicio de la pandemia la comunidad científica se ha volcado en aumentar el conocimiento sobre el nuevo virus y en encontrar tratamientos efectivos y vacunas, a pesar de lo cual se han confirmado más de 665 millones de casos y 6,5 millones de fallecidos desde el inicio de la pandemia hasta enero de 2023 [8].

1.1.2. Estructura del SARS-CoV-2

El SARS-CoV-2 es un virus RNA monocatenario, del género betacoronavirus, perteneciente a la familia Coronaviridae. Comparte el 79.5% de su genoma con el SARS-CoV, causante de una epidemia a principios del siglo XXI, si bien de menor repercusión que la actual [9].

La cadena de RNA posee 14 marcos abiertos de lectura (ORF, Open Reading Frame), que codifican 29 proteínas virales. La mayor parte del terminal 5' del genoma del virus codifica dos poliproteínas (pp1a y pp1ab) que, tras la acción de proteasas, dan lugar a 16 proteínas no estructurales (PNS) que intervienen en acciones de replicación y transcripción del virión. Cuatro ORF del dominio 3' codifican las cuatro proteínas clásicas estructurales: las proteínas de la nucleocápside (N), superficie (S), envoltura (E) y membrana (M); que son responsables del ensamblaje del virión y participan en la supresión de la respuesta inmune [10] (*Figura 1A*). Proteínas accesorias como ORF3a y ORF7a también intervienen en la estructura del virión. El resto de las proteínas son codificadas por genes intercalados entre los genes estructurales, siendo en su mayoría proteínas accesorias que intervienen regulando la infección [11].

En relación con las proteínas estructurales:

- La proteína S es una proteína transmembrana anclada en la superficie de la membrana del virus. Está compuesta por dos subunidades: S1 cuya función consiste en la unión al receptor de la célula huésped, y S2, que se encarga de la fusión de la membrana del virus con la célula que infecta [11,12].
- La proteína E es un canal iónico de membrana que regula la lisis de la estructura viral y la liberación del genoma tras la entrada en la célula huésped. Además participa en el ensamblaje de los nuevos viriones [11,13].
- La proteína N es la única proteína estructural que se encuentra en el interior del virión. Tiene como función proteger y empaquetar el genoma RNA además de presentar funciones supresoras sobre la respuesta inmune del huésped [11].
- La proteína M es una glicoproteína transmembrana fundamental para la morfogénesis viral y la interacción con el resto de proteínas estructurales [14].

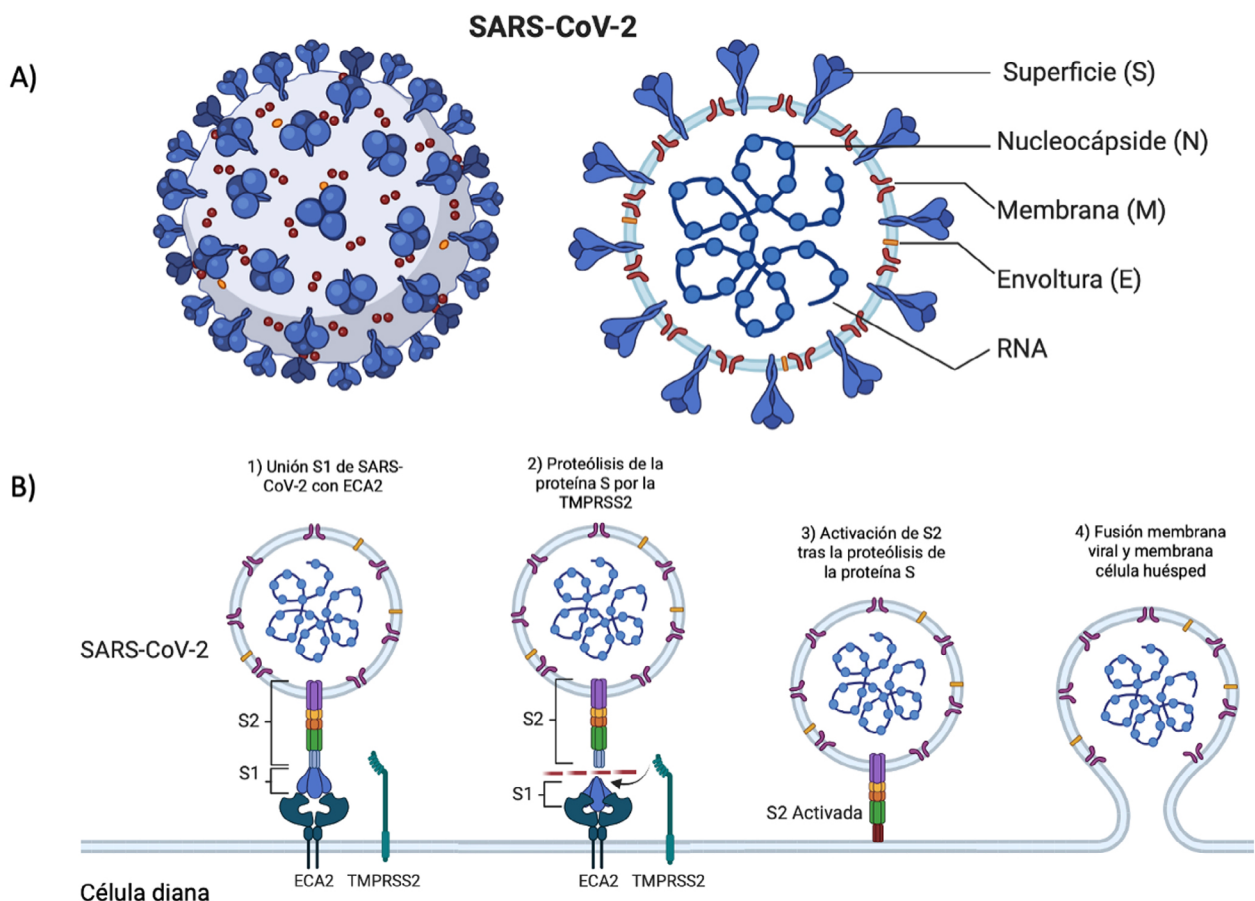


Figura 1. Estructura y patogénesis del SARS-CoV-2. 1A) Los viriones SARS-CoV-2 se componen de las siguientes proteínas estructurales: la proteína de la nucleocápside (N), superficie (S), envoltura (E) y membrana (M). 1B) Durante la infección de la célula huésped, la subunidad S1 de la proteína S se une al receptor ECA2 (paso 1); la proteína transmembrana TMPRSS2 del huésped se adhiere a la subunidad S2 (paso 2) y la activa al realizar la proteólisis (paso 3) permitiendo la fusión de ambas membranas lipídicas (paso 4). Creado con Biorender.com y basado en Lamers, MM, et al. Nature Review of Microbiology. 2022 [30]

1.1.3. Patogenia del SARS-CoV-2

Los coronavirus residen predominantemente en animales, que actúan como reservorio. Algunos de estos virus adquieren la capacidad de infectar al ser humano, como es el caso del MERS-CoV, el SARS-CoV y, más recientemente, el SARS-CoV-2. Se cree que el SARS-CoV-2 proviene de los murciélagos, que son reservorio principal de diversos virus, ya que se ha demostrado que su genoma comparte un 96,2% con el virus RaTG13, un coronavirus presente en estos animales [15,16]; si bien es probable que haya encontrado reservorios animales intermedios antes de llegar al ser humano, lo que justificarían las mutaciones presentes actualmente en el virus [17].

La transmisión principal del SARS-CoV-2 es de humano a humano, a través de la inhalación, por una persona susceptible, de gotas o aerosoles secretadas por un sujeto infectado. Otras vías de transmisión, como a través de fómites en objetos contaminados, vía vertical, etc, son improbables [18].

Tras su entrada en la cavidad respiratoria el virus invade las células ciliares del endotelio de la cavidad nasal. Para ello, SARS-CoV-2 se une al receptor de la enzima convertidora de la angiotensina 2 (ECA2) a través de la unidad S1 de la proteína S del virus [4,19]. En el dominio C-terminal de la subunidad S1 se identifica una región llamada RBD (Receptor Binding Domain) que es clave para la entrada del virus en la célula, así como diana de neutralización para los anticuerpos. Esta región difiere levemente de la que presenta el virus SARS-CoV, que también se adhiere al ECA2 para infectar la célula, diferencia que permite una mayor afinidad y fuerza en la unión al receptor ECA2 por parte de SARS-CoV-2 [20,21]. Una vez unido a su receptor, el virus precisa de la proteólisis de la proteína S para activar la fusión de la membrana lipídica viral y la del huésped. Esto se lleva a cabo a través de la acción de proteasas como las catepsinas B y L o la serina proteasa celular de transmembrana 2 (TMPRSS2) [19] sobre la subunidad S2 (*Figura 1B*). Tanto ECA2 como TMPRSS2 presentan una alta expresión en las células epiteliales de la vía respiratoria, lo que justifica el tropismo del virus por estos tejidos [18,22].

Tras la liberación del RNA viral en el citoplasma celular, los ribosomas del huésped traducen las poliproteínas pp1a y pp1ab, que son procesadas en las 16 PNS a través de dos proteasas virales: Mpro y PLpro. Estas PNS activan el complejo de replicación y transcripción del RNA viral. Las nuevas moléculas de RNA, junto con las proteínas estructurales, inician el proceso de ensamblaje y los nuevos viriones son exocitados para iniciar un nuevo ciclo infeccioso [11].

Una vez infectada la vía respiratoria superior, el SARS-CoV-2 se disemina por la vía respiratoria inferior a través de la microaspiración de partículas desde la orofaringe o por inhalación directa hasta los bronquios [18].

1.1.4. Tormenta de citoquinas e hiperinflamación secundaria a infección por SARS-CoV-2

La manifestación clínica de la COVID-19 es muy variada, siendo en su mayoría leve o asintomática. Sin embargo, por razones aún desconocidas, algunos pacientes desarrollan una infección severa, que se manifiesta como una insuficiencia respiratoria progresiva que puede llevar a un SARS, un fallo multiorgánico e incluso la muerte [23]. Como factores de riesgo asociados a desarrollar una COVID-19 severa están la edad, el sexo masculino y comorbilidades previas (hipertensión, diabetes, obesidad, patología pulmonar...) [24,25]. Estudios recientes indican que en estos pacientes se desencadena una tormenta de citoquinas durante la infección que lleva a un estado hiperinflamatorio

incontrolable y que, sin embargo, resulta ineficaz para frenar la infección viral [26,27]. Este estado es responsable de fenómenos característicos de la COVID-19, como aumento de los niveles circulantes de citoquinas, marcadores de inflamación (ferritina, PCR), linfopenia, trombopenia, trombosis...[27]

Si bien no están claros los factores que llevan al desencadenante de esta tormenta de citoquinas, las fases precoces de la enfermedad pueden tener una gran influencia en su desarrollo. Tras la infección de las primeras células epiteliales en la nasofaringe y tráquea, en la mayoría de los pacientes la infección se resuelve a los pocos días, fruto de una fuerte respuesta a base de interferón (IFN) de tipo I y III, además de células T y B. Una pobre secreción de IFN en estos momentos (frecuente en pacientes de elevada edad) puede favorecer un mal control del foco y la expansión de la infección a las células ciliadas de la vía respiratoria inferior [28,29].

En el alveolo, las células alveolares tipo II (AT2) son susceptibles a la infección por SARS-CoV-2, ya que expresan tanto ECA2 como TMPRSS2. Al ser infectadas, estas células pierden parcialmente su capacidad de diferenciación y con frecuencia presentan disminución de sus microvellosidades y su capacidad de producción de surfactante pulmonar [18,30], lo que dificulta la expulsión de estas partículas virales del alveolo. Además, estas células, a su vez, aumentarán la síntesis de IFN tipo I y III para posteriormente entrar en apoptosis ante su incapacidad para controlar la infección viral.

Hirano et al [31] propone que la tormenta de citoquinas se expande con el incremento de angiotensina II (AgII) circulante; esto sucede debido a la disminución de los receptores ECA2 en la superficie celular tras su endocitosis junto con el virión SARS-CoV-2 durante la infección de la célula, y por el efecto inhibitorio que tiene el daño y la inflamación pulmonar sobre la expresión de ECA2. Los receptores ECA2 son responsables de la degradación de AgII, por lo que, tras disminuir en el pulmón durante la infección, aumentan los niveles plasmáticos de AgII. La AgII inicia la vía Angiotensina II- Receptor de la angiotensina tipo 1 (AgII-AT1R), que activa el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-κB), media en la síntesis del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y del factor de necrosis tumoral alfa (TNFα). Tanto EGFR como TNFα son a su vez potentes estimuladores de NF-κB [32], así como del receptor soluble de la interleuquina 6 (Rs-IL-6). El complejo IL-6-Rs-IL-6 activa el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) que junto con NF-κB es capaz de activar el "amplificador IL-6", un mecanismo de hiperactivación tanto de NF-κB como STAT3, así como de muchas otras citoquinas proinflamatorias, como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1), TNFα, IL-8 o IL-6, entre otras. Varios estudios de pacientes con SARS-CoV-2 han asociado niveles más elevados de estas citoquinas en pacientes con COVID-19 severa respecto a la leve o moderada [33,34].

Este ambiente proinflamatorio facilita el reclutamiento de células linfoides y mieloides, que secretan más citoquinas perpetuando la tormenta. A pesar del reclutamiento celular, se han descrito datos de que la respuesta llevada a cabo por estas células es ineficaz, como es la disminución en la función de los macrófagos, perfiles de agotamiento en el estudio fenotípico de las células citotóxicas y un aumento de receptores inhibitorios como NKG2A en células NK y PD-1 en células T CD8+ [35,36], junto con una expresión disminuida de marcadores de degranulación, como el CD107a [36].

Los macrófagos y las células dendríticas sufren una disminución de su capacidad para presentar antígenos a las células T debido a la reducción de la expresión de HLA-DR en sus membranas [30], pero además contribuyen a la hiperinflamación tras ser también infectadas por el virus y liberar citoquinas y quimioquinas durante la piroptosis [37]. Estas citoquinas reclutan más células citotóxicas, pero también son responsables de su agotamiento y de la acción inhibitoria sobre células hemato-

poyélicas que conducen a la linfopenia y la trombopenia [36,38,39]. Sin embargo, es frecuente la presencia de neutrofilia, con desviación izquierda y rasgos de inmadurez y activación [18]. Tanto la profundidad de la linfopenia como la ratio linfopenia/neutrofilia son marcadores pronósticos de la infección por SARS-CoV-2 [34,40].

Al mismo tiempo, el factor de crecimiento tumoral beta (TGF- β) es secretado como respuesta al daño pulmonar, con función de reparar y resolver la lesión. En la COVID-19 severa la estimulación de TGF- β es excesiva, lo que favorece un estado pro-fibrótico que también se ve favorecido por el daño persistente de la ventilación mecánica, necesaria en muchos de estos pacientes [18].

Dado que una respuesta citotóxica eficaz es esencial para el control de la infección por SARS-CoV-2 [26,41], la linfopenia junto a la funcionalidad subóptima de las células citotóxicas conduce a una inmunodeficiencia progresiva que lleva consigo una incapacidad para eliminar células infectadas por SARS-CoV-2.

1.1.4.1. Hipercoagulabilidad

La hipercoagulabilidad, que guarda una estrecha relación con la tormenta de citoquinas, es otra consecuencia frecuente en la COVID-19, manifestándose en una elevada incidencia (21-69%) de trombosis en pacientes con COVID-19 severa [42]. La fisiopatología completa es todavía desconocida, pero sí está clara la asociación con un daño endotelial, producido por la inflamación, que lleva a la expresión del factor tisular del endotelio y desencadena la vía extrínseca de la coagulación y la activación del factor XII durante la infección (por la exposición de colágeno de los vasos dañados, RNA extracelular, etc) [30,43,44]. Como consecuencia, observamos un aumento en los productos de degradación de la fibrina, como es el Dímero D, la formación de trombos [45,46] y la trombopenia por consumo [30]. En el pulmón esto conduce a la formación de membranas hialinas, que trata de frenar el edema pulmonar ante la disrupción del endotelio vascular, y la microangiopatía trombótica a nivel alveolar, evidenciada en estudios histológicos [47]; todo ello favorece la hipoperfusión pulmonar e hipoxia de un pulmón ya dañado por la inflamación, la infección y la fibrosis.

1.1.4.2. Síndrome respiratorio agudo severo

En resumen, tras la disrupción del endotelio vascular por el daño alveolar que ejerce directamente el virus e indirectamente la tormenta de citoquinas, se produce la fuga de fluidos del vaso sanguíneo al alveolo, además de la activación de la cascada de la coagulación que favorece la formación de microtrombos de fibrina y membranas hialinas, en un intento por frenar esta fuga. Estos parches de fibrina dificultarán aún más el intercambio gaseoso ya disminuido por el edema alveolar. Al mismo tiempo, las citoquinas liberadas por las células infectadas facilitan la quimiotaxis de células inflamatorias al pulmón, favorecidas por una vasodilatación sistémica inducida por el óxido nítrico (NO) y otras citoquinas. La hiperinflamación se retroalimenta con los mecanismos descritos junto a un aumento de la hipertensión pulmonar fruto de la micro/macroangiopatía trombótica en el pulmón, la disminución de la distensibilidad (“compliance”) por la falta de síntesis de surfactante ante el daño a las células AT2 y el inicio de la fibrosis pulmonar [30].

El estudio histológico de los pulmones de los pacientes con SARS-CoV-2 y SARS muestra un daño alveolar difuso, que se caracteriza por una fase inicial exudativa, con edema, apoptosis celular, membranas hialinas e infiltrado inflamatorio. La microangiopatía es frecuente, con microtrombos ocluyendo los capilares alveolares. Esto continúa con una fase proliferativa, con coagulación capilar

e hiperplasia de las AT2 en un intento de regenerar el alveolo. Si el daño ha sido prolongado en el tiempo es frecuente observar fenómenos de fibrosis en el septo alveolar [18,30,48].

Este cuadro se conoce clínicamente como SARS, no es exclusivo del SARS-CoV-2 y se expresa clínicamente con infiltrados pulmonares bilaterales e hipoxemia como consecuencia de un aumento de la permeabilidad alveolocapilar. Son cuadros con una mortalidad del 35-45%, y muy heterogéneos a pesar del intento de estandarización bajo una única definición, conocida como “definición de Berlín”, que además establece grupos de riesgo basados en la gravedad de la hipoxemia (*Tabla 1*). Sin embargo, esta definición exige tratamiento con ventilación mecánica, lo que deja fuera muchos cuadros que, sin precisarla, son clínicamente compatibles, como se ha podido observar de forma dramática durante la pandemia [49-51].

• Inicio agudo (dentro de los 7 días posteriores a una agresión clínica conocida o síntomas respiratorios nuevos o que empeoren)
• Opacidades bilaterales en la radiografía que no puedan explicarse claramente como derrame, atelectasias, nódulos o masas
• Hipoxemia arterial definida como: <ul style="list-style-type: none">• Leve: $200 < PaO_2/FiO_2 \text{ ratio} \leq 300$ mmHg, con CPAP o PEEP ≥ 5 cm H₂O (mortalidad 27%)• Moderada: $100 < PaO_2/FiO_2 \text{ ratio} \leq 200$ mmHg, con PEEP ≥ 5 cm H₂O (mortalidad 32%)• Severa: $PaO_2/FiO_2 \text{ ratio} \leq 100$ mmHg, con PEEP ≥ 5 cm H₂O (mortalidad 45%)
• Factor de riesgo identificado para SARS (si no hay claro factor de riesgo, excluir insuficiencia cardiaca como causa).
• No explicado exclusivamente por causas cardiacas.

CPAP: presión positiva continua; FiO₂: fracción de oxígeno inspirado, PaO₂: presión parcial de oxígeno; PEEP: presión positiva al final de la espiratoria.

Tabla 1. Definición de Berlín para SARS. Adaptada con el permiso de Meyers, et al. Lancet. 2021 [50].

1.1.5. Clasificación de la gravedad de la infección COVID-19

Se han propuesto distintos parámetros para clasificar la gravedad de la COVID-19, dada la inmensa variabilidad de las presentaciones clínicas con las que se puede manifestar. Es por esta multitud de clasificaciones diferentes que, en ocasiones, puede ser difícil comparar resultados entre artículos de distintos grupos.

Se calcula que alrededor del 17-20% de los infectados permanecerá asintomático durante toda la infección [52,53]. Entre los pacientes sintomáticos, una clasificación bastante aceptada es la que sigue la OMS en su guía de manejo clínico (*Tabla 2*) [54]. Se calcula que el 80% de los pacientes tendrá una enfermedad leve o moderada, y el 15% una enfermedad grave, probablemente necesitando oxigenoterapia. El 5% restante son enfermos en estado crítico que presentan complicaciones tales como insuficiencia respiratoria, SDRA, shock séptico, tromboembolia o fallo multiorgánico.

<i>Enfermedad leve</i>		Pacientes sintomáticos que se ajustan a la definición de caso de COVID-19 pero no presentan neumonía vírica ni hipoxia.
<i>Enfermedad moderada</i>	Neumonía	Signos clínicos de neumonía (fiebre, tos, disnea, taquipnea) pero sin signos de neumonía grave, en particular SpO ₂ ≥ 90% con aire ambiente. Aunque el diagnóstico pueda realizarse con base en criterios clínicos; las técnicas de diagnóstico por la imagen (radiografía, TAC o ecografía de tórax) pueden ayudar al diagnóstico y a reconocer o descartar complicaciones pulmonares. Precaución: El umbral de saturación de oxígeno del 90% para definir la COVID-19 grave es arbitrario y debe interpretarse con cautela.
<i>Enfermedad grave</i>	Neumonía grave	Signos clínicos de neumonía (fiebre, tos, disnea, taquipnea) más alguno de los siguientes: frecuencia respiratoria > 30 inspiraciones/min; disnea grave: o SpO ₂ < 90% en aire ambiente.
<i>Enfermedad crítica</i>	SDRA	Ver tabla 1.
	Sepsis	Disfunción orgánica aguda y potencialmente mortal causada por una desregulación de la respuesta del huésped a una infección presunta o demostrada. Signos de disfunción orgánica: alteración del estado mental (delirio confusional), disnea o taquipnea, SpO ₂ baja, oliguria, taquicardia, pulso débil, extremidades frías o hipotensión arterial, piel jaspeada, datos de coagulopatía en las pruebas de laboratorio, trombocitopenia, acidosis, hiperlactatemia o hiperbilirrubinemia.
	Shock séptico	Adultos: lactato sérico > 2 mmol/l e hipotensión persistente que, pese a la reposición de la volemia, necesita vasopresores para mantener una TA media ≥ 65 mm Hg.
	Trombosis aguda	Tromboembolia venosa aguda (es decir, embolia pulmonar), síndrome coronario agudo, accidente cerebrovascular agudo.

Tabla 2. Clasificación de la gravedad del COVID-19 en adultos. Adaptada con el permiso de la OMS. 2022 [54]

1.2. PACIENTES ONCOHEMATOLÓGICOS Y COVID-19

Los pacientes oncohematológicos son individuos severamente inmunodeprimidos tanto por las alteraciones inmunes propias de la enfermedad como por las derivadas de los tratamientos recibidos, lo que les confiere un alto riesgo para desarrollar una COVID-19 severa. La mortalidad en estos pacientes previamente a la vacunación no es fácil de determinar, ya que son estudios habitualmente limitados a las dos primeras olas, en las que muchos pacientes asintomáticos o leves fueron infra-diagnosticados, pero se estima superior al 30% [55-58]. Sin embargo, dentro de las enfermedades oncohematológicas encontramos un variadísimo grupo de patologías con terapias muy diversas que implican una susceptibilidad muy diferente a la infección por SARS-CoV-2. Algunas de estas patologías son:

1.2.1. Pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica (LLC)

La LLC es una enfermedad con una presentación clínica muy diversa. La mayoría de los pacientes se mantendrán asintomáticos y sin complicaciones a lo largo de toda la enfermedad, sin precisar de ninguna terapia, en un protocolo de observación que conocemos como “watch and wait” (WW). En los pacientes que sí precisan tratamiento, los fármacos disponibles han sufrido una revolución en los últimos 10 años. En primer lugar, la aprobación inicial del ibrutinib, un inhibidor oral de la Tirosín Kinasa de Bruton (BTKi) con un perfil de toxicidad y tolerancia favorable, y posteriormente su posi-

cionamiento como fármaco de primera línea en LLC [59], supuso un cambio radical en el tratamiento de estos pacientes, con frecuencia de avanzada edad, frente a los clásicos esquemas de inmunoterapia. Tras la aprobación de ibrutinib fueron surgiendo nuevos fármacos, como otros BTKi o inhibidores de BCL2 (venetoclax), en monoterapia o combinación, que compiten con los esquemas clásicos para la LLC.

En relación con el SARS-CoV-2, los pacientes con LLC y COVID-19 presentan mayor tasa de hospitalización que individuos inmunocompetentes, con una mortalidad próxima al 35% [55,60,61]. Aquellos recibiendo tratamiento para la LLC, especialmente con BTKi presentan mayor riesgo para desarrollar una COVID-19 severa frente a aquellos que se encuentran sin tratamiento, bajo protocolo de WW [61].

1.2.2. Pacientes con Leucemia Mieloide Crónica (LMC)

Desde la aprobación del imatinib en 2001, los inhibidores de Tirosín Kinasa (ITKs) se han consolidado como tratamiento de primera línea en los pacientes con LMC, suponiendo un punto de inflexión en la historia de esta enfermedad por el cambio drástico en el pronóstico y manejo de estos pacientes. Fruto de la eficacia de estos fármacos, capaces de mantener respuestas moleculares prolongadas en estos pacientes, y su efecto inmunomodulador, se plantea desde hace poco más de una década [62] la posibilidad de suspender el tratamiento en pacientes que lo han recibido durante varios años manteniendo una respuesta molecular profunda prolongada, y que los pacientes permanezcan con la enfermedad controlada. Los estudios al respecto han sido prometedores, con respuestas mantenidas tras la discontinuación en aproximadamente un 50% de los pacientes [63,64]; tanto es así que la European Leukemia Net (ELN) contempla la discontinuación en pacientes que lleven al menos 5 años en tratamiento con ITKs y que hayan mantenido una respuesta molecular mayor profunda (\geq RM4) durante al menos 2 [65].

De este modo, los individuos con Leucemia Mieloide Crónica presentan un pronóstico bastante bueno frente a la COVID-19, con una mortalidad del 5.5-13%, sin que parezca que haya diferencias relevantes entre pacientes recibiendo tratamiento con ITKs y aquellos que lo discontinuaron [66,67]. En un estudio multicéntrico con 217 pacientes con LMC y COVID-19, que incluía un 11% que había discontinuado ITK, únicamente 47 individuos (21,4%) requirieron hospitalización, estando todos ellos recibiendo tratamiento activo con ITKs [66].

1.2.3. Pacientes con Mieloma Múltiple (MM)

El tratamiento de elección en pacientes jóvenes (“fit”) con MM consiste habitualmente en un tratamiento de inducción siguiendo un esquema basado en bortezomib, usando combinaciones triples o cuádruples que incluyan un inmunomodulador (habitualmente lenalidomida o talidomida). En los pacientes quimiosensibles, la inducción se continúa con una consolidación, que suele consistir en un trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (TASPE) y una terapia de mantenimiento. Sin embargo, muchos de los pacientes presentan una edad avanzada en el momento del diagnóstico del MM y no serán candidatos a recibir un TASPE. En estos casos el esquema cambia, con una combinación de fármacos adaptada a la situación funcional seguida de un mantenimiento [68].

Alrededor del 48% de los pacientes con Mieloma Múltiple (MM) infectados con SARS-CoV-2 requirieron hospitalización, con una mortalidad del 24-34%. El impacto de haber recibido un trasplante autólogo previamente no está claro y probablemente es dependiente del tiempo transcurrido desde

el trasplante, así como de otras terapias concomitantes. El pronóstico es significativamente peor en pacientes con enfermedad activa o en progresión con respecto a enfermedad en respuesta parcial o completa (RP y RC respectivamente) [69-71].

1.2.4. Pacientes que reciben un trasplante alogénico de médula ósea (Alo-TPH)

El trasplante alogénico es el tratamiento de consolidación de elección para muchas enfermedades oncohematológicas, si bien también es un procedimiento que se realiza en algunas enfermedades genéticas (como inmunodeficiencias o enfermedades innatas del metabolismo), diversas enfermedades con insuficiencia de médula ósea, enfermedades autoinmunes...

Constituye una terapia muy agresiva, con una altísima morbimortalidad, tanto durante el propio procedimiento, en el que los pacientes reciben altas dosis de quimioterapia seguidas de la infusión de progenitores hematopoyéticos alogénicos, en un proceso que implica una pancitopenia profunda y prolongada, con los riesgos que esto conlleva; como en el post-trasplante, en el que se mantiene una inmunosupresión severa, tanto por el propio procedimiento como por los fármacos que intentan prevenir una de las complicaciones más severas del TAPH: la enfermedad injerto contra receptor (EICR).

Los pacientes sometidos a un Alo-TPH presentan también un alto riesgo de desarrollar una COVID-19 severa, con un 28,4% de ingresos en unidades de vigilancia intensiva (UVI) y 22,5% de mortalidad. Entre otros, factores relacionados con un mal pronóstico para la COVID-19 son haber transcurrido menos de un año desde el trasplante y mantener tratamiento inmunosupresor activo [72].

1.2.5. Pacientes que reciben un trasplante autólogo de médula ósea (TASPE)

El trasplante autólogo es también un procedimiento habitual como consolidación de algunas enfermedades oncohematológicas. Ya hemos visto que se incluye dentro del tratamiento de primera línea en el MM (ver apartado 1.2.3), pero también forma parte de la consolidación de la segunda línea de muchos linfomas de alto grado, e incluso se puede plantear en primera línea en linfomas particularmente agresivos y en algunos tumores sólidos. La inmunosupresión relacionada con este procedimiento es la consecuencia de una intensa quimioterapia de acondicionamiento, que trae consigo una aplasia profunda, y una recuperación medular posterior tras la infusión de células madre autólogas con una reconstitución inmune lenta que puede además verse alterada por la asociación con fármacos inmunomoduladores o citotóxicos como terapia complementaria tras el trasplante. Por este motivo, son pacientes muy vulnerables a las infecciones, especialmente durante el primer año tras la infusión. En el caso del COVID-19, los estudios arrojan una mortalidad del 23-28%, siendo mayor en los trasplantados recientes [72,73].

1.2.6. Pacientes que reciben tratamiento con rituximab

La aprobación de rituximab, un anticuerpo monoclonal anti-CD20, por la EMA en 1998 supuso un cambio importantísimo en el tratamiento de las neoplasias de estirpe B, con una mejora radical en el pronóstico de los pacientes al añadir rituximab a los esquemas de quimioterapia clásicos; o usarlo en monoterapia, tanto para esquemas de mantenimiento como de tratamiento de síndromes

linfoproliferativos crónicos o de bajo grado. El rituximab también se encuentra aprobado en algunas enfermedades autoinmunes como el pénfigo vulgaris, la artritis reumatoide y algunas vasculitis. Sin embargo, la aplasia de células B tras el tratamiento es profunda y prolongada, con una recuperación de la estirpe B que no inicia hasta 6-9 meses después de interrumpir el tratamiento, lo que implica un aumento del riesgo infeccioso en estos pacientes.

La mortalidad asociada a la COVID-19 en individuos que han recibido terapia con rituximab se estima en un 21-32%, siendo inferior en pacientes que lo reciben por una indicación reumatológica que en aquellos con enfermedades oncohematológicas [55,74,75].

1.3. VACUNACIÓN FRENTE A LA COVID-19

En junio 2020, la Comisión Europea presenta la Estrategia Europea de Vacunación. La Comisión centraliza la negociación de compra de vacunas, aún en desarrollo, a través de los Acuerdos de Adquisición Anticipada (APA), con el fin de asegurar un acceso equitativo y seguro en el proceso de compra y distribución de vacunas dentro de la Unión Europea [76].

1.3.1. Vacunas frente a la COVID-19 comercializadas en España

En esta línea, la Agencia Europea del Medicamento (EMA) aprueba entre diciembre de 2020 y marzo de 2021 la comercialización de cuatro vacunas que progresivamente son distribuidas a los estados miembros:

1.3.1.1. Comirnaty (BNT162b2 mRNA, Pfizer-BioNTech)

Primera vacuna autorizada por la EMA frente a la COVID-19 el 21 de diciembre de 2020. Se trata de una vacuna RNA mensajero (mRNA), compuesta por tozinamerán, una molécula de mRNA monocatenario producido in vitro que se introduce en la célula huésped con ayuda de nanopartículas lipídicas presentes en la vacuna y codifica la proteína S del virus SARS-CoV-2 en conformación de pre-fusión. Este mRNA utiliza los ribosomas de la célula huésped para traducir la proteína S, que se presenta en la membrana celular modificada para mejorar su antigenicidad y desencadena una respuesta inmune dirigida [77] (*Figura 2*).

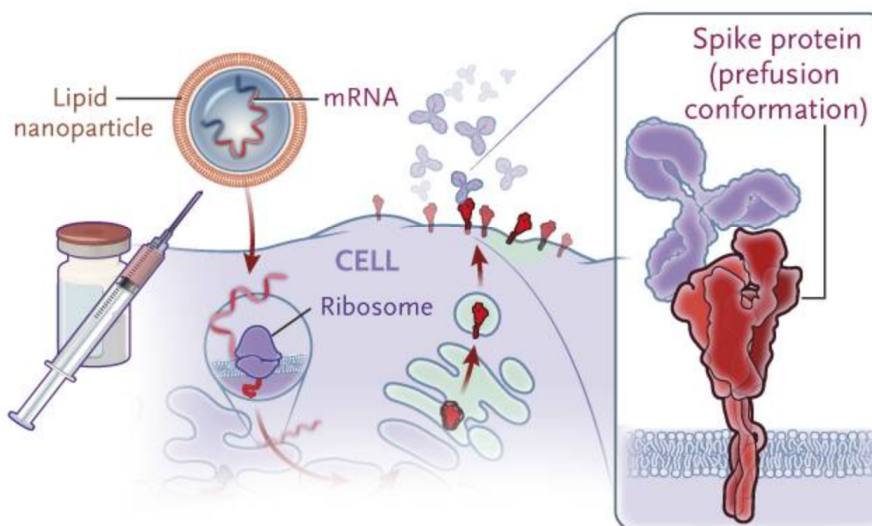


Figura 2. Mecanismo de acción de las vacunas mRNA. El mRNA que codifica la proteína S modificada se introduce en la célula con la ayuda de nanopartículas lipídicas presentes en la vacuna. Este mRNA se traduce en los ribosomas de las células huésped en la proteína S modificada, que se expresará en la superficie celular desencadenando la respuesta inmune. Reproducido con el permiso de Polack, F, et al. *New England Journal of Medicine*. 2020 [78], Copyright Massachusetts Medical Society.

Los resultados del ensayo clínico arrojaron una eficacia del 95% para prevenir COVID-19 sintomático (Intervalo de confianza al 95% (95% CI): 90,3-97,6%) en mayores de 16 años tras dos dosis [78].

Actualmente se encuentra autorizada para individuos mayores de 6 meses con una posología que consiste en dos dosis separadas 3 semanas y recomendación de administrar una dosis de refuerzo al menos 3 meses después de la última. Esta dosis se puede acortar a sólo 28 días en caso de pacientes severamente inmunodeprimidos [77].

Posteriormente se han autorizado variantes de Comirnaty original, que asocian tozinamerán con otras moléculas mRNA (riltozinamerán y famtozinamerán) para mejorar la respuesta frente a nuevas variantes del SARS-CoV-2 [79].

1.3.1.2. Spikevax (mRNA-1273, Moderna)

La vacuna de Moderna fue autorizada por la EMA el 6 de enero de 2021. Se trata también de una vacuna mRNA que contiene un compuesto llamado elasomerán, que funciona de forma similar al tozinamerán de Comirnaty [80].

Actualmente se encuentra autorizada para individuos mayores de 6 meses con una posología que consiste en dos dosis separadas 28 días y recomendación de administrar una dosis de refuerzo al menos 3 meses después de finalizar la pauta inicial, excepto en pacientes severamente inmunodeprimidos, que podrán adelantarla a 28 días.

La eficacia de Spikevax en mayores de 18 años tras la administración de las 2 dosis para prevenir COVID-19 sintomático era del 94,1% (95% CI: 89,3-96,8%) [81].

Al igual que con Comirnaty, se han autorizado variantes de Spikevax que asocian elasomerán con otras moléculas mRNA (imelasomerán y davesomerán) para mejorar la respuesta frente a nuevas variantes del SARS-CoV-2 [82].

1.3.1.3. Vaxzevria (ChAdOx1 nCoV-19, AstraZeneca)

Vaxzevria fue aprobada por la EMA el 29 de enero 2021 y se compone de un vector único de adenovirus de chimpancé (ChAd), que se ha modificado para que contenga el gen que codifica la glicoproteína S del SARS-CoV-2 en conformación de pre-fusión. Tras la vacunación, este adenovirus recombinante y sin capacidad de replicación, infecta a la célula huésped, transcribe su genoma y expresa la glicoproteína S en la membrana celular de la célula huésped de manera transitoria, lo que desencadena una respuesta inmune específica [83] (Figura 3).

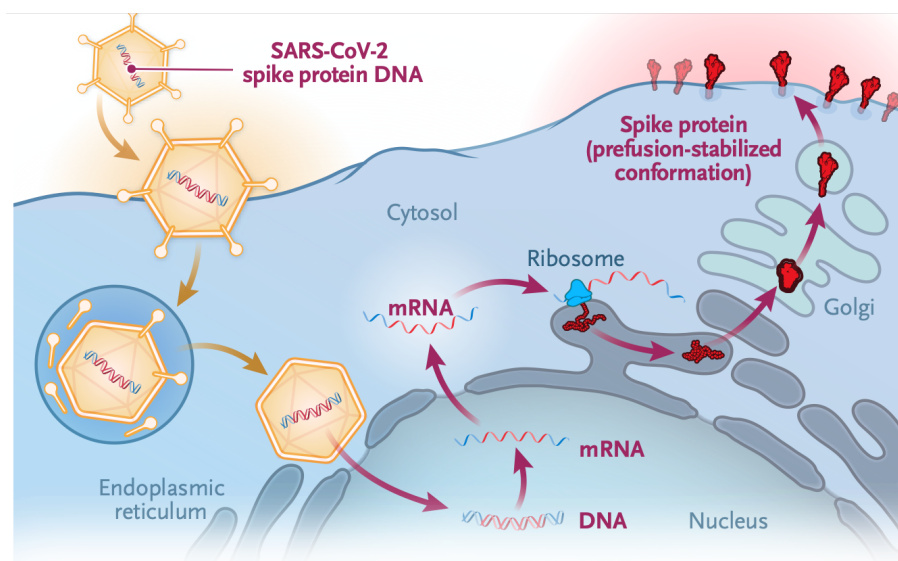


Figura 3. Mecanismo de acción de vacunas con virus modificados. Un adenovirus modificado, que contiene el gen de la proteína S en su DNA, infecta la célula e integra su DNA con el de la célula huésped. Este DNA, que incluye el gen de la proteína S, transcribe y traduce la proteína S, que será expresada en la superficie celular desencadenando la respuesta inmune. Reproducido con el permiso de Sadoff, J. New England Journal of Medicine. 2021 [84], Copyright Massachusetts Medical Society.

Vaxzevria se encuentra autorizada para mayores de edad con una posología que consiste en una pauta de dos dosis separadas entre 4 y 12 semanas, con recomendación de administrar una dosis de refuerzo al menos 3 meses después de completar la vacunación primaria.

La eficacia para prevenir COVID-19 sintomático tras dos dosis separadas 4 semanas en mayores de 18 años fue del 64,3% (95% CI: 56,1-71,0%) [85]. Sin embargo, no se registraron casos de COVID-19 severa en los pacientes vacunados en el ensayo clínico.

1.3.1.4. Jcovden (Ad26.COVS-2, Janssen)

Jcovden fue aprobada por la EMA el 11 de marzo 2021 y se compone de un vector único de adenovirus tipo 26 humano (Ad26), que se ha modificado para que contenga el gen que codifica la glicoproteína S del SARS-CoV-2, funcionando de forma similar a Vaxzevria (Figura 3).

Al igual que Vaxzevria se encuentra autorizada para mayores de edad, sin embargo, la posología consiste en una dosis única que se puede reforzar con una nueva dosis 6 meses después si la primera fue también una dosis de Jcovden, y 3 meses si la pauta previa fue con una vacuna mRNA o Vaxzevria [86].

La eficacia tras 28 días de recibir una única dosis en mayores de 18 años fue del 66,1% (95% CI: 55,0- 74,8%) en prevenir la infección y 85,4% (95% CI: 54,2-96,9%) en prevenir COVID-19 severa [84].

Otras vacunas como VidPrevtyn Beta (Sanofi Pasteur), Vaccine Valneva (Valneva) y Nuvaxovid (Novavax) fueron aprobadas posteriormente al inicio del trabajo de investigación que se presenta y no serán discutidas.

1.3.2. Campaña de vacunación frente al SARS-CoV-2 en España: vacunación de pacientes hematológicos.

Tras la aprobación de Comirnaty por la EMA a través de un Procedimiento de Emergencia (Emergency Use Listing Procedure, EUL) [87] se inicia en España la campaña de vacunación el 27 de diciembre de 2020. Se realiza una priorización de la vacunación de los individuos según grupos de riesgo que sitúa a los pacientes oncohematológicos y aquellos en tratamiento inmunosupresor o citotóxico en el grupo 7 [88]. Estos pacientes, si bien priorizados dado su alto riesgo de desarrollar una COVID-19 severa o fatal, se habían excluido de los ensayos clínicos de todas las vacunas aprobadas en el momento [78,81,84,85], por lo que se desconocía la eficacia de estas en pacientes con un sistema inmune deteriorado y en los que sí estaba descrita una respuesta limitada a otras vacunas.

A pesar de la falta de información, el alto riesgo de estos pacientes durante los períodos más activos de la pandemia hizo que muchas sociedades hematológicas [89-91], incluida la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH), recomendara una vacunación precoz. Dado que los virus vivos atenuados pueden reproducir la enfermedad en paciente inmunodeprimidos, estas sociedades recomendaron evitar las vacunas de virus atenuados o que usen vectores virales, priorizando la administración de vacunas mRNA [92].

1.3.3. Eficacia de las vacunas frente a las nuevas variantes

Durante los meses posteriores al inicio de la pandemia fueron surgiendo pequeñas mutaciones en el genoma del SARS-CoV-2. La mayoría de estos cambios no tuvieron impacto sobre las propiedades del virus ni su virulencia al infectar, pero otros afectaron a su capacidad de transmisión, la eficacia de las vacunas o la gravedad de la enfermedad.

De esta forma, en junio de 2020 la OMS forma el Grupo de Trabajo sobre la Evolución Viral, que categorizaba las diferentes variantes, según el riesgo que suponían para la salud pública, en: variantes de interés (VOI), variantes preocupantes (VOC) y variantes bajo vigilancia (VUM).

En España la presencia de las diferentes variantes ha seguido un patrón similar al del resto de Europa. Con el transcurso del tiempo, nuevas variantes han ido apareciendo, algunas de ellas con ventajas evolutivas que les han permitido prevalecer transitoriamente en nuestro territorio (*Figura 4A*) y condicionar un nuevo pico en la incidencia de COVID-19 (*Figura 4B*). A partir de diciembre de 2020 y junio 2021, las variantes alfa y delta, provocaron sendas nuevas “olas” en la pandemia, que, sin embargo, fueron significativamente menores que el pico inducido por la variante ómicron, que empieza a dominar en España a partir de enero de 2022.

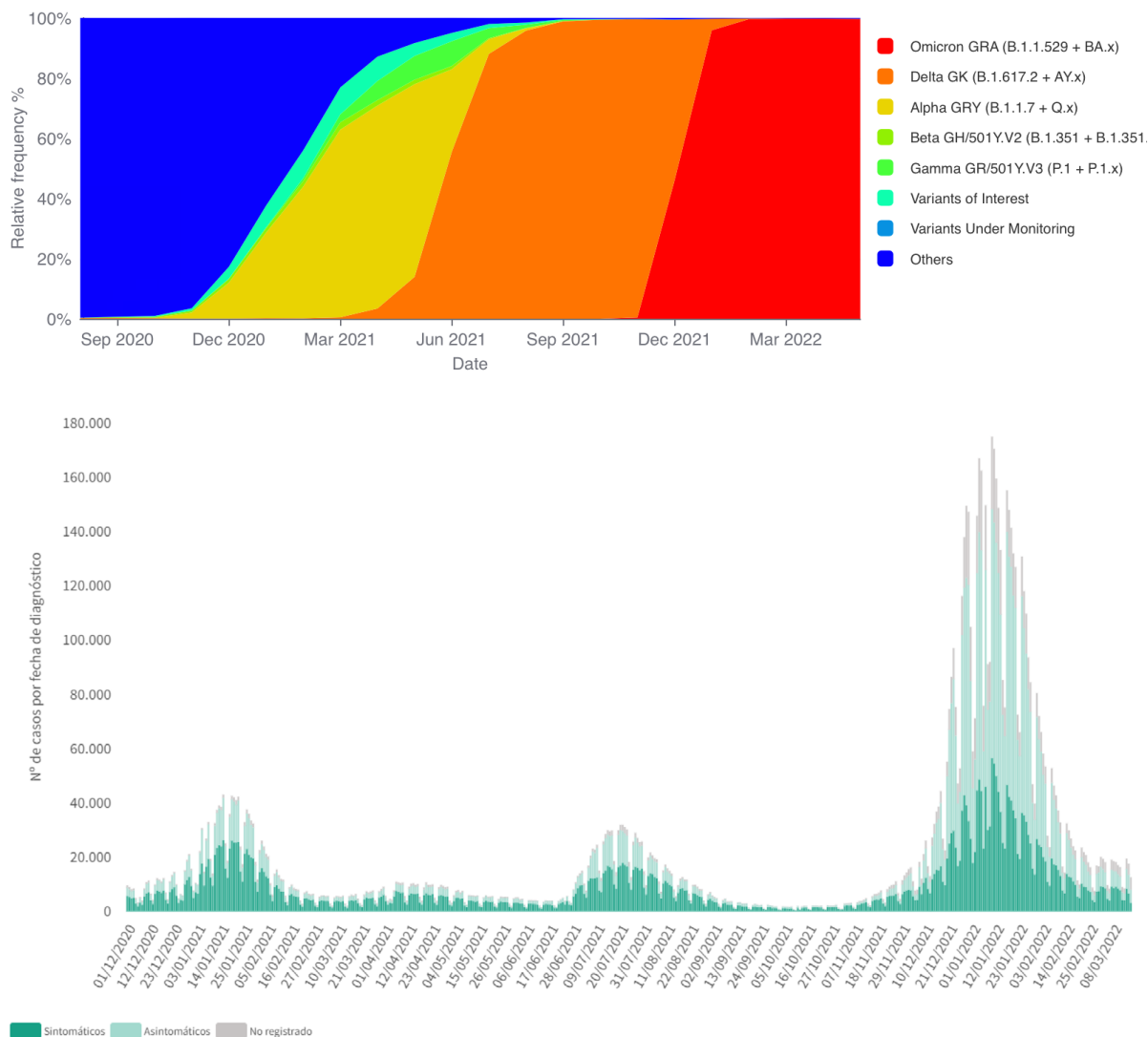


Figura 4. Variantes predominantes en España e infecciones reportadas de septiembre de 2020 a mayo de 2022. 4A) Representación de las variantes del SARS-CoV-2 predominantes en España desde septiembre 2020 a mayo 2022. 4B) Infecciones reportadas en España desde septiembre 2020 a mayo 2022. Adaptada con el permiso de GISAID [93] y Ministerio de Sanidad [94].

Este aumento de los casos en individuos correctamente vacunados con una pauta completa provocó el desasosiego ante la posibilidad de que nuevas variantes del virus fueran resistentes a la inmunidad lograda con las vacunas, especialmente tras el aumento de las infecciones de brecha durante la aparición de la variante ómicron. Diversos estudios confirmaron una pérdida progresiva de la inmunidad durante los meses posteriores a la recepción de las dos primeras dosis, con una disminución de la eficacia frente a la infección leve, si bien se mantiene una adecuada protección que evita la infección severa hasta 6 meses después de recibir la pauta completa [95,96]. Además, la incorporación posterior de la dosis booster parece ampliar la cobertura también para infección sintomática leve [97-100].

Frente a la variante delta, la eficacia contra la infección sintomática tras recibir 2 dosis de ChAdOx1 nCoV-19 era del 82,8% durante el primer mes tras la vacunación, pero iba cayendo en picado hasta alcanzar el 43,5% 25 semanas después de la última dosis. En las vacunas mRNA la protección era discretamente superior (90-95%), pero también disminuía hasta el 63-80% tras los primeros 6 meses. En todos los casos la eficacia aumentaba por encima del 90% tras recibir un booster con cualquier tipo de vacuna [101].

En el caso de la variante ómicron, la situación fue aún más dramática, sin encontrarse apenas protección en los individuos vacunados con ChAdOx1 nCoV-19 5 meses después de recibir la pauta y únicamente en alrededor del 15% entre los vacunados con vacunas mRNA. El efecto booster, si bien beneficioso, presentaba eficacias limitadas al 40-60% tras el segundo mes [101].

Aunque los resultados para prevenir infección sintomática eran pobres, la respuesta para prevenir COVID-19 severa era buena y más prolongada. En un estudio amplio multicéntrico en Estados Unidos (EEUU) durante el pico de la variante delta, el 38,2% de los individuos no vacunados que acuden a los servicios de Urgencias por COVID-19 precisa hospitalización frente al 2,6% de los individuos que han recibido 3 dosis de vacunas. Durante el pico de ómicron el porcentaje de hospitalización fue del 37,8% y 4,7% para no vacunados y vacunados respectivamente [102] (Figura 5). Del mismo modo, y también en los EEUU, la mortalidad durante el período predominante delta fue de 11,4/100.000 habitantes/semana en individuos no vacunados frente a 0,7 en individuos vacunados. En el caso del pico ómicron, únicamente en el mes de diciembre de 2021, la mortalidad fue del 9,7/100.000 frente a 0,5/100.000 habitantes respectivamente [103].

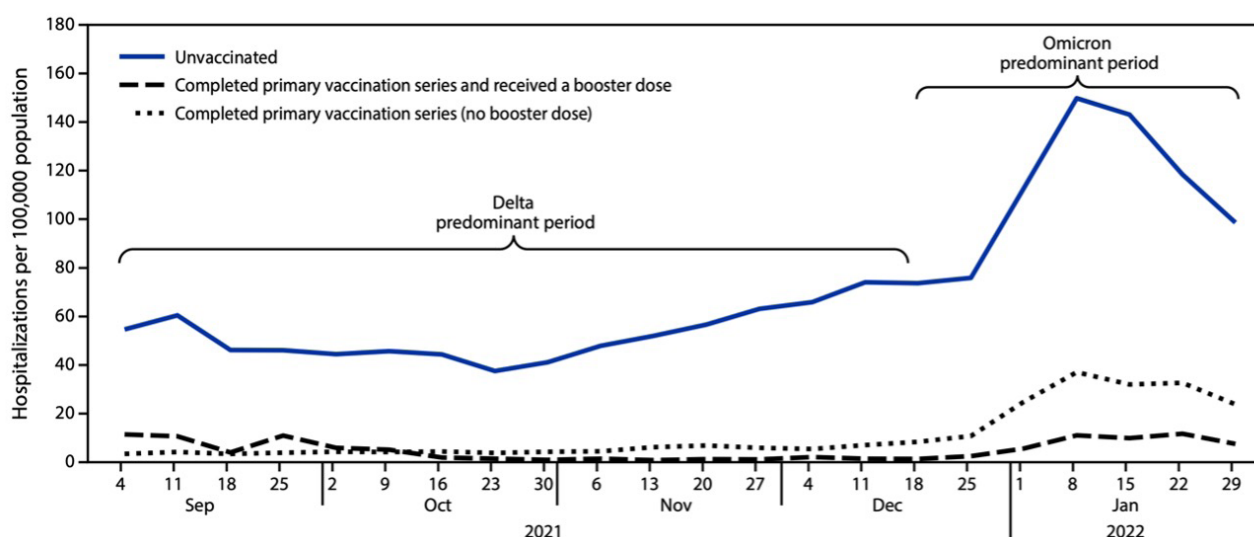


Figura 5. Hospitalizaciones en EEUU durante el período de la variante delta y ómicron para pacientes vacunados y no vacunados. Reproducida con el permiso de Morbidity and Mortality Weekly Report (Centers for disease Control and Prevention)

1.4. RESPUESTA INMUNE A OTRAS VACUNAS EN PACIENTES CON NEOPLASIAS ONCOHEMATOLÓGICAS.

A pesar de la ausencia de datos sobre la eficacia de estas vacunas en pacientes oncohematológicos, la experiencia con otras vacunas sí que auguraba una respuesta diferente a la población inmunocompetente. Sin embargo, la enorme variabilidad entre las diferentes enfermedades oncohematológicas y sus tratamientos dificulta poder generalizar resultados y, por tanto, realizar recomendaciones a los pacientes.

Actualmente, las guías para MM aconsejan la vacunación estacional contra influenza y neumococo, así como un programa de vacunación completo después del trasplante autólogo o alogénico, evitando las vacunas vivas atenuadas. A pesar de ello, los datos revelan que la respuesta a la vacunación en estos pacientes es menos efectiva que en la población general. Tanto la respuesta celular como la humoral se ven comprometidas por: i) los efectos inmunosupresores de la enfermedad, tales como hipogammaglobulinemia, el reemplazo de células plasmáticas no clonales por células plasmáticas tumorales y la linfopenia y la neutropenia causadas por la infiltración de la médula ósea; ii) la inmunosenescencia, ya que la mediana de edad de diagnóstico es superior a los 60 años y iii) los tratamientos que interfieren con una respuesta inmune eficaz [104]. De hecho, los estudios clínicos muestran que la seroconversión tras la vacunación frente a la influenza en pacientes con MM es del 19-49% después de una dosis, mientras que en pacientes con otros tipos de cáncer puede alcanzar el 70-80% [105]. Con respecto a la vacuna contra el neumococo, se detectaron niveles de anticuerpos en el 33% de los pacientes con MM que reciben la vacuna conjugada (PCV13) antes del autotrasplante, con tasas más altas en pacientes en RC del mieloma. Sin embargo, los títulos de anticuerpos parecen disminuir a los pocos meses y los títulos de IgG e IgM después de la vacunación no se correlacionan con una capacidad neutralizante adecuada, que es esencial para una respuesta eficaz ante bacterias encapsuladas [106]. Ningún estudio ha abordado específicamente el impacto de los distintos tratamientos utilizados (daratumumab, lenalidomida...) en pacientes con MM y la respuesta inmune tras las vacunas, siendo particularmente interesante el efecto, ya sea potenciador o inhibidor, que pueda tener los inmunomoduladores frecuentes en los esquemas de tratamiento del MM, sobre el sistema inmune.

En los pacientes con LLC el conocimiento sobre el impacto potencial del tratamiento sobre la respuesta inmune después de las vacunas son muy limitados. En general, se ha descrito una respuesta humoral subóptima tras la vacunación [107]. En los últimos años, agentes novedosos, como los BTKi, han cambiado el panorama del tratamiento de la LLC, pero se ha informado que la seroconversión después de la vacuna contra la influenza estacional en pacientes que recibieron ibrutinib (BTKi) fue del 7% en un estudio que evaluó la vacuna con dosis estándar y del 26% en otro estudio en el que una proporción de pacientes recibió una dosis más alta [108,109]. Las respuestas serológicas con las vacunas recombinantes contra la hepatitis B (HepB-CpG) y el herpes zóster (RZV) se han evaluado en pacientes con LLC sin tratamiento previo y en aquellos que reciben BTKi. Se observó una diferencia significativa en la respuesta de anticuerpos anti-HepB-CpG entre las cohortes sin tratamiento previo (28%) y BTKi (3,8%) 6 meses después de la vacunación. Por el contrario, al evaluar la respuesta de anticuerpos de recuerdo con la vacuna RZV no hubo diferencia en la respuesta serológica entre los dos grupos. Dada la falta de respuesta humoral “de novo” a la vacuna HepB-CpG en la cohorte BTKi, se sugiere que la vacunación contra nuevos antígenos debe considerarse antes de iniciar la terapia con estos fármacos [110]. Además, Yri et al demostraron que, de 67 pacientes

en tratamiento con rituximab y vacunados contra influenza, ninguno presentó títulos de anticuerpos protectores tras recibir una dosis en comparación con el 82% de los controles [111].

La respuesta inmune en pacientes con LMC tratados con ITKs se evaluó después de la vacunación contra el virus influenza y no se encontraron diferencias significativas en la respuesta de las células T de memoria en comparación con los sujetos sanos. En cambio, la respuesta humoral y la población de células B de memoria fueron significativamente menores en los pacientes que recibieron la vacuna antineumocócica [112]. Nuestro grupo ha demostrado recientemente que los pacientes con LMC tratados con ITKs presentan niveles elevados de anticuerpos contra patógenos ubicuos vacunables, como el sarampión y el virus de la varicela-zóster, y no vacunables, como el citomegalovirus, el herpes simple de tipo 1 o el virus de Epstein Barr, así como que el uso de ITKs podría mejorar el efecto antiviral sobre el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) [113]. También se ha objetivado que la respuesta inmune en pacientes con LMC puede modularse positivamente por el tratamiento con los ITKs, facilitando la posibilidad de suspender el tratamiento en pacientes con esta patología [114]. Se desconoce la implicación que puede tener la suspensión del tratamiento en pacientes con LMC y la respuesta inmunitaria frente a patógenos.

Por último, en receptores de TASPE o Alo-TPH, la recomendación es reiniciar el calendario vacunal tras el trasplante, independientemente del estado serológico previo del receptor o donante. La respuesta a la vacuna del neumococo se estima entre 64-98% tras recibir 3 dosis de la vacuna conjugada PCV7 en receptores alogénicos [115] de 3 a 9 meses tras el trasplante. La vacuna polisacárida (PS) obtiene peores resultados durante el primer año, pero sí se han objetivado resultados aceptables (mayor al 80%) si es administrada después del primer año, tras recibir previamente 3 dosis de PCV7 [116]. En relación con la vacuna del *Haemophilus influenza* y la del tétanos y difteria, las respuestas serológicas parecen ser buenas, superando el 80% tras dos o tres dosis, mientras que son bastante bajas tras la vacuna de los distintos tipos de meningitis en los escasos estudios que se han publicado [115]. La seroconversión con la vacuna del virus influenza también es subóptima [115,117,118], aunque parece que se obtiene un beneficio clínico incluso en ausencia de seroconversión, con una disminución en la gravedad de los casos en las infecciones de brecha [119], probablemente debido a una respuesta celular T eficiente a la vacuna [117]. Muchas de estas respuestas estarán matizadas por otros factores relacionados con el trasplante, como puede ser la presencia de EICR, hipogammaglobulinemia, diferentes tratamientos inmunosupresores o terapias adyuvantes.

En conclusión, el estudio de la respuesta a la vacunación en pacientes oncohematológicos es muy limitado, y especialmente reducidos a la valoración de la respuesta humoral a través de la medición de anticuerpos específicos, con poca atención a la respuesta celular, probablemente por la complejidad que añaden estos estudios. También resulta importante realizar un seguimiento a largo plazo de estos resultados, ya que para mantener esta protección en el tiempo es necesario el desarrollo de linfocitos de memoria, que puede estar también limitado en estos pacientes. Sí parece evidente que la respuesta a las vacunas depende mucho de la enfermedad y el tratamiento recibido.

Es necesario, por tanto, estudios inmunológicos que intenten proporcionar una visión más completa de lo que sucede en la respuesta inmune “in vivo” en los sujetos tras la vacunación frente a la COVID-19, describiendo no únicamente una respuesta serológica sino también incorporando los efectos de las vacunas sobre la inmunidad celular. Al mismo tiempo, es preciso crear cohortes de pacientes bien definidas, con características clínicas similares que nos permitan identificar las diferencias en la respuesta inmune que surgen del impacto de las diferentes enfermedades oncohematológicas y sus tratamientos.

2

JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La pandemia del SARS-CoV-2 ha supuesto un punto de inflexión en nuestra historia. Las consecuencias que tuvo este desconocido virus en nuestras vidas hubieran sido impensables tan solo unas semanas antes de su llegada a España. Nadie pudo imaginar una expansión mundial tan rápida ni las terribles consecuencias sociales, económicas y, especialmente, sanitarias que hemos vivido. En cuestión de días los hospitales, centros sanitarios y residencias se encontraron colapsados con pacientes infectados por un microorganismo desconocido, sin apenas medios con los que atenderlos ni conocimientos para poder tratarlo. Fue la época conocida como “primera ola” (aún ignorábamos que vendrían más), que duró hasta junio 2020.

La respuesta social y, especialmente de la comunidad científica, fue abrumadora. Empresas, fábricas e individuos se volcaron por contribuir con lo que estaba a su alcance. La comunidad científica, independientemente de especializaciones o cargos, se unió con el objetivo de acelerar al máximo el estudio de este nuevo virus y optimizar el tratamiento ofrecido a los pacientes.

En este contexto, el servicio de Hematología del Hospital Ramón y Cajal (HRyC), como tantos otros, se unió a la Unidad MacroCovid, dedicada exclusivamente a atender a los pacientes con COVID-19, que en aquel momento constituían más del 95% de un hospital que ya hacía tiempo había alcanzado el máximo de su capacidad de ocupación. Al igual que muchos otros profesionales, atender diariamente decenas de pacientes con COVID-19 nos permitió ganar experiencia e identificar características clínicas de distintos pacientes con mayor riesgo de desarrollar una enfermedad grave (días de evolución de síntomas, antecedentes personales...). Pero esto no era suficiente, el SARS-CoV-2 se resistía a desvelar, entre otras muchas cosas, la respuesta a lo que quizá se convirtió en la pregunta más angustiada: la razón por la cual algunos pacientes empeoraban hasta el punto de acabar en la UVI en cuestión de días, mientras que otros permanecían prácticamente asintomáticos.

Afortunadamente, previamente a la pandemia habíamos trabajado con el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), en concreto con su Unidad de Inmunopatología del sida, en diversos proyectos sobre respuesta inmune en pacientes con LMC. También esta unidad del ISCIII, como estaba sucediendo al mismo tiempo en innumerables centros de investigación en todo el mundo, dejó en segundo plano sus proyectos particulares al inicio de la pandemia para sumarse al esfuerzo común por generar conocimiento sobre el SARS-CoV-2. De este interés compartido por conocer y mejorar la atención a los pacientes, y la relación entre las dos instituciones, surge esta colaboración y posterior creación de este grupo de investigación, que inicia su andadura buscando factores predictores de gravedad en los pacientes con COVID-19 [26,120], intentando describir características que permitan identificar aquellos pacientes con mayor riesgo de desarrollar un cuadro grave. Además, a través del estudio de la respuesta inmune una vez que el paciente ya presenta una COVID-19 severa, buscamos también factores que permitan diferenciar aquellos que van a evolucionar a una COVID-19 crítica [121]; esto nos permite conocer la correlación entre una respuesta inmune y su cuadro clínico y las diferencias que se encuentran en las respuestas inmunes de pacientes con cuadros clínicos de distinta gravedad.

Una vez superado el impacto inicial de las primeras semanas de la primera “ola”, surge en el equipo la urgencia por conocer el verdadero alcance de esta infección en nuestros pacientes, los oncohematológicos, conociendo el altísimo riesgo que para ellos suponen otras infecciones. Tras un estudio preliminar entre los pacientes de nuestro servicio, estimamos una mortalidad superior al 30%, identificándose el estado de la enfermedad hematológica (progresión, RP, RC), el ECOG, la edad y el desarrollo de SRAS como factores predictivos de mortalidad [58]. Asumiendo que la razón de esta evolución tan desfavorable se debe a una respuesta inmune deteriorada e ineficaz por la enfermedad y los tratamientos; conociendo que esta es la misma razón por la que la respuesta a las vacunas con-

tra otros patógenos también se encuentra disminuida en estos pacientes, y habiendo sido aprobadas recientemente varias vacunas contra la COVID-19 que habían excluido en sus ensayos a pacientes oncohematológicos, nuestro grupo decidió centrar su estudio en la respuesta inmune desarrollada en pacientes oncohematológicos tras la infección o la vacunación frente a la COVID-19.

Reclutamos a pacientes con diferentes enfermedades oncohematológicas con el objetivo de crear varias cohortes de pacientes y evaluarlos en diferentes momentos a lo largo del calendario vacunal.

En primer lugar, estudiamos a pacientes receptores de TASPE. El objetivo de este estudio radica en que estos pacientes debían esperar al menos 3 meses para iniciar la vacunación frente a la COVID-19 tras la infusión de las células madre hematopoyéticas, ya que se habían adoptado las mismas medidas que para otro tipo de vacunas, a pesar de la falta de evidencia. Dada la alta incidencia de COVID-19 que había en la Comunidad de Madrid en ese momento, estos pacientes presentaban un alto riesgo de contagio hasta cumplir los 3 meses establecidos. Muchos de estos pacientes se habían contagiado de SARS-CoV-2 previamente al trasplante, por lo que la premura de este estudio radicaba en saber si estos pacientes, que ya habían presentado una infección con COVID-19, mantenían cierta inmunidad que pudiera ser protectora hasta que pudieran iniciar su vacunación. Además, este estudio respaldaría las recomendaciones de vacunación frente a la COVID-19 en estos pacientes, para quienes se habían adoptado las referentes a otras vacunas. Los resultados se recogen en el capítulo 5.1: *“Strong cellular immune response, but not humoral, against SARS-CoV-2 in oncohematological patients with Autologous Stem Cell Transplantation after Natural Infection”* [122].

En la misma línea, publicamos el artículo *“Early cellular and humoral responses developed in oncohematological patients after vaccination with one dose against COVID-19”* [123], recogido en el capítulo 5.2. En este artículo intentamos estudiar si los pacientes oncohematológicos presentaban alguna respuesta inmune, aunque fuera parcialmente protectora frente a la COVID-19, tras recibir una única dosis de la vacuna, confiados en que esto pudiera prevenir al menos la infección severa en estos pacientes durante las 3 o 4 semanas que debían demorar hasta recibir la segunda dosis (o más de 3 meses en los que habían recibido Vaxzevria).

Siguiendo el camino iniciado con el capítulo 5.1, *“Persistent immunity against SARS-CoV-2 in individuals with oncohematological diseases who underwent autologous or allogeneic stem cell transplantation after vaccination”* [124], recogido en el capítulo 5.3, estudia si los pacientes que reciben un trasplante tras haber completado su pauta de vacunación frente a la COVID-19 mantienen cierta inmunidad que pudiera resultar protectora en los 3-6 meses que tienen que esperar para ser revacunados.

Por último, un grupo de pacientes que generó gran inquietud tras aparecer los primeros resultados sobre la respuesta de pacientes oncohematológicos a las vacunas fueron los que habían recibido rituximab en el último año, ya que la aplasia de células B de estos pacientes es prolongada y limita, cuanto menos, una buena respuesta humoral de anticuerpos, con bajísimas tasas de seroconversión. Estos pacientes fueron priorizados para recibir una vacuna booster, con el objetivo de que esta mejorara los resultados obtenidos, si bien tampoco había información que permitiera recomendarlo con demasiada evidencia. El objetivo de *“Strong humoral but not cellular immune responses against SARS-CoV-2 in individuals with oncohematological disease who were treated with rituximab before receiving a vaccine booster”* [125], en el capítulo 5.4, es evaluar el beneficio de este booster en este grupo específico de pacientes, valorando no sólo resultados de seroconversión, sino estudiando si estos pacientes pueden desarrollar una respuesta celular efectiva contra el SARS-CoV-2 sin necesidad de presentar seroconversión.

En resumen, el objetivo último de esta tesis es proporcionar un conocimiento más exhaustivo y global de la respuesta inmune de pacientes con neoplasias hematológicas tras la vacunación frente a la COVID-19, como contribución a la definición de recomendaciones dirigidas a este grupo tan particular y específico de pacientes.

3

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Nuestra hipótesis es que la respuesta a la vacuna frente a la COVID-19 estará más disminuida en individuos con patologías oncohematológicas que en la población inmunocompetente evaluada en los ensayos clínicos que dieron lugar a la aprobación de las vacunas. También presuponemos que esta respuesta variará entre diferentes grupos de pacientes oncohematológicos por las características específicas que tienen cada una de las patologías y sus tratamientos, que condicionarán disfunciones particulares y diversas.

Objetivo principal

Evaluar la calidad de la respuesta inmunitaria de tipo humoral y celular desarrollada tras recibir la vacunación frente a la COVID-19 en pacientes con enfermedades oncohematológicas.

Objetivos secundarios:

- a. Generar cohortes de pacientes con enfermedades oncohematológicas y de controles sanos.
 - Bloque I: Determinación de la respuesta inmune celular y humoral de pacientes con neoplasias hematológicas que se someten a un TASPE tras padecer una infección natural por COVID-19.
 - Bloque II: Determinación de la respuesta inmune celular y humoral temprana de pacientes con LMC, MM, LLC y Alo-TPH tras la primera dosis de la vacuna frente a la COVID-19.
 - Bloque III: Determinación de la respuesta inmune celular y humoral de pacientes vacunados para la COVID-19 que se someten posteriormente a un trasplante.
 - Bloque IV: Determinación de la respuesta inmune celular y humoral tras el booster para la COVID-19 en pacientes tratados previamente con rituximab.
- b. Estudio de la respuesta inmunitaria humoral en estas cohortes.
 - b.1. Caracterización fenotípica de subpoblaciones de linfocitos B
 - b.2. Cuantificación de niveles de IgG anti-SARS-CoV-2 en plasma
 - b.3. Determinación de la capacidad neutralizante del suero
 - b.4. Determinación de la actividad citotóxica dependiente de anticuerpos
- c. Estudio de la respuesta inmunitaria celular en estas cohortes
 - c.1. Caracterización fenotípica de poblaciones citotóxicas.
 - c.2. Análisis de la actividad citotóxica directa
- d. Determinar la incidencia de infecciones de brecha durante el seguimiento

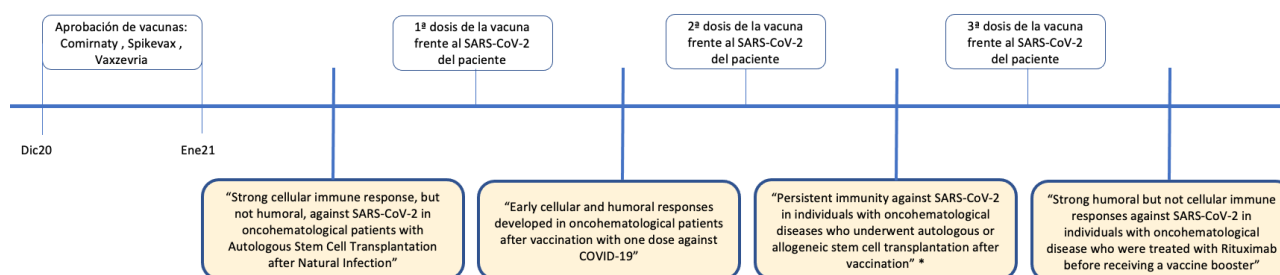
4

**MATERIAL
Y MÉTODOS**

4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio prospectivo, de carácter observacional y longitudinal, que se ha realizado como colaboración del servicio de Hematología y Hemoterapia del HRyC y la Unidad de Inmunopatología del sida del ISCIII.

Reclutamos 6 cohortes de pacientes con distintos tipos de neoplasias hematológicas y tratamientos del servicio de Hematología del HRyC de Madrid. Se extrajeron muestras de sangre previamente al inicio de la vacunación y posteriormente en distintos momentos tras las siguientes dosis para valorar la evolución de la respuesta inmune a lo largo del tiempo (*Figura 6*). Los pacientes recibieron la vacuna que les correspondía según las indicaciones del Ministerio de Sanidad.



*La mayoría de los pacientes se trasplantaron después de recibir las dos primeras dosis de la vacuna

Figura 6. Diseño del estudio. Se representa en qué momento de la vacunación de los pacientes se realizó cada uno de los estudios que recogen los artículos presentados en la memoria de la tesis.

4.2. GRUPOS POBLACIONALES

Reclutamos 211 pacientes con diferentes enfermedades oncohematológicas. Ninguno de los pacientes había padecido la COVID-19 antes de la vacunación a excepción de los 9 pacientes en los que se evalúa la respuesta inmune tras someterse a un TASPE [122].

Leucemia Linfocítica Crónica (LLC)

El grupo LLC, compuesto por 40 pacientes se dividió en varios subgrupos:

- 16 pacientes en protocolo de WW.
- 13 pacientes en tratamiento con ibrutinib en monoterapia.
- 11 pacientes con un tratamiento que no fuera un BTKi, incluyendo venetoclax u otros esquemas de inmunoterapia.

Leucemia Mieloide Crónica (LMC)

Reclutamos 37 pacientes con LMC en dos grupos:

- 27 en tratamiento con ITKs que presentan una respuesta molecular mayor.
- 10 que habían discontinuado ITKs tras alcanzar remisión profunda prolongada.

Mieloma Múltiple (MM)

Al reclutar los 40 pacientes con MM incluimos:

- 20 pacientes con tratamiento de mantenimiento tras recibir un TASPE.
- 20 pacientes no candidatos a TASPE en tratamiento de primera línea.

Trasplante alogénico de médula ósea (Alo-TPH)

Para este grupo de altísimo riesgo seleccionamos 47 pacientes que habían recibido un Alo-TPH en los últimos dos años o en los últimos tres si continuaban recibiendo tratamiento para la EICR:

- 36 pacientes que iniciaron la vacunación tras haber recibido el trasplante.
- 11 pacientes que se sometieron al Alo-TPH tras haber recibido al menos una dosis de la vacuna.

Trasplante autólogo de médula ósea (TASPE)

En este caso se reclutaron 27 pacientes que habían recibido un TASPE:

- 9 pacientes que habían pasado una COVID-19 leve y posteriormente recibieron un TASPE, incluyendo 6 pacientes con un MM (excluidos del grupo de MM por haber pasado la COVID previamente), 2 pacientes con un Linfoma de Hodgkin (LH) y otro con un Linfoma No Hodgkin (LNH).
- 18 pacientes que se sometieron al TASPE tras haber recibido al menos una dosis de la vacuna.

Rituximab

El sexto grupo consiste en 20 pacientes que habían recibido tratamiento con al menos 4 dosis de rituximab, la última de ellas no más de 12 meses antes. Participaron 18 pacientes con un Linfoma No Hodgkin (LNH), una Trombopenia Inmune (TI) secundaria a un Lupus eritematoso sistémico (LES) y una anemia hemolítica autoinmune (AHA) refractaria a varias líneas.

4.3. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE

El estudio de la respuesta inmune, tanto humoral como celular, se realizó en el ISCIII.

4.3.1. Procesamiento de las muestras

La muestra de sangre se procesó creando un gradiente de Ficoll-Hypaque (Pharmacia Corporation, North Peapack, NJ, EE. UU) en una proporción 1:1 y centrifugando a 1800rpm durante 35 min. Se recuperó el plasma y las células mononucleares (peripheral blood mononuclear cells, "PBMCs") se criopreservaron para su posterior análisis.

La línea celular Raji (ATCC CCL-86) fue proporcionada por el ISCIII. Estas células son linfocitos B que derivan de células del linfoma de Burkitt y, por tanto, expresan CD20, por lo que fueron diana del rituximab en el estudio de la respuesta celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

La línea celular Vero E6 (riñón de mono verde africano) (ECACC 85020206) fue proporcionada por el Dr. Antonio Alcami (CBM Severo Ochoa, Madrid, España). Las células Vero E6 son células que expresan el receptor ACE2 y sirvieron como diana al SARS-CoV-2.

Las células HEK-293T (embrionarias de riñón humano) provenían de la colección del ISCIII. Estas células son fáciles de cultivar y transfectar, lo que se hizo con el vector pNL4-3Δenv_Ren que expresa: i) el genoma del VIH-1 sin el gen env (gen de la envoltura), ii) el gen de la luciferasa Renilla como reportero de la replicación viral [126]; y el vector pcDNA3.1-SARS-CoV-2-SΔ19, que expresa la glicoproteína S (variante G614) del SARS-CoV-2 sin los últimos 19 aminoácidos [127]. De esta forma se crea un SARS-CoV-2 pseudotipado, de ciclo único, que se recubre con una membrana que expresa la proteína “S” del SARS-CoV-2 y emite luminiscencia cuando se replica. Otra ventaja adicional de este virus pseudotipado es, que al trabajar con ADN, es sencillo introducir por mutagénesis dirigida variantes del SARS COV-2.

Se cultivaron células Vero E6 y HEK-293T (National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Potters Bar, Reino Unido) en DMEM suplementado con 10 % de FCS, 2 mM de L-glutamina y 100 unidades/mL de penicilina y estreptomina (Lonza, Basilea, Suiza).

4.3.2. Subpoblaciones linfocitarias de estirpe B

El fenotipo de los linfocitos B (CD3-CD19+) se estudió mediante citometría de flujo definiendo la expresión de los marcadores de superficie CD10, CD27 y CD21: células inmaduras o de transición (CD10+ CD27-), células naive (CD10-CD27-CD21high), células de memoria agotadas parecidas a las tisulares de memoria (CD10-CD27-CD21low), células de memoria en reposo (CD10-CD27+ CD21high), células de memoria activadas (CD10-CD27+CD21low) y plasmablastos (CD27++ CD20-CD21low) [128].

Los anticuerpos CD3-PE, CD10-BV421, CD19-BV711, CD20-AlexaFluor700, CD21-FITC y CD27-PercP-Cy5.5 se adquirieron de BD Biosciences (San José, CA, EE. UU.). 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, EE. UU.). Se utilizó el software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, EE. UU.) para el análisis de datos.

4.3.3. Respuesta serológica de SARS-CoV-2

Para medir las IgGs contra la proteína S del SARS-CoV-2 se analizó el plasma, criopreservado previamente, mediante el ensayo ELISA Euroimmun Anti-SARS-CoV-2 (Euroimmun, Lübeck, Alemania). Los resultados se analizaron con el software EUROLabWorkstation ELISA y la interpretación de los resultados se realizó de manera semicuantitativa, obteniendo la relación de la extinción de cada muestra de plasma sobre el calibrador. Los resultados se consideraron positivos cuando el título de IgG fue > 1,1, los valores de 0,8 a 1,1 se consideraron indeterminados y los valores < 0,8 se consideraron negativos. Los datos límite se consideraron positivos.

4.3.4. Capacidad neutralizante de los anticuerpos

Para este experimento se hizo uso del virus SARS-CoV-2 pseudotipado descrito previamente. Se preincubaron durante 1h a 37 °C estos pseudovirus pNL4-3Δenv_SARS-CoV-2-SΔ19(G614)_Ren pseudovirus (10 ng p24 Gag por pocillo) con diluciones en serie (de 1/32 a 1/8192) de plasma descomplementado de aquellos pacientes con título de IgG positivo (ratio >1,1) [129]. A continuación, se añadieron un cultivo de células Vero 6 y se incubó durante 48h. Posteriormente se lisaron las células Vero E6 y se evauó la infectividad viral midiendo la actividad de la luciferasa Renilla (Renilla Luciferase Assay, Promega, Madison, WI, EE. UU.) con el luminómetro Centro XS3 LB 960 (Berthold Technologies, Baden-Württemberg, Alemania).

Si los anticuerpos no neutralizaban el virus, este infecta la célula Vero E6 tras la unión de su proteína S al receptor ECA2 celular y expresaba la luciferasa al replicarse dentro de la célula (Figura 7).

Los títulos de anticuerpos neutralizantes se representaron como una dosis inhibidora del 50 % (ID50) mediante regresión no lineal en GraphPad Prism Software (GraphPad, Inc., San Diego, CA, EE. UU.). 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 una regresión no lineal.

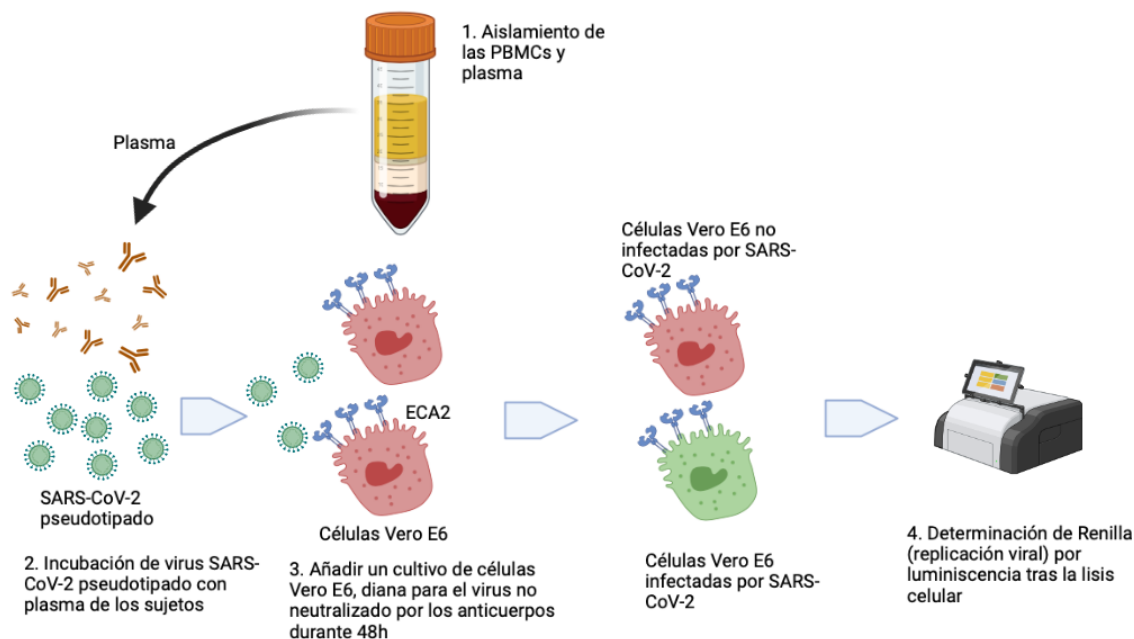


Figura 7. Determinación de la capacidad neutralizante del plasma. 1) Se aíslan las PBMCs y el plasma de los sujetos creando un gradiente de Ficoll-Hypaque. 2) El SARS-CoV-2 pseudotipado de ciclo único se incuba durante 1h con el plasma descomplementado de los sujetos con serología positiva para SARS-CoV-2. 3) Se añade un cultivo de células Vero E6, que expresan ECA2, receptor para la infección de los virus SARS-CoV-2. Los virus no neutralizados por los anticuerpos infectan las células vero E6. 4) Tras la infección el virus replica su genoma, expresando la luciferasa Renilla que es detectada por luminiscencia tras lisar las células. Creado con Biorender.com

4.3.5. Respuesta celular citotóxica dependiente de anticuerpos (ADCC)

Brevemente, las células Raji, que expresan CD20, sirven de diana al rituximab, un anticuerpo monoclonal anti-CD20. El rituximab que cubre la membrana celular de la célula Raji constituirá el anticuerpo que desencadenará la ADCC cuando sean cultivados con los PBMCs de los pacientes.

Así, la línea celular Raji se usó como objetivo para medir la capacidad de ADCC de las PBMC de individuos oncohematológicos, como se describió anteriormente [130]. Las células Raji se marcaron previamente con PKH67 Green Fluorescent Cell Linker (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y luego se cultivaron con rituximab (50 µg/mL) (Selleckhem, Houston, TX, EE. UU.) durante 4h. Se co-cultivaron células Raji marcadas con PBMCs (proporción 1:2) durante 18h y se determinó la apoptosis celular midiendo la expresión de anexina V por citometría de flujo, previo marcaje con Anexina V conjugada con ficoeritrina (PE) (Immunostep, Salamanca, España). Los datos se adquirieron y analizaron en un citómetro de flujo BD LSRFortessa X-20 (BD Biosciences) utilizando el software FlowJo_V10 (TreeStar Inc., Ashland, OR, EE. UU.) (Figura 8).

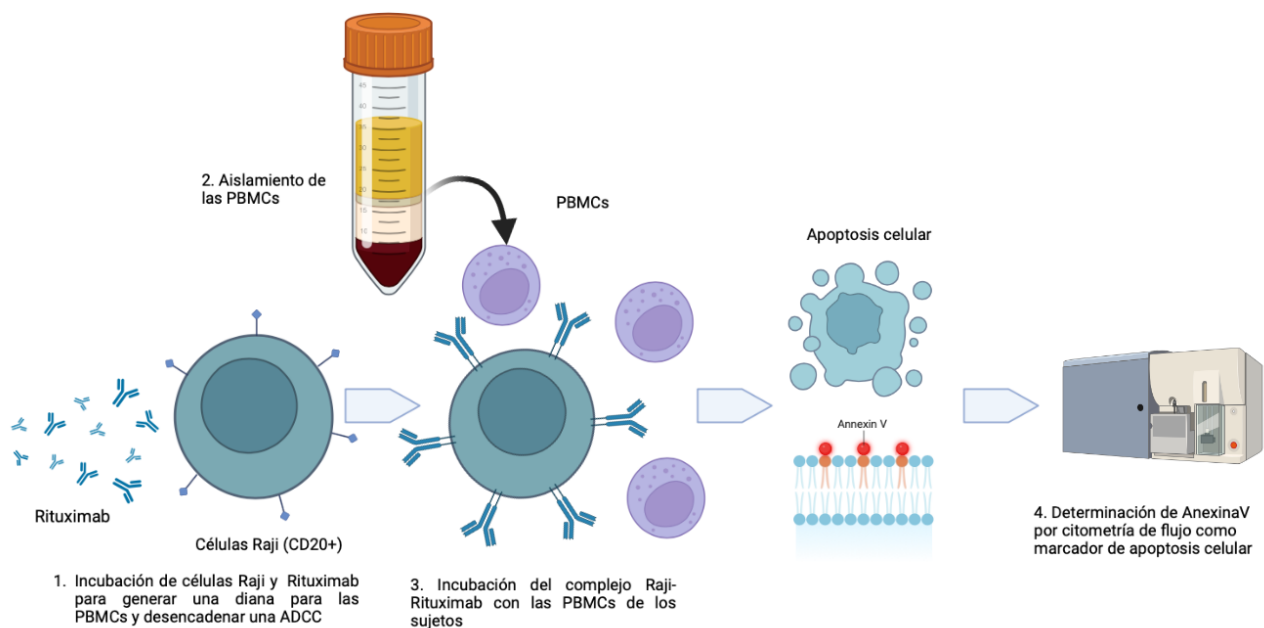


Figura 8. Respuesta celular citotóxica dependiente de anticuerpos (ADCC). 1) Las células Raji, que expresan CD20+, se incuban con rituximab, un anticuerpo monoclonal anti-CD20. 2) Se aíslan las PBMCs del paciente creando un gradiente de Ficoll-Hypaque. 3) Se co-cultivaron los PBMCs con las células Raji, recubiertas por rituximab, tras la unión antígeno (CD20) con el anticuerpo. 4) Se determina la expresión de Anexina V en la muestra por citometría, marcador de apoptosis celular. Creado con Biorender.com

4.3.6. Respuesta celular citotóxica directa

Para el análisis de la DCC se infectaron células Vero E6 con el pseudovirus (100 ng p24 Gag/pocillo) en placas de 48 pocillos. Después de 48h, las células Vero se co-cultivaron durante 1h con PBMCs de los individuos. Las células Vero E6 se separaron de la monocapa con una solución de tripsina-EDTA (Sigma Aldrich-Merck, Darmstadt, Alemania) y se determinó su muerte celular a través de la actividad de Caspasa-3 mediante luminiscencia, usando el sistema Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega) (Figura 9).

El sobrenadante del cultivo se retiró para realizar marcajes de superficie de las PBMCs con el objetivo de caracterizar las diferentes poblaciones celulares implicadas en la respuesta antiviral.

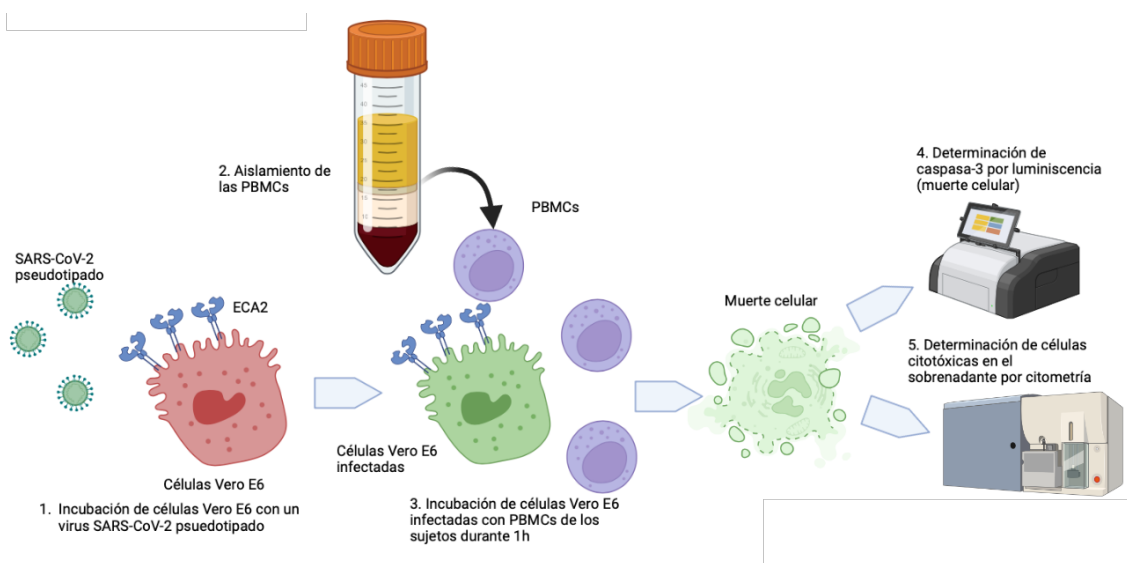


Figura 9. Respuesta celular citotóxica directa (DCC). 1) El SARS-CoV-2 pseudotipado de ciclo único se incubó con las células Vero E6, que expresan el receptor ECA2, receptor para la infección de SARS-CoV-2. 2) Se aislaron las PBMCs y el plasma de los sujetos creando un gradiente de Ficoll-Hypaque. 3) Las células Vero E6 infectadas se incubaron durante 1h con las PBMCs de los sujetos. 4) Se determinó la expresión de caspasa-3 por luminiscencia, marcador de muerte celular. 5) Se determinaron las poblaciones citotóxicas del sobrenadante por citometría de flujo. Creado con Biorender.com

4.3.7. Caracterización de poblaciones citotóxicas: linfocitos T, células NK y células NKT

El sobrenadante de la incubación de las Vero E6 infectadas y las PBMCs del individuo se retiró para realizar marcajes de superficie de las PBMCs con el objetivo de caracterizar las diferentes poblaciones celulares implicadas en la respuesta antiviral (Figura 9).

Se analizaron poblaciones de células citotóxicas como NK, NKT y TCR $\gamma\delta$ ⁺ mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos conjugados específicos: CD3-PE, CD56-BV605, CD16-PercP, CD8-APC-H7 y TCR $\gamma\delta$ -FITC (BD Biosciences). Los datos se adquirieron y analizaron en un citómetro de flujo BD LSRFortessa X-20 (BD Biosciences) usando el software FlowJo_V10 (TreeStar).

4.4. INFECCIONES DE BRECHA

Durante el período de estudio (febrero 2021-mayo 2022) se realizó un seguimiento clínico de los pacientes a través de la historia clínica hospitalaria, el Horus para la información de Atención Primaria y llamadas telefónicas periódicas para registrar las infecciones de brecha. Definimos infección de brecha como infección por COVID-19 objetivada por RT-qPCR o test de antígeno para SARS-CoV-2, sea en un centro hospitalario o en domicilio, tras haber iniciado la vacunación para la COVID-19. Registramos fecha de diagnóstico y resolución, así como gravedad de la infección según los criterios de la OMS.

4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism. Las diferencias estadísticas entre dos poblaciones se calcularon con la prueba U no paramétrica de Mann-Whitney. Se utilizó la prueba no paramétrica de rangos con signo de Wilcoxon para comparar dos poblaciones de un conjunto de muestras emparejadas antes y después del tratamiento. Los valores de p (p) de <0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

4.6. ASPECTOS ÉTICOS Y FINANCIACIÓN

Se reclutaron individuos con enfermedad oncohematológica del Servicio de Hematología del HRyC (Madrid, España). Se reclutaron donantes sanos del Centro de Atención Primaria de Salud Doctor Pedro Laín Entralgo (Madrid, España). Todos los individuos dieron su consentimiento informado por escrito para participar en el estudio. La confidencialidad y el anonimato están garantizados por las Leyes de Protección de Datos española y europea vigentes. El protocolo para el estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki y fue aprobado por los Comités de Ética del Hospital Universitario Ramón y Cajal (Informe favorable número 053-21) y la Comisión Central de Investigación de la Consejería de Salud (Comunidad de Madrid, España) (Informe favorable 20210008).

El estudio está financiado por los Proyectos de Investigación en Salud (AES 2021) del ISCIII, como proyecto FIS (PI21/00877).

5

RESULTADOS

5.1. “STRONG CELLULAR IMMUNE RESPONSE, BUT NOT HUMORAL, AGAINST SARS-COV-2 IN ONCOHEMATOLOGICAL PATIENTS WITH AUTOLOGOUS STEM CELL TRANSPLANTATION AFTER NATURAL INFECTION”

Este capítulo se corresponde con los resultados y discusión del artículo:

Vigon, L.; Sanchez-Tornero, A.; Rodriguez-Mora, S.; Garcia-Perez, J.; **Corona de Lapuerta, M.**; Perez-Lamas, L.; Casado-Fernandez, G.; Moreno, G.; Torres, M.; Mateos, E.; et al. ***Strong Cellular Immune Response, but Not Humoral, against SARS-CoV-2 in Oncohematological Patients with Autologous Stem Cell Transplantation after Natural Infection.*** J Clin Med 2022, 11, doi:10.3390/jcm11082137.

5.1.0. PRESENTACIÓN

En este artículo presentamos 9 pacientes con diferentes enfermedades oncohematológicas (6 MM, 2 LH y 1 LNH) que reciben un TASPE después de haber pasado una infección natural por SARS-CoV-2. Todos ellos tuvieron una COVID-19 asintomática o leve, al igual que los 10 donantes sanos que actúan como controles. Ni pacientes ni donantes habían recibido ninguna dosis de la vacuna frente a la COVID-19 en el momento del estudio.

Realizamos una caracterización de la respuesta inmune humoral y celular de los pacientes, tanto antes del trasplante, para determinar cuál es la respuesta basal de estos pacientes tras la infección, como después (*Figura 10*), para determinar el efecto que tiene el trasplante sobre esta respuesta.

Este estudio aporta información para poder establecer recomendaciones sobre la vacunación de la COVID-19 después del TASPE en pacientes oncohematológicos. Además, era primordial saber, en momentos de mucha incidencia de COVID-19, si una infección pasada confería protección frente a la reinfección o reinfección grave en estos pacientes, que, habiendo sido ya infectados, tenían que esperar a vacunarse por el trasplante.

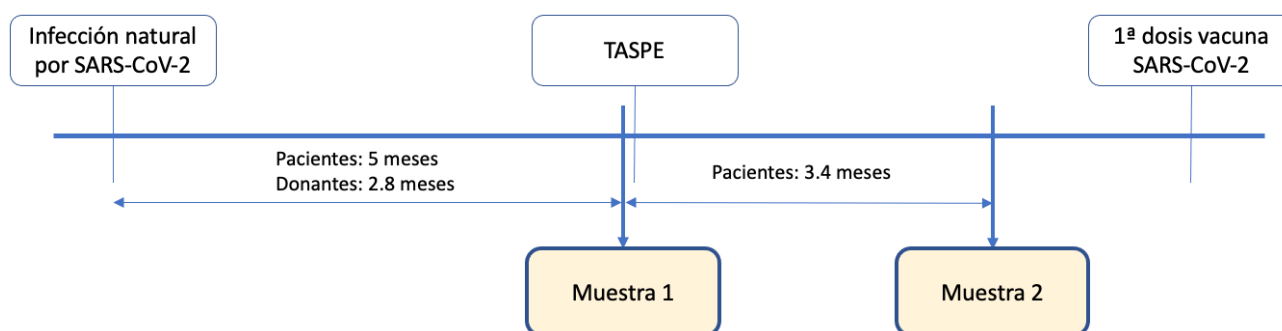


Figura 10. Diseño del estudio del capítulo 5.1.

5.1.1. RESULTS

5.1.1.1. Patient Cohorts

An observational, cross-sectional study that included nine patients with an oncohematological disease that required ASCT after being diagnosed with COVID-19 was conducted (*Table 3*). Six individuals were diagnosed with multiple myeloma (MM), two patients with Hodgkin's lymphoma (HL), and one patient with diffuse large B cell lymphoma (DLBCL). Most individuals were males (77.8%) and the median age was 64 years (interquartile range (IQR): 57.0 to 70.5). All individuals had mild or asymptomatic COVID-19. Forty-four percent of participants did not receive chemotherapy before COVID-19. After COVID-19 and prior to ASCT, all participants received chemoimmunotherapy. The median time from diagnosis of COVID-19 to ASCT was 5.0 months (IQR 3.9 to 8.8), whereas the median time from ASCT to sampling was 3.4 months (IQR 1.3 to 6.7).

Patient's Code	Oncohematological Disease *	Gender	Age (Years)	Pre-COVID-19 Treatment **	Post-COVID-19 Treatment, Prior to ASCT **	COVID-19 Symptoms	Time from PCR+ to Pre-Transplant Sample (Months)	Time from Transplant to Post-Transplant Sample (Months)
1	MM	Male	64	None	VRD	Asymptomatic	7.7	2.7
2	HL	Male	58	ABVD, BV-B	BV-B	Asymptomatic	3.7	1.2
3	MM	Male	70	None	VRD	Mild respiratory infection	9.6	1.6
4	MM	Male	71	VRD	VRD	Asymptomatic	1.6	4
5	HL	Male	35	ABVD	BV-ESHAP	Asymptomatic	4.4	6.6
6	DLBCL	Male	71	R-CHOP	PBR	Mild respiratory infection	4.7	7
7	MM	Female	64	VRD	VRD	Mild respiratory infection	5.3	6.7
8	MM	Male	58	None	VTD	Mild respiratory infection	3.1	1.0
9	MM	Female	56	None	VRD	Asymptomatic	9.2	1.0
Control's Code	Gender	Age (Years)	COVID-19 Symptoms		COVID-19 Treatment	Comorbidities ***	Time from PCR+ to Sample (Months)	
1	Female	58	Asymptomatic		None	None	2.4	
2	Female	41	Mild respiratory infection		None	None	2.8	
3	Male	29	Mild respiratory infection		None	None	2.9	
4	Female	26	Mild respiratory infection		None	None	2.9	
5	Male	62	Mild respiratory infection		HCQ	None	2.7	
6	Male	46	Mild respiratory infection		HCQ	DL	2.5	
7	Female	54	Mild respiratory infection		None	HTA	Ud	
8	Female	30	Mild respiratory infection		None	None	2.9	
9	Female	71	Mild respiratory infection		None	DL/HTA	3.2	
10	Male	70	Asymptomatic		None	HTA	Ud	

* DLBCL, diffuse large cell B lymphoma; HL, Hodgkin lymphoma; MM, multiple myeloma; ** ABVD, adriamycin-bleomycin-vinblastine-dacarbazine; BV-B, brentuximab vedotin-bendamustine; BV-ESHAP: brentuximab vedotin-etoposide-cisplatin-cytarabine-prednisone; PBR, polatuzumab vedotin-bendamustine-rituximab; R-CHOP, rituximab-cyclophosphamide-vincristine-doxorubicin-prednisone; R-ESHAP, rituximab-etoposide-cisplatin- cytarabine-prednisone; VRD, bortezomib-lenalidomide dexamethasone; VTD, bortezomib-thalidomide-dexamethasone.*** DL, dyslipidemia; HCQ, hydroxychloroquine; HTA, hypertension; Ud, undetermined.

Table 3. Clinical characteristics of oncohematological patients with post-COVID-19 autologous transplantation and healthy donors with mild COVID-19 who were recruited for the study.

Ten healthy individuals who were diagnosed with mild COVID-19 but did not suffer oncohematological disorders were recruited as controls (*Table 3*). The median age was 50 years (IQR 29.7 to 64), 40% were male, and the median time from diagnosis of COVID-19 to sampling was 2.8 months (IQR 2.6 to 2.9). The difference in time between diagnosis and sampling should not affect the results in the comparison with participants with oncohematological disease because the immune response against SARS-CoV-2 may remain stable over 7 months after infection [131-133].

None of the participants in the study were vaccinated against COVID-19 at the time of sampling.

5.1.1.2. Changes in B Cells Subpopulations in Individuals after ASCT

As expected, there was a substantial change in the distribution of B cell subpopulations after the ASCT procedure. Plasmablasts and immature B cells were increased 25.0- and 12.0-fold ($p = 0.0056$) on average, respectively, in individuals after ASCT, in comparison with healthy donors who passed mild COVID-19. Resting memory and naïve B cell subpopulations were reduced 8.0- ($p < 0.0001$) and 2.1-fold, respectively (*Figure 11*).

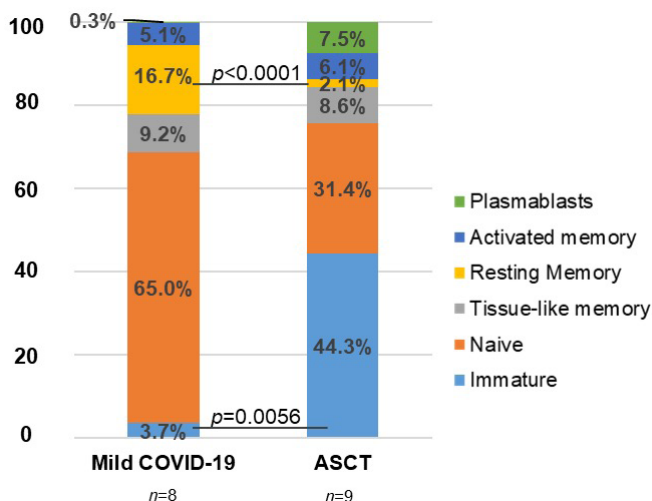


Figure 11. Analysis of the distribution of B cell subpopulations in individuals with oncohematological neoplasms after ASCT. Analysis by flow cytometry of B cell subpopulations in peripheral blood of patients with oncohematological disorders who underwent ASCT and healthy donors who had mild COVID-19 after staining with specific antibodies against markers CD10, CD127, CD20, and CD21. Data shown represent the mean. Statistical significance was calculated using Mann-Whitney non-parametric U test.

5.1.1.3. Effect of ASCT on the Levels of IgG against SARS-CoV-2 and Their Neutralization Capacity

Only 3 of 9 individuals with oncohematological disease who had COVID-19 before ASCT developed levels of IgG against SARS-CoV-2 above the threshold of detection (*Figure 12A*). IgG levels decreased 1.7-fold on average after ASCT ($p=0.0039$). The neutralizing capacity of these IgGs against SARS-CoV-2 was reduced 4.7-fold after ASCT (*Figure 12B*). The curves of neutralizing capacity are shown for these three individuals (*Figure 12C*).

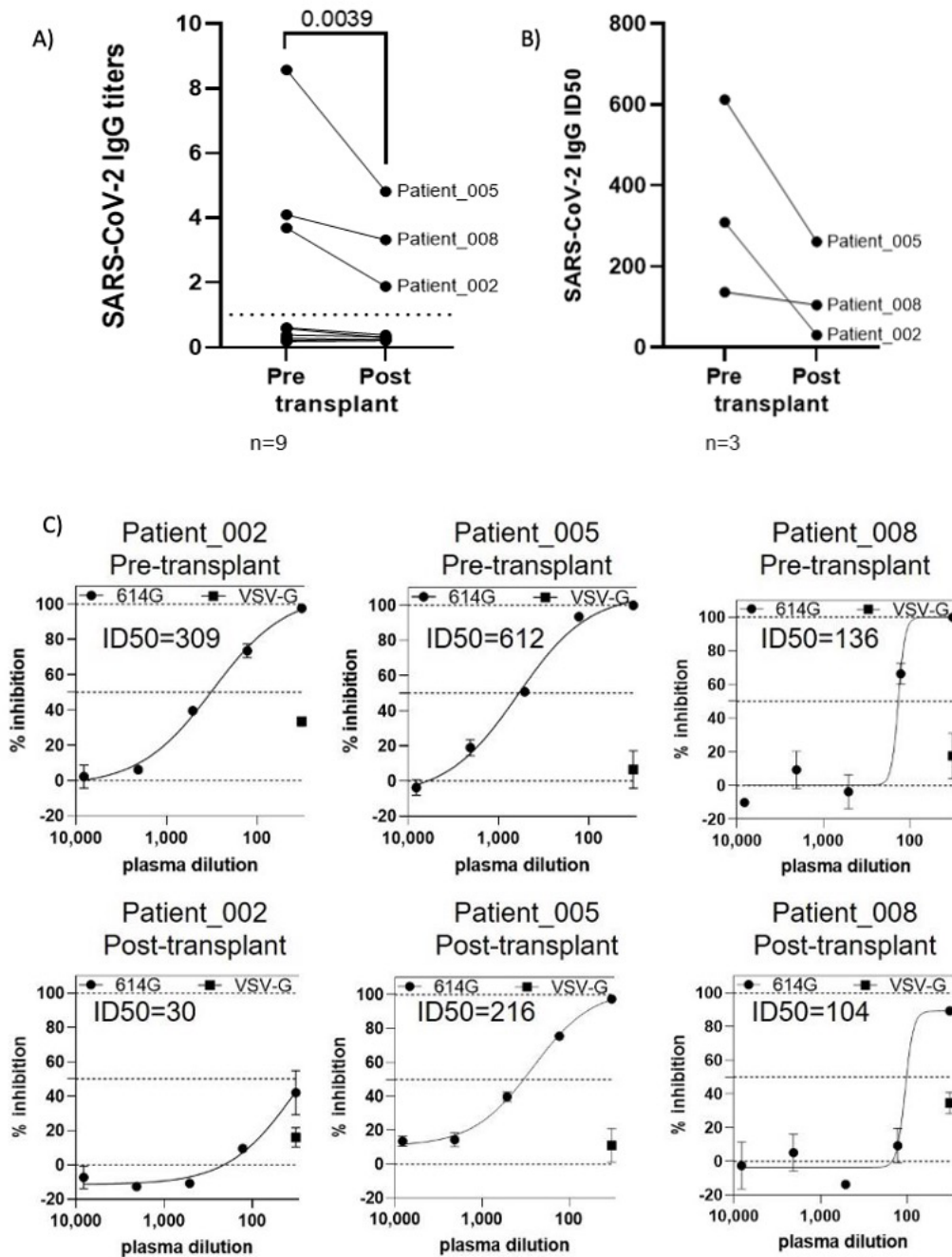


Figure 12. Levels of IgGs and neutralizing activity against SARS-CoV-2 in individuals with oncohematological neoplasms before and after ASCT. Analysis of anti-SARS-CoV-2 IgG levels (A) and anti-SARS-CoV-2 neutralizing assay represented as 50% inhibitory dose (ID50) (B) in plasma from patients with oncohematological disorders who underwent ASCT and healthy donors who had mild COVID-19. (C) Curves of neutralizing capacity in plasma from three oncohematological individuals with detectable levels of IgGs against SARS-CoV-2 before and after ASCT. Each dot represents data from one individual and lines represent mean \pm the standard error of the mean (SEM). Statistical significance was calculated using Wilcoxon signed-rank test.

5.1.1.4. Enhanced ADCC Activity in PBMCs from Oncohematological Individuals after ASCT

Antibody-mediated cytotoxic activity against rituximab-coated Raji cells of peripheral blood lymphocytes (PBMCs) from oncohematological patients was increased 2.1-fold on average after ASCT, in comparison with healthy donors who recovered from mild COVID-19 (*Figure 13*), but this difference was almost significant ($p=0.0592$).

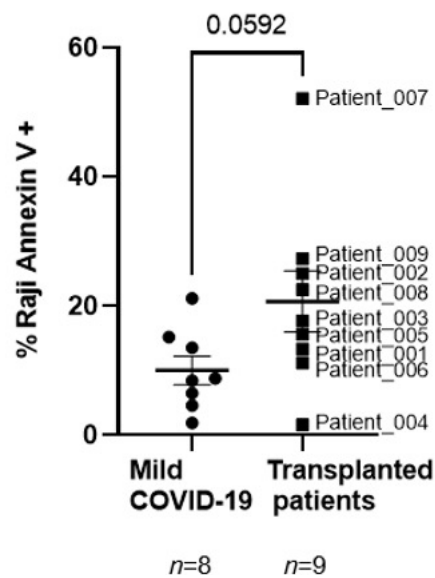


Figure 13. Analysis of ADCC in individuals with oncohematological neoplasms after ASCT. Quantification of early apoptosis with Annexin V-PE in PKH76-conjugated, rituximab-coated Raji cells after co-cultivation with PBMCs (1:2) from patients with oncohematological disorders who underwent ASCT and healthy donors who had mild COVID-19 as a measure of ADCC. Each dot corresponds to one sample and lines represent mean \pm SEM. Statistical significance was calculated using Mann–Whitney non-parametric U test.

5.1.1.5. Direct Cytotoxic Activity of PBMCs against SARS-CoV-2-Infected Cells

Direct cellular cytotoxicity (DCC) against SARS-CoV-2-infected cells of PBMCs from oncohematological individuals after ASCT was increased 1.5-fold in comparison with healthy donors who recovered from mild COVID-19 (*Figure 14A*). Cytotoxic populations with Natural Killer (NK) (CD3-CD56+CD16+), Natural Killer T (NKT) (CD3+CD56+CD16+), and CD8+TCR $\gamma\delta$ + T cell phenotypes were increased 1.9- ($p = 0.0311$), 1.9- ($p = 0.0592$), and 1.6-fold, respectively, in comparison with healthy donors (*Figure 14B*).

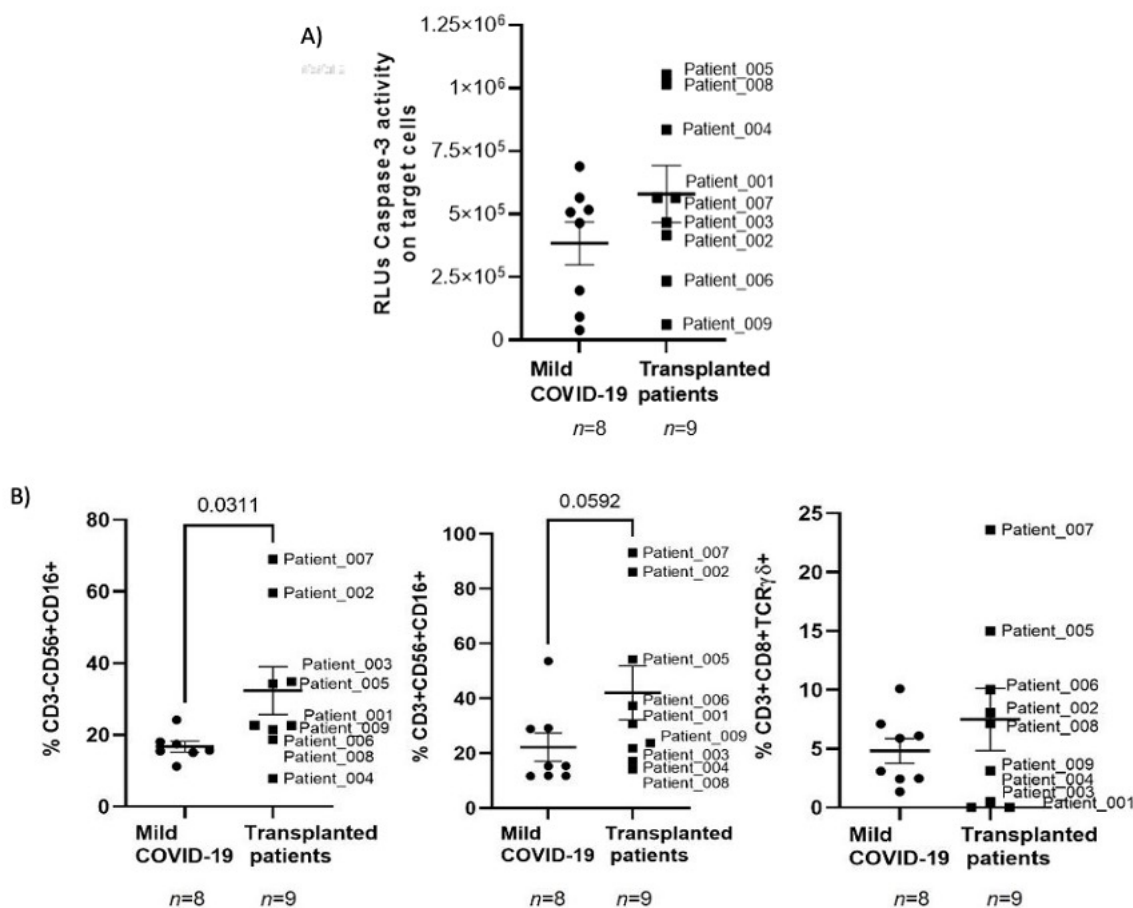


Figure 14. Analysis of DCC and cytotoxic cell populations in individuals with oncohematological neoplasms after ASCT. (A) The antiviral cytotoxicity of PBMCs from patients with oncohematological disorders who underwent ASCT and healthy donors who had mild COVID-19 was analyzed by quantifying caspase-3 activity in a monolayer of Vero E6 cells infected with pseudotyped SARS-CoV-2 viruses D614 and G614 that were co-cultured with PBMCs (1:10) for 1 h. (B) NK, NKT, and CD8+TCR+ cells were analyzed in supernatants of DCC assay by flow cytometry after staining with specific antibodies. Each dot corresponds to one sample and lines represent mean \pm SEM. Statistical significance was calculated using the Mann–Whitney non-parametric U test.

5.1.1.6. Synthesis of Cytokines by Cytotoxic Populations

The ability of the PBMCs from oncohematological patients to release pro-inflammatory cytokines after ASCT was analyzed in a subgroup of individuals due to a lack of sample. The production of interferon gamma (IFN γ) and tumor necrosis factor-alpha (TNF α) by NK cells upon stimulation with Hsp70 was increased, although these results did not achieve statistical significance (*Figure 15A*). This increased activity of cytotoxic population was also observed in NKT cells, which expression of IFN γ was increased 4.8-fold ($p = 0.0079$), in comparison with healthy individuals who had mild COVID-19 (*Figure 15B*). The release of TNF α was also increased 12.1-fold ($p = 0.0317$) in CD8+ T cells from oncohematological patients after ASCT upon stimulation with SARS-CoV-2 peptides (*Figure 15C*).

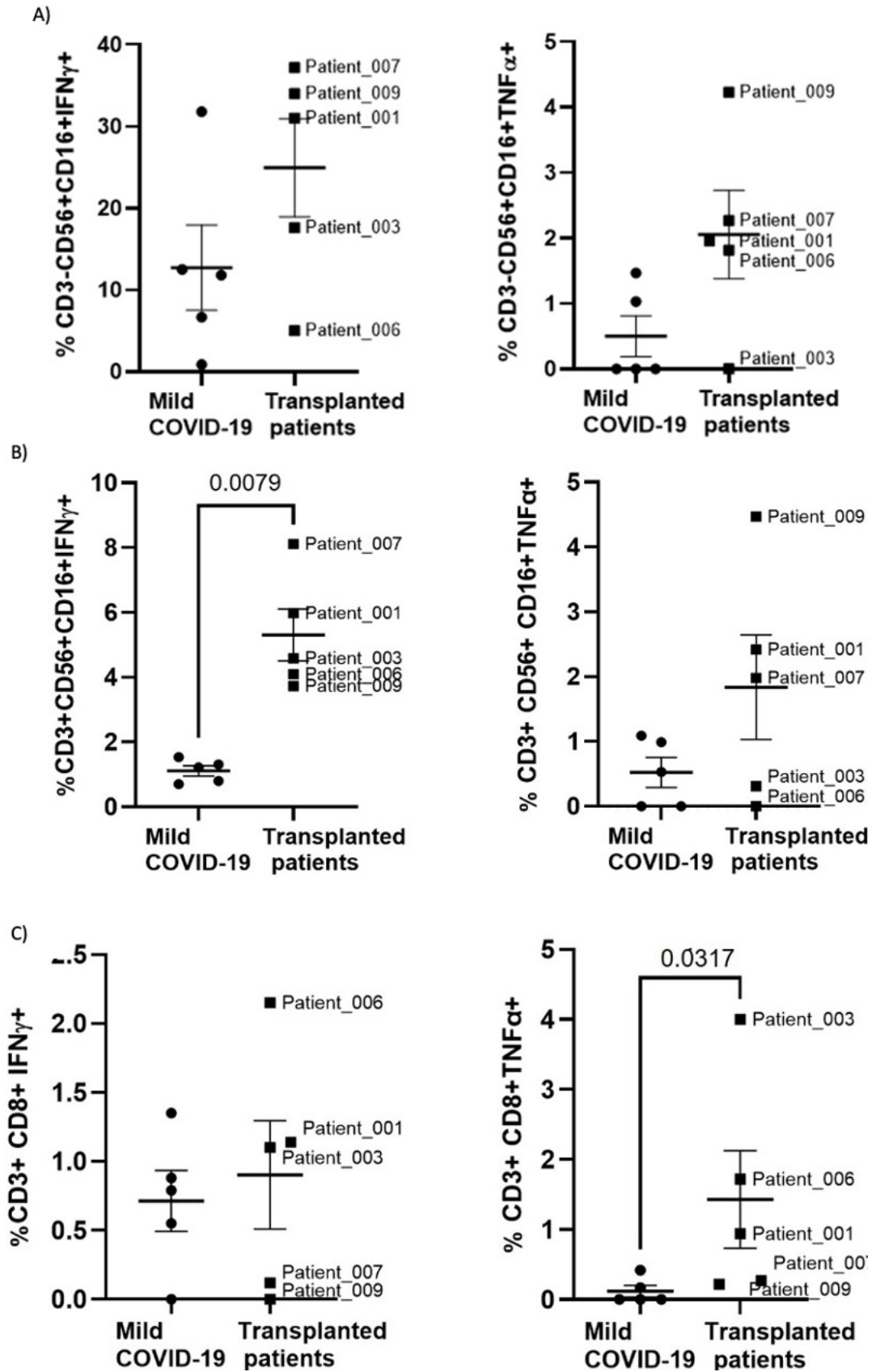


Figure 15. Analysis of NK, NKT and CD8+ T cell functionality in individuals with oncohematological neoplasms after ASCT. The synthesis of IFN γ and TNF α was analyzed by flow cytometry in NK (A), NKT (B), and CD8+ T cells (C) from patients with oncohematological disorders who underwent ASCT and healthy donors who had mild COVID-19, upon stimulation with Hsp70 or mixed SARS-CoV-2 peptides, respectively. Each dot corresponds to one sample and lines represent mean \pm SEM. Statistical significance was calculated using Mann-Whitney non-parametric U test.

5.1.2. DISCUSSION

Individuals with oncohematological neoplasms present alterations in their immune response due to the hematological disease or the immunosuppressive treatment. For this reason, these patients are most vulnerable to the infectious disease caused by the new coronavirus SARS-CoV-2 (COVID-19) [55,134,135]. Recent data have shown significantly impaired immune responses to SARS-CoV-2 exposure or vaccination in comparison with the general population, but most of these studies have been focused on the humoral immune response, with limited information about the cellular response that is developed against the infected cells [136-139]. In this study, we analyzed the quality and persistence of the humoral and cellular immune responses developed by nine individuals who were diagnosed with MM, HL, or DLBCL and were naturally infected with SARS-CoV-2 before receiving ASCT. Due to the necessity of an immune reconstitution after ASCT, it was expected that both humoral and cellular responses developed against SARS-CoV-2 prior to ASCT were substantially modified after this procedure, but this remained to be determined.

A poor humoral response after SARS-CoV-2 infection was observed in our cohort, as only 3 of 9 patients developed IgGs against SARS-CoV-2 before ASCT. These results were in accordance with previous reports from oncohematological patients with COVID-19 [69,140,141] and may be related to the blood disorder or to the treatment received at the time of infection. Two of these individuals with detectable IgGs were diagnosed with HL and on treatment with ABVD (adriamycin-bleomycin-vinblastine-dacarbazine), whereas the third participant with MM was on watchful waiting. A humoral response developed against SARS-CoV-2 was greatly diminished after ASCT in all three individuals, and the neutralizing capacity was reduced as well. Along with ASCT, which may negatively influence the humoral response, these individuals were treated with brentuximab vedotin and/or corticoids such as dexamethasone or prednisolone, which may also contribute to the reduction in IgG levels after ASCT. The other participants (6/9) were all treated with VRD (bortezomib-lenalidomide-dexamethasone), except the individual diagnosed with DLBCL who was treated with PBR (polatuzumab vedotin-bendamustine-rituximab), being the last two drugs able to eliminate B cells.

The reconstitution of the immune system after ASCT is variable and highly influenced by the immune characteristics of the recipient, the donor, and the treatment received before and after transplant [142]. Cells involved in innate immunity such as neutrophils, monocytes, and NK cells are usually restored sooner than cells related to the acquired immune response, such as B and T cells. It has been determined that CD8+ T cells reconstitution is faster than CD4+ T cells, which may occur after 3 months or later [143], but there is limited information about the reconstitution of B cell subpopulations. B cell count is usually recovered within one year after transplant [144] but normal function may be compromised during the first two years, due also to delayed CD4 recovery [145]. Consequently, complete immune restoration may take 2 years after ASCT [146]. Moreover, blood disorders are characterized by B-cell development deregulation with increased numbers of plasma cells in the bone marrow, which may interfere with an adequate humoral response against SARS-CoV-2 before ASCT [147]. This situation does not improve after ASCT because B cell immaturity may continue until complete restoration. In fact, the count of immature B cells in our cohort was increased more than 10-fold in comparison with healthy donors, which may account for the decrease in circulating IgGs against SARS-CoV-2 after ASCT due to the proportional loss of memory subpopulations. Interestingly, IgGs did not disappear completely more than 3 months after ASCT in patients_002, _005, and _008, which may be related to the huge level of surviving plasmablasts observed in the peripheral blood of these individuals. This sustained increased levels of plasmablasts have been observed after ASCT [148] and also after infection with SARS-CoV-2 [130].

Therefore, the impaired humoral response observed in our cohort may be related to the delayed CD4+ T cell reconstitution, which has a central role in the efficiently acquired immune response [149]. Surprisingly, a significant increase in ADCC was observed in PBMCs from oncohematological individuals after ASCT. Due to the absence of detectable IgGs against SARS-CoV-2 in these patients, rituximab-coated Raji cells were used as the target. Despite the impaired humoral response, potent unspecific ADCC activity was observed in these patients. Moreover, PBMCs from these individuals also showed high levels of activated, functional NK and NKT cells, as well as highly cytotoxic CD8+ T cells with TCR, which were related to an increased specific DCC against SARS-CoV-2 infected cells. The recovery of CD4 counts may take several years after ASCT in older patients [150] and our cohort had a median age of 64 years. However, the immune reconstitution of NK cells occurs soon after ASCT and these cells have been related to prolonged remission of neoplasms [149]. NK cells have a dual cytotoxic activity because they can mediate ADCC through the binding of CD16 to the target cell, but also to induce antibody-independent DCC that is not mediated by the major histocompatibility complex (MHC) [151]. Therefore, the cytotoxic activity of PBMCs from oncohematological patients was more likely related to innate immunity mediated by NK and NKT cells than to CD4-mediated acquired immunity developed before ASCT against SARS-CoV-2. On the other hand, six individuals from our cohort were treated with lenalidomide (5/9) or its analogue thalidomide (1/9). Lenalidomide is an immunomodulatory drug that induces an antiviral Th1 CD4-mediated response that stimulates NK cell activity through the release of IFN γ and IL-2 [152,153], increasing NK-mediated ADCC [154]. Therefore, we cannot rule out that the treatment received after ASCT was contributing to this enhanced NK activity.

In conclusion, treatment of oncohematological disorders with ASCT and the subsequent pharmacological treatment greatly affected not only the levels of IgGs specific of SARS-CoV-2 after natural infection but also their neutralizing capacity, which correlated with previous reports [155-158]. Therefore, similar deficient humoral responses may be expected in oncohematological patients who receive COVID-19 vaccines prior to ASCT. In contrast, a consistent cellular response to SARS-CoV-2 was observed in these patients, including those without a humoral response. This response was related to an enhanced restored NK activity or to the treatment received after ASCT, although we cannot rule out that some memory cells may remain after the mobilization and collection of CD34+ cells for subsequent infusion [159] or that memory cells located in the lymph nodes were not depleted like those in the bone marrow, allowing the generation of a cellular response during the immune reconstitution. The main limitation of this study was the number of patients recruited, but statistically significant results were obtained, nonetheless. Moreover, our cohort is now very rare because all oncohematological patients have already been vaccinated. To the best of our knowledge, this is the first report describing the enhanced cellular immune response developed by individuals with blood disorders previously exposed to SARS-CoV-2 that underwent ASCT. Finally, the maintenance of the immune response developed in oncohematological individuals before ASCT cannot be determined exclusively by analyzing the humoral response, but the cytotoxic activity should also be evaluated during the immune reconstitution.

5.2. “EARLY CELLULAR AND HUMORAL RESPONSES DEVELOPED IN ONCOHEMATOLOGICAL PATIENTS AFTER VACCINATION WITH ONE DOSE AGAINST COVID-19”

Este capítulo se corresponde con los resultados, discusión y conclusión del artículo:

Rodriguez-Mora, S. & **Corona, M.**; Torres, M.; Casado-Fernandez, G.; Garcia-Perez, J.; Ramos-Martin, F.; Vigon, L.; Manzanares, M.; Mateos, E.; Martin-Moro, F.; et al. *Early Cellular and Humoral Responses Developed in Oncohematological Patients after Vaccination with One Dose against COVID-19*. J Clin Med 2022, 11, doi:10.3390/jcm11102803.

5.2.0. PRESENTACIÓN

En este artículo seleccionamos 52 de pacientes de los reclutados para el estudio, constituyendo una muestra representativa de las cohortes de MM (n=15), LMC (n=10), LLC (n=15) y Alo-TPH (n=12) y evaluamos la respuesta inmune humoral y celular de estos individuos previamente y 3 semanas después de recibir la primera dosis de la vacuna frente a la COVID-19 (*Figura 16*). Los resultados son comparados entre los distintos grupos y frente un control de donantes sanos que habían recibido la primera dosis de Comirnaty. Los pacientes reciben Comirnaty, Spikevax o Vaxzevria según lo indicado a su grupo poblacional de riesgo, siguiendo las directrices del Ministerio de Sanidad.

Ni pacientes ni donantes habían sido infectados previamente por el virus y una serología basal se usó para descartar infecciones asintomáticas.

Este estudio permite establecer si una pauta incompleta de la vacunación frente a la COVID-19 proporciona algún tipo de protección frente a la infección, como parece que sí es en individuos inmunocompetentes. Esto era particularmente relevante en la época en la que el estudio se llevó a cabo, en que la incidencia de COVID-19 era altísima y los pacientes presentaban mucho riesgo de contagio mientras esperaban a la siguiente dosis (en los casos de Vaxzevria tenían que esperar hasta 3 meses) y, actualmente, en pacientes inmunodeprimidos que no puedan recibir las siguientes dosis por motivos externos (alergias, nuevos tratamientos, trasplante...).

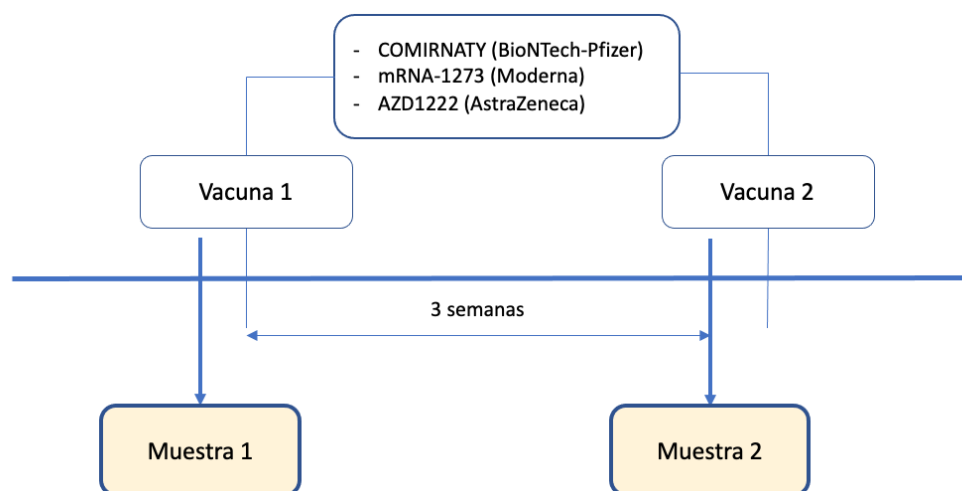


Figura 16. Diseño del estudio del capítulo 5.2.

5.2.1. RESULTS

5.2.1.1. Patients' Cohorts

A total of 52 patients were included in this study and segregated in four groups depending on diagnosis: MM (n = 15), CML (n = 10), CLL (n = 15), and Allo-HSCT (n = 12). Baseline demographic and clinical characteristics of these individuals are summarized in *Table 4*.

CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y CELULAR DESARROLLADA TRAS LA VACUNACIÓN PARA COVID-19 EN PACIENTES CON NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

Allo-HSCT, Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant; ASCT, Autologous Stem Cell Transplant; BTK, Bruton Tyrosine Kinase; cGvHd, Chronic Graft versus Host disease; CLL, Chronic Lymphatic Leukemia; CML, Chronic Myeloid Leukemia; IQR, interquartile range; MM, Multiple Myeloma; N/A, Not Applicable; TKI, tyrosine kinase inhibitor.

	CLL (n=15)	CML (n=10)	MM (n=15)	Allo-HSCT (n=12)
DEMOGRAPHIC CHARACTERISTICS				
Age, median (IQR)	65.9 (64.5-76.4)	61.9 (52-76.7)	72 (59.8-76.9)	60.1 (46.6-66-1)
Sex: male, n (%)	9 (60)	7 (70)	9 (60)	7 (58.3)
Days since first dose vaccination, median (IQR)	21 (18-33)	27 (21-28)	23 (18-27)	24 (20-28)
Treatment: n (%)	<ul style="list-style-type: none"> • BTK inhibitor: 4 (26.7) • Other treatments: 4 (26.7) • Watch and wait: 7 (46.7) 	<ul style="list-style-type: none"> • TKI discontinuation: 4 (40) • Active treatment with TKI: 6 (60) 	<ul style="list-style-type: none"> • Maintenance treatment after ASCT: 6 (40) • Not-ASCT candidates: 9 (60) 	<ul style="list-style-type: none"> • Immunosuppressive treatment: 6 (50) • Non-immunosuppressive treatment: 6 (50)
BONE MARROW TRANSPLANT PATIENTS				
Type: n (%)	N/A	N/A	ASCT: 6 (40)	Allo-HSCT: 12 (100)
Months since transplant, median (IQR)	N/A	N/A	32 (23-60)	36 (21-44)
cGvHd, n (%)	N/A	N/A	N/A	9 (75)
VACCINES AND ANALYTICS PARAMETERS				
Vaccine, n (%)				
• Vaxzevria (AstraZeneca)	4 (26.7)	3 (30)	0	0
• Spikevax (Moderna)	7 (46.7)	6 (60)	7 (46.7)	0
• COMIRNATY (Pfizer)	4 (26.7)	1 (10)	8 (53.3)	12 (100)
Pre-vaccine, median (IQR) x10 ⁹ /L				
• Neutrophils	3.2 (1.6-4.8)	3.5 (3.1-4)	2.4 (1.4-2.9)	2.9 (2.2-4.4)
• Lymphocytes	17.7 (1.1-79.8)	2.6 (1.9-2.9)	1.7 (1.2-2.4)	1.9 (1.3-2.9)
• Monocytes	0.6 (0.3-0.8)	0.6 (0.4-0.8)	0.5 (0.4-0.7)	0.6 (0.4-0.8)
• Platelets	119 (91.2-153)	241 (188.5-331.5)	160 (144-199.5)	197 (121.5-271.5)
Post-vaccine, median (IQR) x10 ⁹ /L				
• Neutrophils	4 (2-4.9)	4.6 (1.7-4.6)	2.3 (1.7-2.6)	3,2 (2,2-7,2)
• Lymphocytes	18.9 (5.3-112.6)	1.8 (0.1-3.5)	1.7 (1-2.2)	1,7 (0,2-7,4)
• Monocytes	0.9 (0.7-5.3)	0.5 (0.4-0.9)	0.5 (0.4-0.8)	0,6 (0,1-1)
• Platelets	166 (122.7-255)	199 (134-361)	166.5 (122.2-203.5)	262,5 (195 -477)

Table 4. Baseline demographic and clinical characteristics of the individuals with oncohematological diseases (OHD) recruited for this study.

In the cohort of CLL, 8 individuals (53.4%) were receiving active treatment: 4 of them with Bruton Tyrosine Kinase (BTK) inhibitors, 3 with rituximab and venetoclax and 1 with rituximab and idelalisib; whereas 7 individuals (46.6%) were on a Watch and Wait follow-up. A total of 11 individuals (73.3%) were vaccinated with a mRNA-based vaccine and 4 individuals (26.7%) were vaccinated with Vaxzevria (Astra Zeneca). In the cohort of CML, 40% of the patients had discontinued treatment with TKIs after achieving prolonged deep molecular response. Seven individuals (70%) were vaccinated with a mRNA-based vaccine and three individuals (30%) received Vaxzevria.

In the cohort of MM, 6 (40%) individuals were on maintenance treatment after ASCT, with a median time since transplant of 32 months (IQR 23–60). The rest of the MM patients were non-ASCT candidates under a first-line treatment: three individuals with lenalidomide and dexamethasone (Ld), four under daratumumab, bortezomib, melphalan and prednisone (DVMP), one with cyclophosphamide, bortezomib and dexamethasone (CyBorD) and one individual with daratumumab, lenalidomide, carfilzomib and dexamethasone (KDRd). All individuals were vaccinated with a mRNA-based vaccine.

In the cohort of Allo-HSCT patients, 6 individuals (50%) were receiving immunosuppressive treatment for active graft versus host disease (GvHD). Median time since allogeneic transplant was 36 months (IQR 21–44). All individuals were vaccinated with a mRNA-based vaccine.

A total of 14 healthy donors were also recruited for this study, with a median age of 52 years (IQR 46.25–58.25). Fifty percent of the donors were male, and 6 (42.8%) individuals were vaccinated with COMIRNATY (BioNTech-Pfizer), whereas 8 (57.1%) individuals received COVID-19 Vaccine Janssen (Ad26.COV2-S, Janssen).

5.2.1.2. Early Serological Response after One Dose of SARS-CoV-2 Vaccine

A single-dose of COVID-19 vaccine elicited IgG seroconversion in 42.8% of healthy donors versus 13.33% in CLL, 90% in CML, 40% in MM, and 41.6% in Allo-HSCT (*Figure 17A*). Therefore, all cohorts except CLL presented IgG SARS-CoV-2 titers over the threshold of detection three weeks after the administration of one dose of the vaccine, with statistical significance in the difference between pre- and post-vaccination samples in all OHD cohorts. Interestingly, whereas individuals with MM and Allo-HSCT showed similar levels of IgGs than healthy donors, patients with CML achieved a very potent humoral response, with early IgGs titers against COVID-19 that were increased 5.4- ($p < 0.0001$), 2.9- ($p = 0.0026$), and 2.8- ($p = 0.0058$) fold in comparison with individuals with CLL, MM and HSCT, respectively, and also 3.3-fold higher than healthy donors ($p = 0.0012$).

The neutralizing capacity against SARS-CoV-2 of IgGs from the individuals with detectable antibodies in plasma was also analyzed. All healthy donors (7/7; 100%) with detectable IgGs developed neutralizing antibodies above the threshold of detection, whereas only 56% of the individuals with OHD showed neutralizing IgGs: 1/3 (33%) CLL, 5/9 (55%) CML, 4/7 (57%) MM, and 4/6 (67%) Allo-HSCT (*Figure 17B*). This neutralizing activity was similar or lower than healthy donors, except for individuals with CML and Allo-HSCT who presented mean levels of neutralizing antibodies that were increased in comparison with healthy donors, although these results did not achieve statistical significance. Only three individuals with CLL developed IgGs against SARS-CoV-2 after one dose of vaccine, and only one developed highly neutralizing antibodies, whereas the other two individuals showed IgGs with neutralizing activity below the threshold of detection.

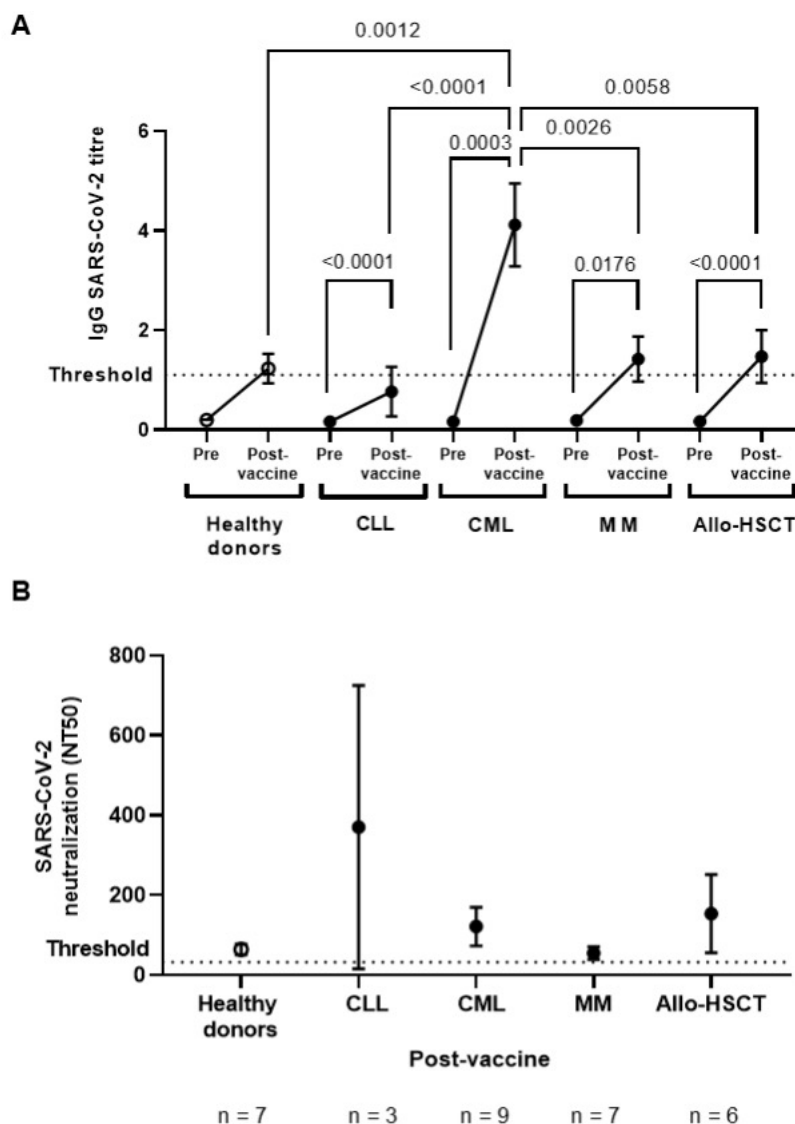


Figure 17. Serological response against SARS-CoV-2 in plasma from individuals with OHD. (A) IgGs titers in plasma from individuals with CLL, CML, MM, or Allo-HSCT after receiving one-dose of SARS-CoV-2 vaccine, in comparison with healthy donors. (B) Neutralizing activity against SARS-CoV-2 of IgGs from individuals with OHD and healthy donors after one-dose vaccination. Each dot in the graph corresponds to mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical significance between groups was calculated using one-way ANOVA test and statistical significance within groups was calculated using Mann–Whitney test.

5.2.1.3. Early Changes in B Cell Subpopulations after One Dose of SARS-CoV-2 Vaccine

Total levels of B cells did not significantly change within groups after receiving the first dose of the vaccine (*Figure 18A*). The CLL cohort presented the highest levels of B cells (CD19+), which were increased 5.1- ($p < 0.0001$), 4.2- ($p < 0.0001$), and 3.7-fold ($p < 0.0001$), respectively, in comparison with individuals with CML, MM, and Allo-HSCT.

The most significant differences between groups of individuals with OHD were observed in the subpopulation of naïve B cells (CD10-CD27-CD21high) (*Figure 18B*). Individuals with CLL and MM showed naïve B cell levels significantly reduced 1.8- ($p < 0.0001$) and 1.3-fold ($p = 0.0162$), in comparison with healthy donors. Moreover, resting memory B cells (CD10-CD27+CD21high) were reduced 1.9- ($p = 0.0440$) and 7.6-fold ($p = 0.0214$) in individuals with CLL and Allo-HSCT, in comparison with healthy donors.

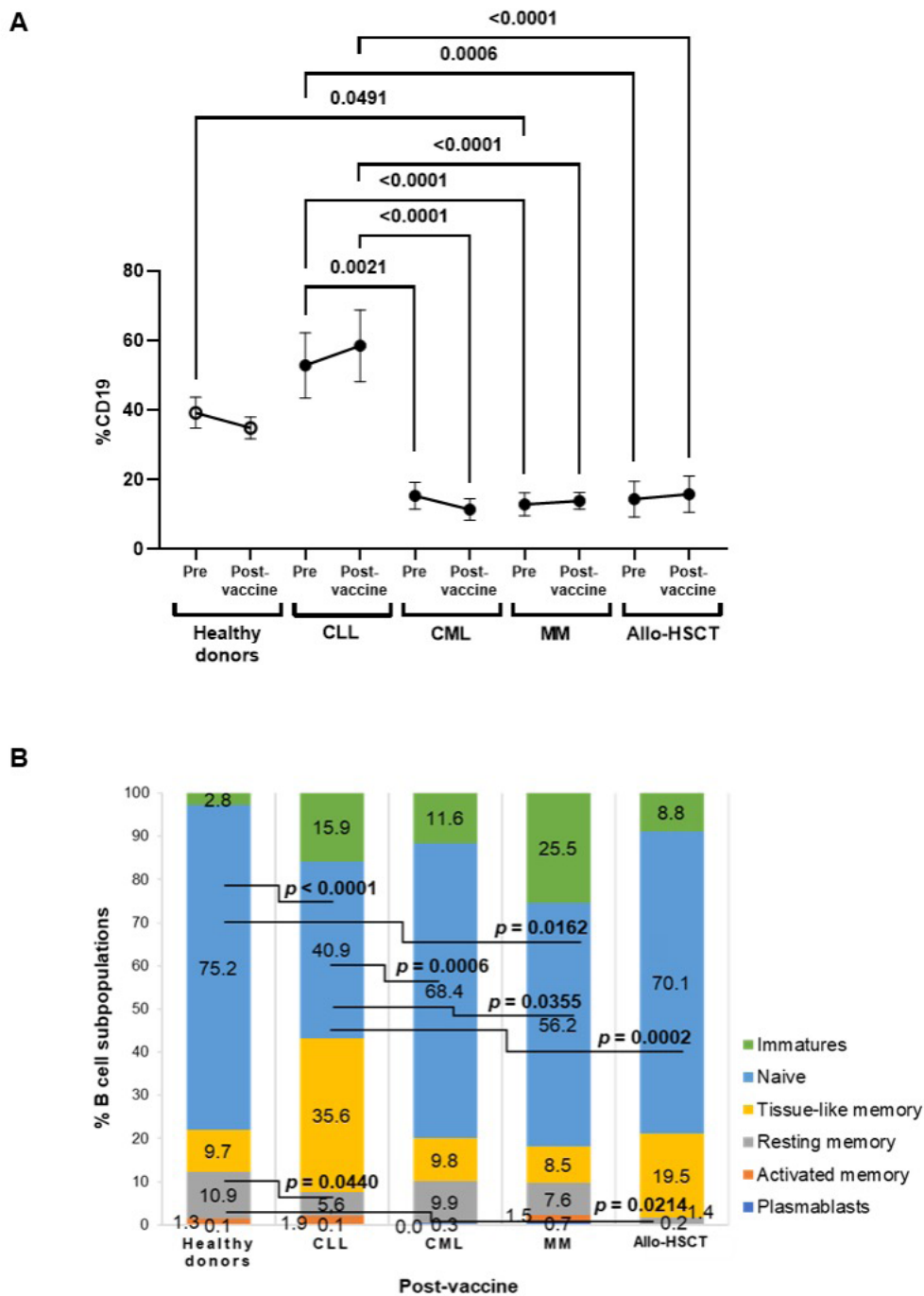


Figure 18. Total levels and subpopulations of B cells in PBMCs of individuals with OHD before and after receiving one-dose vaccine against SARS-CoV-2. (A) Total B cell levels in PBMCs of individuals with CLL, CML, MM, or Allo-HSCT before and after receiving the first dose of SARS-CoV-2 vaccine, in comparison with healthy donors. Each dot in the graphs corresponds to mean \pm SEM. (B) Analysis of B cells subpopulations after receiving one dose of SARS-CoV-2 vaccine in these cohorts. Mean data are represented in bar graphs. Statistical significance between groups was calculated using one-way ANOVA test.

5.2.1.4. Impaired Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in PBMCs from Individuals with OHD

ADCC increased in healthy donors after vaccination, but it overall decreased in patients with OHD, especially in those with Allo-HSCT, which was reduced 2.2-fold ($p = 0.0252$) in comparison with healthy donors (*Figure 19*).

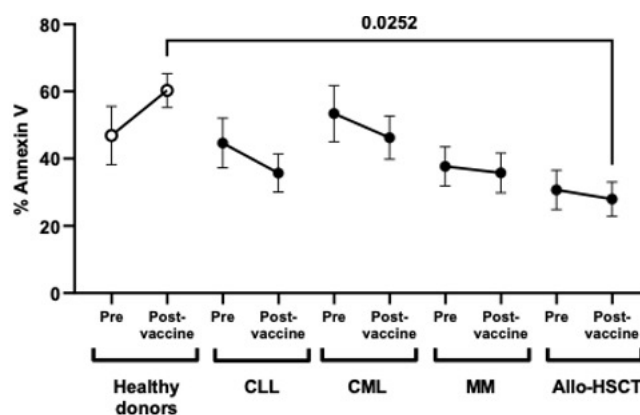


Figure 19. ADCC response against SARS-CoV-2 vaccine of PBMCs from individuals with OHD. Quantification by flow cytometry of the expression of phosphatidylserine by Annexin V in rituximab-coated Raji cells co-cultured with peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from individuals with chronic lymphocytic leukemia (CLL), chronic myeloid leukemia (CML), multiple myeloma (MM), or allogeneic stem cell transplant (Allo-HSCT), before and after receiving one dose of SARS-CoV-2 vaccine, in comparison with healthy donors. Each dot in the graphs corresponds to mean \pm SEM. Statistical significance between groups was calculated using one-way ANOVA test.

5.2.1.5. Viral Neutralization and Direct Cellular Cytotoxicity against Cells Infected with Pseudotyped SARS-CoV-2

The PBMCs of individuals with CLL showed the highest DCC activity against SARS-CoV-2-infected cells, which was present even before vaccination (*Figure 20A*). This activity was significantly increased in comparison with PBMCs of individuals with Allo-HSCT before (2.3-fold; $p = 0.0166$) and after (2.6-fold; $p = 0.0020$) one-dose vaccination.

These results correlated with the measurement of caspase-3 activity in the monolayer of Vero E6 cells, although they did not achieve statistical significance in the comparison between groups (*Figure 20B*).

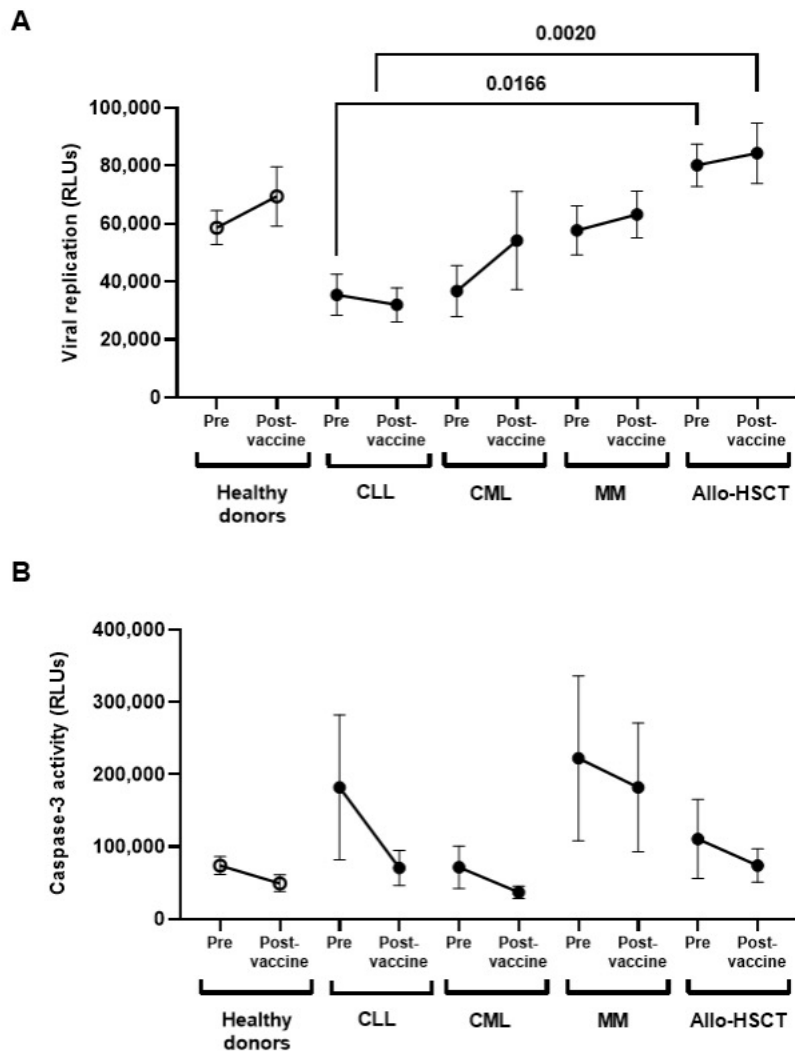


Figure 20. DCC and viral neutralization activity against SARS-CoV-2 infected cells of PBMCs of individuals with OHD before and after receiving one-dose vaccine. (A) The capacity of PBMCs from individuals with OHD to eliminate SARS-CoV-2-infected Vero E6 cells was determined by quantifying the production of Renilla (RLUs) after co-culture for 1 h. (B) DCC was assessed by measuring the activity of caspase-3 in SARS-CoV-2-infected Vero E6 cells co-cultured with PBMCs from individuals with OHD, in comparison with healthy donors. Each dot in the graphs corresponds to mean \pm SEM. Statistical significance between groups was calculated using one-way ANOVA test.

5.2.1.6. Characterization of Cellular Cytotoxic Populations

PBMCs populations that were responsible for DCC response were analyzed and we observed that individuals with CLL showed lymphopenia, with levels of CD3+ T cells reduced 3.4-fold ($p < 0.0001$) before vaccination, in comparison with healthy donors. This CD3+ lymphopenia was maintained after vaccination ($p < 0.0001$) (*Figure 21A*). Individuals with Allo-HSCT also showed levels of CD3+ that were reduced 1.7-fold ($p = 0.0251$), whereas individuals with CML and MM showed similar levels to healthy donors. Despite CD3+ lymphopenia, individuals with CLL and Allo-HSCT showed levels of CD8+ T cells that were increased about 2.0-fold in both cases, before ($p = 0.0038$ and $p = 0.0023$, respectively) and after ($p = 0.0018$ and $p = 0.0238$, respectively) vaccination (*Figure 21B, left graph*). Activation of CD8+ T lymphocytes was evaluated through the expression of the degranulation marker CD107a, which was significantly reduced 1.5- ($p = 0.0271$) and 1.8-fold ($p = 0.0014$) in individuals with CLL and MM, respectively, in comparison with healthy donors, and did not change after vaccination (*Figure 21B, right graph*).

There was a great variability between the levels of NK cells (CD3-CD56+) between the cohorts and pre- and post-vaccination samples, being the individuals with CLL those with more reduced levels before vaccination (*Figure 21C, left graph*). However, they showed similar levels of CD107a expression as healthy donors before vaccination, although they decreased after vaccination (*Figure 21C, right graph*). After vaccination, the expression of CD107a in NK cells in individuals with MM and Allo-HSCT was reduced 4.3- ($p = 0.0028$) and 3.6-fold (0.0137), in comparison with healthy donors. The levels of NKT cells did not significantly change between the cohorts of individuals with OHD and healthy donors (data not shown).

Individuals from all cohorts had similar levels of CD3+CD8+TCR $\gamma\delta$ + cells (*Figure 22A, left graph*), but the expression of CD107a was mostly reduced in these cells of individuals with MM (3.0-fold; $p = 0.0158$) before vaccination, in comparison with healthy donors (*Figure 22A, right graph*), although it was significantly increased after one-dose vaccination (2.1-fold; $p = 0.0374$). Moreover, individuals with MM showed significantly increased levels of CD3+CD8+TCR $\gamma\delta$ +cells before vaccination (4.4-fold; $p = 0.0196$) (*Figure 22B, left graph*), in comparison with healthy donors, and these cells also showed high expression of CD107a in some individuals (*Figure 22B, right graph*), although these levels returned to similar levels as healthy donors after vaccination. Individuals with CML showed a steep reduction in the expression of CD107a CD3+CD8+TCR $\gamma\delta$ + cells after vaccination (2.2-fold; $p = 0.0368$) (*Figure 22A, right graph*) and nearly undetectable levels in CD3+CD8+TCR $\gamma\delta$ + cells (*Figure 22B, right graph*).

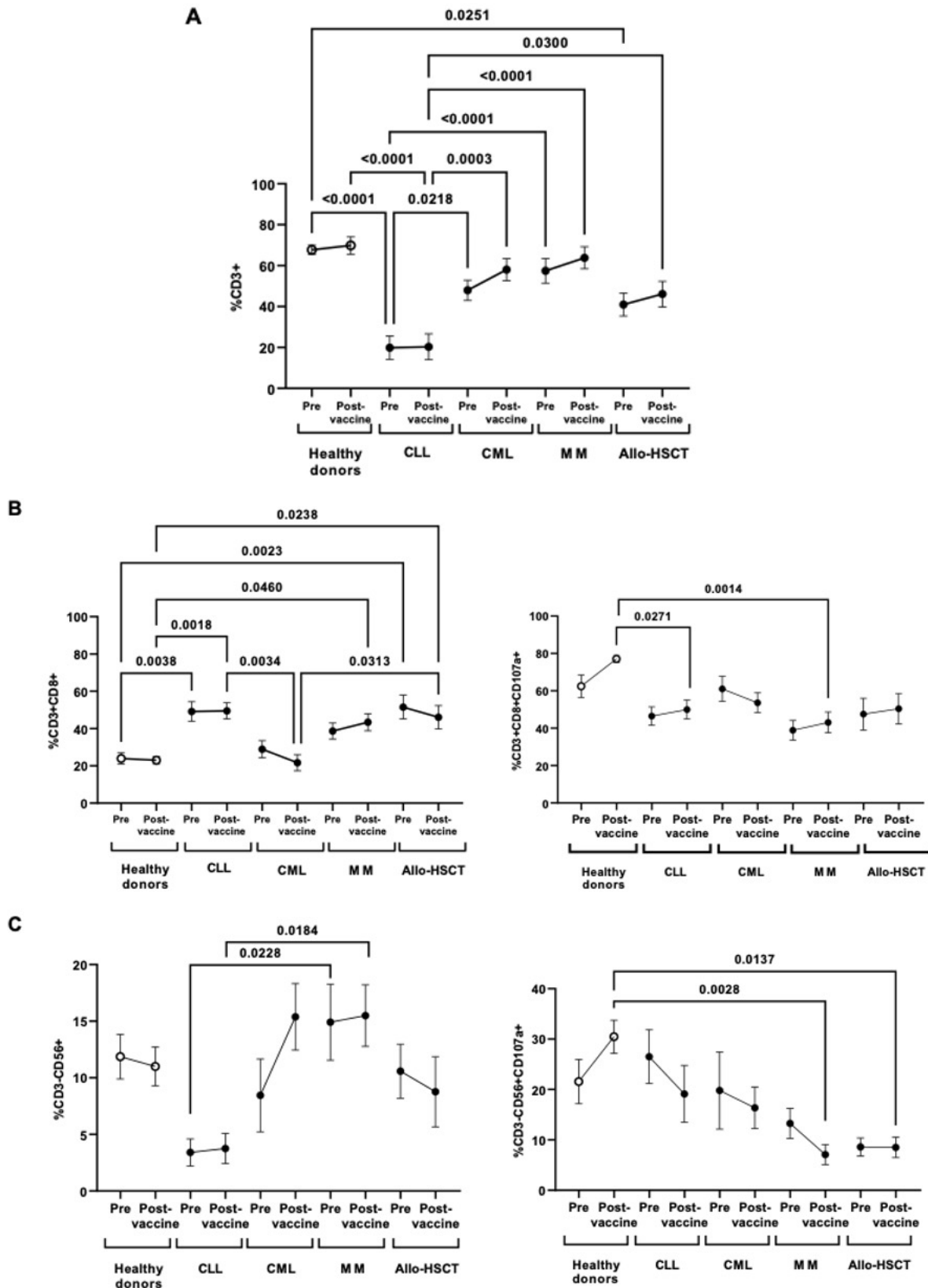


Figure 21. Characterization of the cellular cytotoxic populations in PBMCs from individuals with OHD before and after receiving one-dose vaccination. (A) Total CD3+ T cells in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from individuals with oncohematological diseases (OHD) was evaluated by flow cytometry, in comparison with healthy donors. (B) CD8+ cell count (left graph) and expression of CD107a in these cells (right graph) was determined in PBMCs from individuals with OHD, in comparison with healthy donors. (C) NK cell count (left graph) and expression of CD107a in these cells (right graph) was determined in PBMCs from individuals with OHD, in comparison with healthy donors. Each dot in the graphs corresponds to mean \pm SEM. Statistical significance between groups was calculated using one-way ANOVA test.

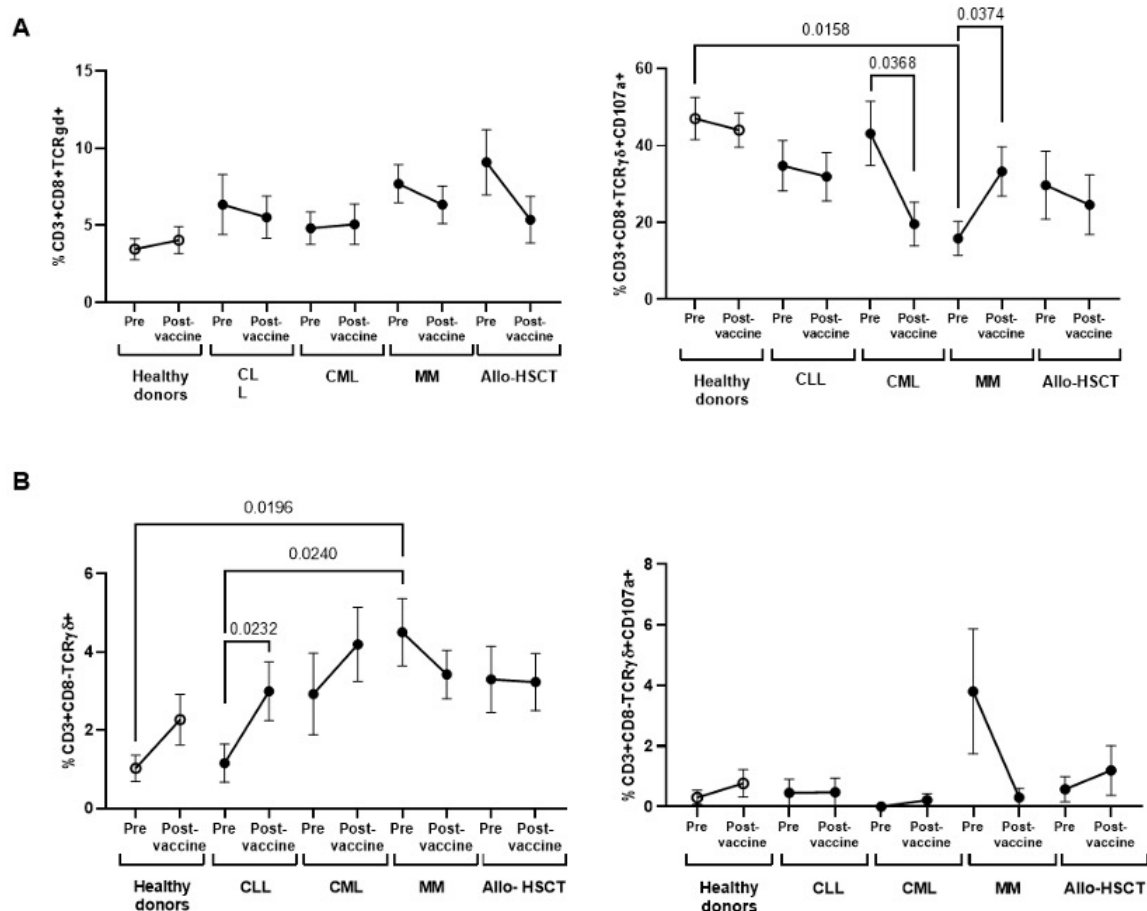


Figure 22. Characterization of CD3+CD8+ TCRγδ+ cells in PBMCs from individuals with OHD before and after receiving one-dose vaccination. (A) CD3+CD8+TCRγδ+ cell count (left graph) and expression of CD107a in these cells (right graph) was determined in PBMCs from individuals with OHD, in comparison with healthy donors. (B) CD3+CD8+TCRγδ+ cell count (left graph) and expression of CD107a in these cells (right graph) was determined in PBMCs from individuals with OHD, in comparison with healthy donors. Each dot in the graphs corresponds to mean ± SEM. Statistical significance between groups was calculated using one-way ANOVA test and statistical significance within groups was calculated using Mann–Whitney test.

5.2.2. DISCUSSION

Individuals with OHD are known to present impaired immune responses to several infectious agents and their vaccines, such as influenza, varicella Zoster and hepatitis B [104-108,110,112,113,119,160]. Accordingly, diverse types of OHD, as well as the type of treatment that these patients receive, may influence the immune response against these vaccines, including SARS-CoV-2 vaccines. Therefore, the efficacy of SARS-CoV-2 vaccines in these individuals has been a major concern since the beginning of the massive vaccination. Many studies that evaluate the quality of the immune response against COVID-19 vaccines in individuals with OHD have been published lately. However, these studies mostly describe the humoral response, with low characterization of the cellular immune responses, which are usually limited to the evaluation of T-cell reactivity through cytokines quantification after antigen stimulation [161-163], whereas the information regarding functional cellular cytotoxicity is limited to small series of patients for a single disease [164]. This T-cell reactivity achieved 86% rate in individuals with myeloproliferative neoplasms (MPN) after a single dose [163] and 87.3% and 83% in MM and CLL, respectively [162] after two doses, whereas the response was widely estimated to be 19–73% in patients with Allo-HSCT [162,165]. These results indicate that the cellular immune response in individuals with OHD might be underestimated due to the poor seroconversion obtained after vaccination. Therefore, in this study, we analyzed not only the early humoral response developed by four groups of individuals

with OHD after receiving one dose of an authorized COVID-19 vaccine, but also the potency and quality of the cellular cytotoxic immune response in comparison with healthy donors.

Seroconversion rates in our cohorts were variable depending on each OHD, being under the limit of detection in individuals with CLL but excellent in individuals with CML, who showed significantly higher IgG titers than healthy donors. Other studies corroborate this low seroconversion rates for CLL patients, estimated at 18% following a single dose [166] and that is most likely influenced by the severe B cell impairment in CLL patients treated with B cell depleting or targeted therapies such as anti-CD20 or BTK inhibitors [108,167]. Therefore, although individuals with CLL showed the highest levels of B cells due to the disease, significant alteration of B cell subpopulations was found, such as the reduction of naïve and resting memory B cells, which would entail an altered B cell activity and the reduced levels of seroconversion. Conversely, the excellent early humoral response (90% of seroconversion rate) developed by individuals with CML after one-dose vaccination against SARS-CoV-2, despite the B cell lymphopenia, was in accordance with previous studies that described good seroconversion rates among patients with chronic MPN and CML [168], being 54–71% after one single dose of vaccine [166]. This difference in the humoral responses between CLL and CML may also be related to the potent immunomodulatory effect induced in the latter during treatment with TKIs [113], which may be conserved even after several years of discontinuing treatment [169] and would explain the low hospitalization rate described for individuals with CML on TFR due to COVID-19 [66,67]. Moreover, IgGs from individuals with CML also showed overall high neutralization rate, whereas only one individual from our cohort of CLL who was on “watch and wait” developed IgGs against SARS-CoV-2 with a very high neutralizing capacity. In fact, the neutralizing capacity of IgGs is usually reduced in B-cell malignancies, such as MM or Waldstrom disease, where clinically relevant antibodies titers are achieved only in 2–8% of the patients after one single-dose vaccine against SARS-CoV-2 [137,170,171].

The role of IgGs to protect against SARS-CoV-2 infection does not rely only on their neutralizing capacity to protect cells from infection but also in their ability to activate the complement system and ADCC response exerted by NK and CD8+ T cells in order to eliminate the infected cells. In our cohorts, early ADCC activity elicited after a single dose of COVID-19 vaccine was generally decreased in PBMCs from all individuals with OHD, in correlation with the low seroconversion, except for the cohort of individuals with CML who showed similar ADCC response than healthy donors. We also evaluated the DCC activity against SARS-CoV-2 infected cells and observed that all individuals, except those with CML, showed higher DCC response than healthy donors, which effectively eliminated the infected cells. This DCC response was mostly efficient in individuals with CLL, which indicated that the impaired humoral response was counteracted by an effective cellular response in these patients, despite the reduced levels of overall CD3+ cells. We did not observe significant changes in the levels of CD8+ T cells before and after vaccination in any cohort, but total levels were significantly increased in all individuals in comparison with healthy donors, except for individuals with CML. However, CD8+ T cells showed lower expression of the degranulation marker CD107a in all cohorts, which may indicate that the high number of cells could compensate the reduced cytotoxic activity, thereby explaining the higher DCC observed in the PBMCs from individuals with CLL. The low levels of CD8+107a+ T cells may imply a reduced memory response that would need subsequent boosters of COVID-19 vaccine in order to generate a sustained protective immune response. On the other hand, the levels of highly cytotoxic CD3+CD8±TCRγδ+ cells were also increased in all cohorts, in comparison with healthy donors. In fact, this subpopulation is known to be increased in oncohematological patients [172-174]. The level of more immature CD3+CD8-TCRγδ+ cells was increased after vaccination in individuals from CLL and CML cohorts, whereas in individuals with MM the subpopulation of CD3+CD8+TCRγδ+ cells was not only increased in comparison with healthy donors, but it also

showed a significant enhancement in the expression of degranulation markers after one dose of vaccine. On the other hand, NK cells were greatly reduced in individuals with CLL and showed a general decrease in the degranulation capacity, mostly in the cohort of individuals with Allo-HSCT, whereas no changes were observed in NKT cells, in comparison with healthy donors. Consequently, the early cellular immune response developed by individuals with OHD after one dose of vaccine seemed to rely mostly on CD8+ T cells. Although these CD3+ cells showed overall reduced count, their antiviral activity was reinforced by increased levels of functional TCR $\gamma\delta$ + cells.

Therefore, as described in other studies [161,162,168], we demonstrated that seroconversion does not always correlate with cellular immune response after vaccination. Individuals with different OHD showed variable early immune responses after receiving one dose of vaccine against SARS-CoV-2. Unlike healthy donors, who showed an efficient early humoral response but more retarded cellular response, the humoral response was overall impaired in all OHD, except for CML, although it was counteracted by a potent early cellular response, especially in individuals with CLL. This enhanced cellular immune response relied mostly on reduced levels of functional CD8+ T cells but also in unconventional CD8 \pm TCR $\gamma\delta$ + T cells with quite modest cytotoxic activity that may be nonetheless compensated by significantly increased numbers in comparison with healthy donors, most likely as a consequence of the disease. Moreover, an increased DCC antiviral activity was detected before vaccination that was surely contributing to the efficient early cellular response after one-dose vaccination and that may be a result of the high basal levels of cytotoxic populations, likely elicited by the presence of cancerous cells or by the anticancer treatment.

The clinical translation of these results in terms of breakthrough COVID-19 infections in patients with different OHD in response to vaccination remains to be described as these individuals were excluded from the clinical trials [78,81,175]. However, immunocompromised patients show higher risk to develop severe COVID-19 than healthy donors and some therapies, such as anti-CD20 antibodies, could be related to worse outcomes [176]. However, the efficacy of the immune response may also be achieved through the development of cellular immune responses that need to be characterized to fully evaluate the efficiency of COVID-19 vaccination. Accordingly, although vaccine efficacy is very variable and dependent on the OHD, vaccination seems to be useful also in these patients to prevent severe infection, at least partially [177]. It also has been shown that vaccines protection may be decreased by different lineages of the virus. Neutralizing antibody responses are negatively impacted by emerging variants as is the case for the Omnicron or Delta variants [178]. However, booster doses with mRNA vaccines have shown to be effective at inducing high neutralizing titers in immunocompetent patients [179] and seem to be able to avoid severe illness even though breakthrough infections may be common. Moreover, mortality in OHD individuals appears to be decreasing through the consecutive waves [180], which may be related to increasing numbers of patients with partial or complete vaccination schedules.

5.2.3. CONCLUSIONS

Early immune responses after one dose of COVID-19 vaccine may have clinical relevance and confer at least partial protection against SARS-CoV-2 infection or severe COVID-19 in individuals with OHD, likely based on a cellular immunity developed in response to the presence of cancerous cells or to the treatment for the disease in the case of individuals with CLL, MM, or Allo-HSCT, but also based on a potent humoral response in the case of patients with CML. The analysis of the immune responses elicited after subsequent vaccine boosters will help establish the real efficacy of COVID-19 vaccines in individuals with OHD, especially concerning the cellular cytotoxic response.

5.3. “PERSISTENT IMMUNITY AGAINST SARS-COV-2 IN INDIVIDUALS WITH ONCOHEMATOLOGICAL DISEASES WHO UNDERWENT AUTOLOGOUS OR ALLOGENEIC STEM CELL TRANSPLANTATION AFTER VACCINATION”

Este capítulo se corresponde con los resultados, discusión y conclusión del artículo:

Rodríguez-Mora, S. & Pérez-Lamas, L.; Sainero, M.S.; Torres, M.; Sánchez-Menéndez, C.; **Corona, M.**; Mateos, E.; Casado-Fernández, G.; Alcamí, J.; et al. *Persistent Immunity against SARS-CoV-2 in Individuals with Oncohematological Diseases Who Underwent Autologous or Allogeneic Stem Cell Transplantation after Vaccination*. *Cancers* **2023**, *15*, 2344, doi:10.3390/cancers15082344

5.3.0. PRESENTACIÓN

En este artículo presentamos a 29 pacientes que habían recibido alguna dosis de la vacuna frente a la COVID-19 y que, posteriormente, se someten 11 de ellos a un Alo-TPH y 18 a un TASPE. Los pacientes son evaluados antes de iniciar el acondicionamiento para el trasplante y 2.5 meses después de la infusión, antes de reiniciar la pauta de re-vacunación, que está recomendada entre los 3-6 meses después del trasplante (*Figura 23*). Se analiza la respuesta humoral y celular comparándolos con un grupo de 18 donantes sanos que habían sido vacunados con 2 dosis una vacuna mRNA.

La relevancia de este estudio radica en que la recomendación de revacunación en pacientes ya vacunados que se someten a trasplante se ha establecido siguiendo las recomendaciones dirigidas a otras vacunas, pero sin evidencia en concreto para el SARS-CoV-2. Además, dado que hay que esperar entre 3-6 meses antes de reiniciar la vacunación, es importante, especialmente en períodos de alta incidencia, conocer si se mantiene cierta protección en los pacientes hasta que sea posible volver a vacunar.

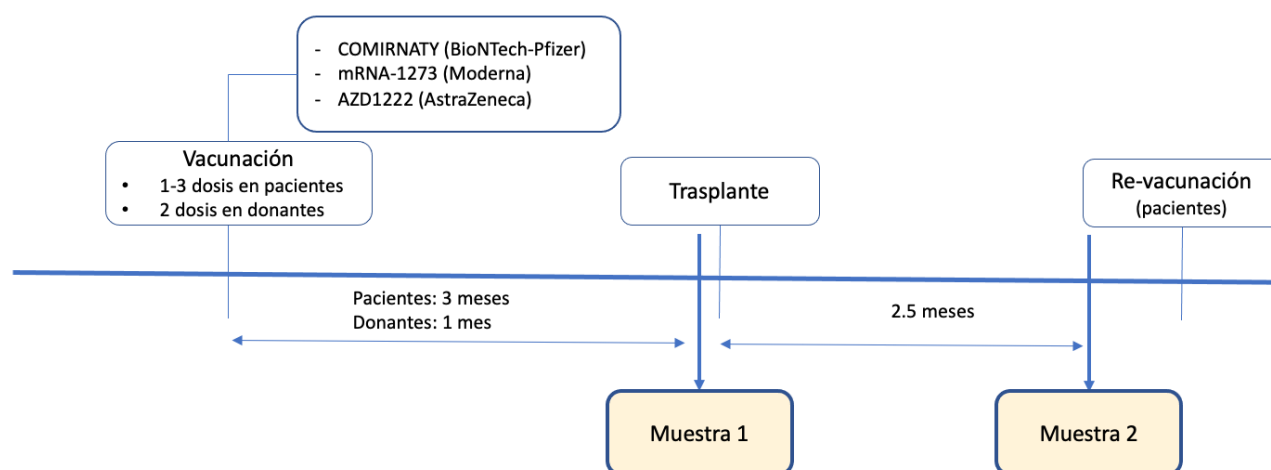


Figura 23. Diseño del estudio del capítulo 5.3.

5.3.1. RESULTS

5.3.1.1. Patients' Cohorts

The main sociodemographic and clinical data of the participants are summarized in *Table 5* and detailed in Table S1. Most of these individuals (69%) were male, and the median age was 59 years old (IQR 50-64). Most participants (93%) received a complete two-dose vaccination schedule with one authorized vaccine against COVID-19, while two participants received a booster dose (7%). Most participants (65%) received Spikevax, 17% received Comirnaty, and 17% received Vaxzevria. The mean time from vaccination to transplantation was 119 days (IQR 80-152). Six participants (21%) had SARS-CoV-2 infection confirmed by RT-qPCR prior to vaccination. The first blood sample was collected 6 days (IQR 1-7) before transplantation (pre-transplant sample), which was 106 days (IQR 69-147) after receiving the full vaccination schedule. A second blood sample was collected 76 days (IQR 66-83) after transplantation (post-transplant sample), when a median of 192 days (IQR 153-238) had passed since the complete vaccination schedule. All participants were followed closely

during and after transplantation, and clinical information was collected regarding the development of Graft-versus-host disease (GvHD), the need for additional immunosuppressive treatment, the development of SARS-CoV-2 breakthrough infections after transplantation and their severity, and vaccination against COVID-19 after HSCT.

Eighteen participants were subjected to Auto-HSCT, and 11 participants were subjected to Allo-HSCT. The median age of individuals with Auto- and Allo-HSCT was 57 years old (IQR 46-65) and 60 years old (IQR 52-63), respectively. Acute lymphocytic leukemia (ALL) (54%) and myelodysplastic syndromes (MDS) (27%) were the most common indications for Allo-HSCT, while the most frequent pathologies for Auto-HSCT were multiple myeloma (MM) (55%), Non-Hodgkin lymphoma (NHL) (39%), and Hodgkin lymphoma (HL) (6%). All donors for Allo-HSCT had previously received a complete vaccination schedule against COVID-19, mostly with Comirnaty (64%). Vaccination of donors occurred within a median of 46 days (IQR 10-216) before transplantation.

Eighteen participants (62%) received chemotherapy prior to transplantation, and 13 (45%) received other therapies such as immunotherapy, targeted therapies, or proteasome inhibitors. Seven individuals (24%) received rituximab within 6 months prior to transplantation, while nine individuals (31%) received a reduced-intensity regimen. Among the participants with Allo-HSCT, 27% were HLA-identical transplants, while the rest were from alternative donors (64% haploidentical, 9% non-related donor). At the time of post-transplant sample collection, all individuals with Allo-HSCT were on systemic immunosuppressive therapy (100% cyclosporine/tacrolimus, 36% mycophenolate, and 27% corticosteroids). Two individuals (18%) developed active GvHD, and CMV was reactivated in 54% of individuals.

	Allo-HSCT (n=11)	Auto-HSCT (n=18)
Vaccine type, n (%)		
Vaxzevria (AstraZeneca)	1 (9)	4 (22)
Comirnaty (Pfizer)	2 (18)	3 (17)
Spikevax (Moderna)	8 (73)	11 (61)
SARS-CoV-2 infection prior to transplant, n (%)	4 (36)	2 (11)
Mean time from vaccination of recipient to transplantation, median days (IQR)	95 (21-298)	105 (38-205)
Vaccinated donor, n (%)	11 (100)	NA
Vaccine type of donors, n (%)		
Comirnaty (Pfizer)	7 (64)	-
Spikevax (Moderna)	1 (9)	-
Vaxzevria (AstraZeneca)	1 (9)	-
Jcovden (Janssen)	1 (9)	-
Unknown	1 (9)	-
Mean time from vaccination of the donor to transplantation, median days (IQR)	46 (10-216)	NA
Immunoglobulin deficiency, n (%)		
IgG	2 (18)	7 (39)
IgM	2 (18)	13 (72)
IgA	2 (18)	9 (50)
Post-transplant parameters at the time of second sample collection		
Immunosuppressive medications after HSCT, n (%)		NA
CsA / Tacrolimus	11 (100)	
MMF	4 (36)	
Corticoesteroids	3 (27)	
GvHD, n (%)	2 (18)	NA
CMV replication, n (%)	6 (54)	0
Disease relapse, n (%)	1 (9)	0
Admitted to ICU, n (%)	1 (9)	0
SARS-CoV-2 breakthrough infection after HSCT confirmed by PCR, n (%)	4 (36)	7 (39)
Severity of COVID-19, n (%)		
Mild	3 (75)	7 (100)
Hospitalized	1 (25)	0

ALL, Acute lymphocytic leukemia; Allo-HSCT, Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; Auto-HSCT, Autologous hematopoietic stem cell transplantation; CMV, Cytomegalovirus; CsA, Cyclosporine; GvHD, Graft-versus-host-disease; Cy, cyclophosphamide; HL, Hodgkin lymphoma; ICU, Intensive care unit; MDS, Myelodysplastic syndrome; MM, Multiple myeloma; MMF, Mycophenolate mofetil; Mtx, Methotrexate; NA, Not applicable; NHL, Non-Hodgkin lymphoma.

Table 5. Sociodemographic and clinical data of the individuals with allogeneic or autologous transplantation who participated in this study.

Eighteen healthy donors were recruited as the control population. Most of them (72%) were male, and the median age was 50 years old (IQR 42-62). The main sociodemographic and clinical data of healthy donors are summarized in [Table 6](#) and detailed in Table S2. The most common comorbidities were dyslipidemia, obesity, diabetes, asthma, and high blood pressure, but none were receiving immunosuppressive treatment at the time of sampling. In terms of vaccination, they received a full vaccination schedule with Comirnaty (89%) and Spikevax (11%). The median time from the complete vaccination schedule to the first sample collection was 28 days (IQR 23-30); median time from the first to the second sample was 63 days (IQR 60-63) when a median of 91 days (IQR 86-93) had passed since complete vaccination schedule.

	Healthy Donors (n=18)
Median age at data collection, median years (IQR)	50 (42-62)
Gender, n (%)	
Male	13 (72)
Female	5 (28)
Underlying oncohematological disease, n (%)	0
Vaccine type, n (%)	
Comirnaty (Pfizer)	16 (89)
Spikevax (Moderna)	2 (11)
SARS-CoV-2 infection prior to vaccination, n (%)	0
Time from complete vaccination schedule to 1st sample, median days (IQR)	28 (23-30)
Time from complete vaccination schedule to 2nd sample, median days (IQR)	91 (86-93)
SARS-CoV-2 breakthrough infection after HSCT confirmed by PCR, n (%)	8 (44)
Severity of COVID-19, n (%)	
Mild	8 (100)
Hospitalized	0

Table 6. Sociodemographic and clinical data of the healthy donors who participated in this study as controls.

5.3.1.2. SARS-CoV-2 Breakthrough Infection

All participants followed an average of 8 months after HSCT to evaluate the development of SARS-CoV-2 breakthrough infections. They started revaccination against SARS-CoV-2 three months after HSCT, according to current recommendations, without relevant complications related to the vaccine. Revaccination occurred after the second sample was taken for this study. Eleven participants (11/29; 38%) had a COVID-19 infection, confirmed by qPCR, during the follow-up period. 10/11 (91%) participants presented a mild form of COVID-19 without requiring hospitalization or oxygen therapy. One patient (1/11; 9%) required hospitalization due to the development of immune neutropenia related to the infection, and low-dose oxygen therapy was eventually required. Of these participants who were infected after transplant, 5/11 (45%) had already received two doses of vaccine against COVID-19 post-HSCT, 4/11 (36%) had received one dose, and 1/11 (9%) had not yet been revaccinated. The participant (1/11) who had not been vaccinated after HSCT did not develop a severe form of the infection nor require hospitalization.

Eight healthy donors (8/18; 44%) had SARS-CoV-2 breakthrough infection confirmed by qPCR 12 months (IQR 8-13) after the second vaccine dose. All of them had mild COVID-19, received symptomatic treatment, and did not require hospitalization.

5.3.1.3. Levels of IgGs against SARS-CoV-2 before and after HSCT

All individuals subjected to HSCT showed levels of IgGs against SARS-CoV-2 above the threshold of detection before transplant (*Figure 24A*). These levels were significantly reduced in comparison with healthy donors (-3.7-fold, $p < 0.0001$ in Allo-HSCT; -2.5-fold; $p = 0.0001$ in Auto-HSCT). After transplantation, both groups showed similar levels of IgGs to prior transplantation, 2.5 months before, while these levels were reduced 1.2-fold ($p < 0.0001$) in the plasma of healthy donors after 3 months. In comparison with healthy donors, the levels of IgGs were reduced 2.0- ($p = 0.0121$) and 2.1-fold ($p = 0.0077$) in the plasma of participants with Allo- and Auto-HSCT, respectively.

No significant differences were observed between groups in the neutralizing capacity of IgGs against SARS-CoV-2 (*Figure 24B*).

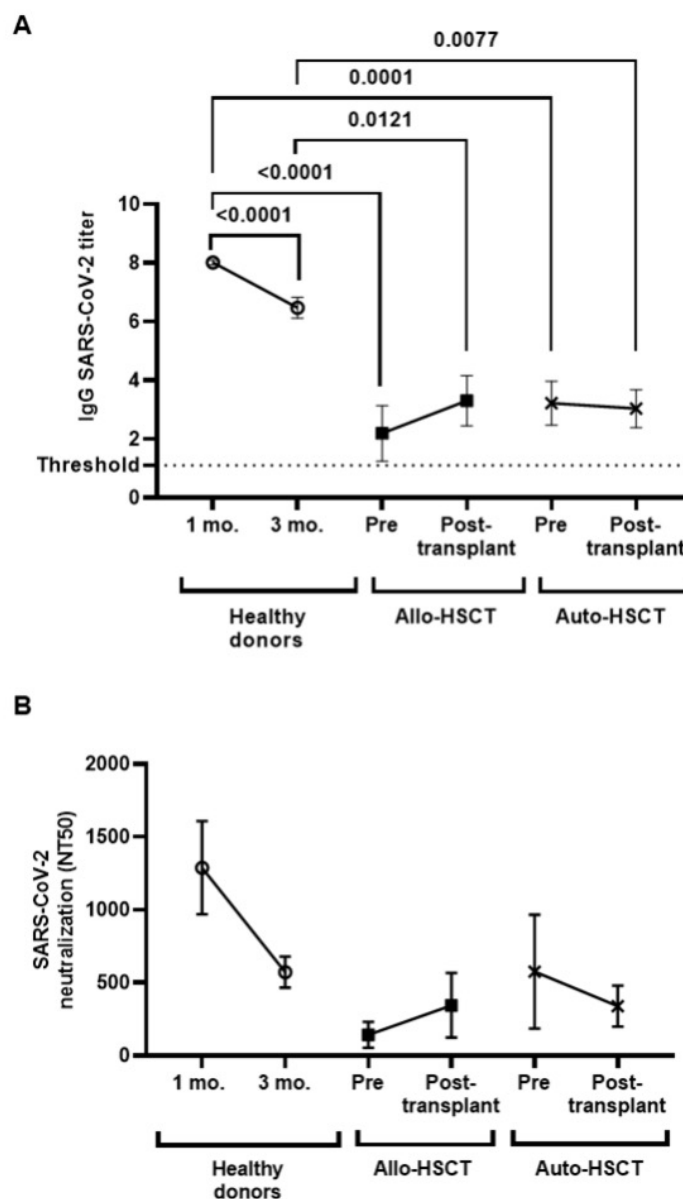


Figure 24. Serological response against SARS-CoV-2 in plasma from individuals with OHD subjected to Allo- and Auto-HSCT. (A) Plasma IgGs titers in individuals with Allo- or Auto-HSCT were compared between them and with healthy donors. (B) IgG neutralizing activity against SARS-CoV-2. Each dot corresponds to the mean \pm standard error of the mean (SEM). A one-way ANOVA test was applied to calculate the statistical significance between groups, and test-test was applied to calculate the statistical significance within groups.

5.3.1.4. Changes in B Cell Subpopulations after HSCT

Before HSCT, total B cell count (CD19+) was reduced 4.6- ($p = 0.0009$) and 3.0-fold ($p = 0.0015$) in PBMCs from individuals who underwent Allo- and Auto-HSCT, respectively, in comparison with healthy donors (Figure 25A). After HSCT, individuals with Allo- and Auto-HSCT showed similar levels of total B cells that were still significantly reduced in comparison with healthy donors ($p < 0.0001$ and $p = 0.0008$, respectively).

The levels of immature B cells after HSCT were significantly increased in comparison with healthy donors in both Allo- and Auto-HSCT (3.4-fold, $p = 0.011$; 3.5-fold, $p = 0.002$, respectively) (Figure 25B). Conversely, the levels of naïve B cells were reduced in both groups, in comparison with healthy donors (-5.1-fold; $p < 0.0001$ and -4.1-fold; $p < 0.0001$, respectively). Reduced levels of tissue-like memory (-3.0-fold; $p = 0.037$ for Allo-HSCT and -2.5-fold; $p = 0.034$ for Auto-HSCT), resting memory B cells ($p = 0.002$ for Allo-HSCT and $p = 0.003$ for Auto-HSCT) and activated memory ($p = 0.019$ for Allo-HSCT and $p = 0.035$ for Auto-HSCT) also showed statistical significance in comparison with healthy donors.

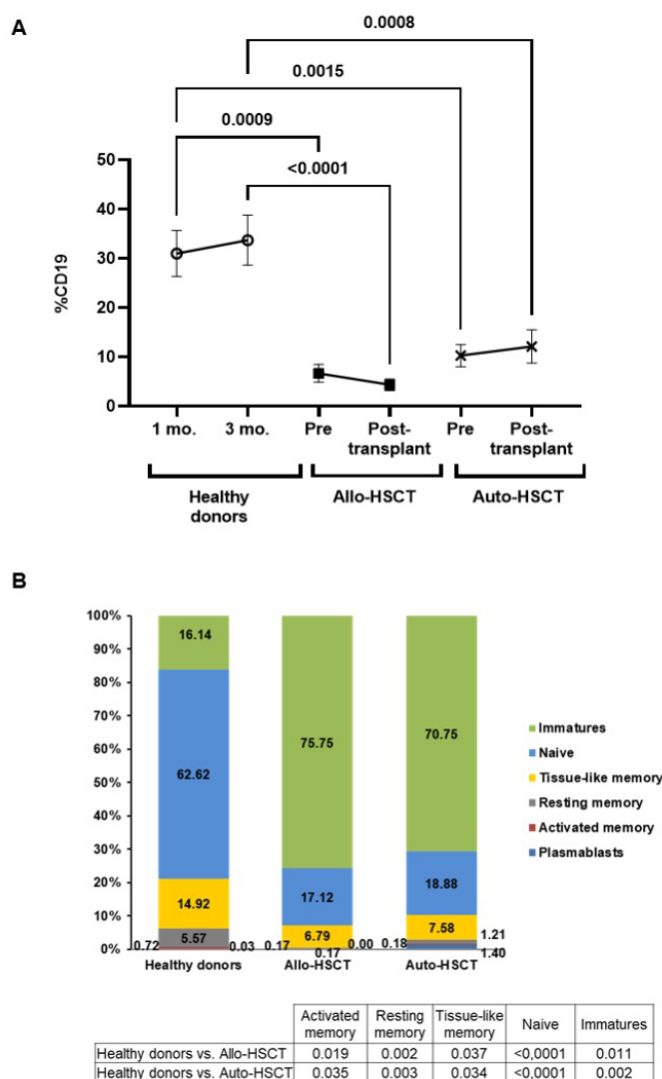


Figure 25. Total levels and subpopulations of B cells in PBMCs of individuals with OHD before and after receiving HSCT. (A) Total B cell levels were determined in PBMCs isolated from individuals with OHD with Allo- or Auto-HSCT before and after receiving transplantation and compared with healthy donors. Each dot in the graphs corresponds to mean \pm SEM. **(B)** Analysis of B cells subpopulations after HSCT in both cohorts and controls. Mean data are represented in bar graphs. A one-way ANOVA test was applied to calculate the statistical significance between groups, and test-test was applied to calculate the statistical significance within groups.

5.3.1.5. Cytotoxic Cellular Immune Responses against SARS-CoV-2 before and after HSCT

The antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) was reduced in both groups of participants before Allo- and Auto-HSCT, in comparison with healthy donors (-1.8-fold; $p = 0.0014$ and -1.7-fold; $p = 0.0003$, respectively) (*Figure 26A*). These differences were maintained after HSCT in both groups (-1.5-fold; $p = 0.0126$ and -1.6-fold; $p = 0.0022$, respectively). There were no differences between ADCC response before and after HSCT in either group.

Direct cytotoxic activity (DCC) was increased in PBMCs of individuals with Auto-HSCT, before and after transplant, in comparison with healthy donors and individuals with Allo-HSCT, who showed the lowest DCC (*Figure 26B*). Although these results did not achieve statistical significance, likely due to high data dispersion, decreased DCC in PBMCs from individuals with Allo-HSCT correlated with reduced capacity to eliminate SARS-CoV-2-infected cells before and after transplant, in comparison with healthy donors (-3.6-fold; $p = 0.0170$) (*Figure 26C*). PBMCs from individuals with Auto-HSCT showed similar efficiency in eliminating SARS-CoV-2-infected cells than PBMCs from healthy donors before and after transplant. As occurred with ADCC, there were no differences between DCC response before and after HSCT in either group of participants.

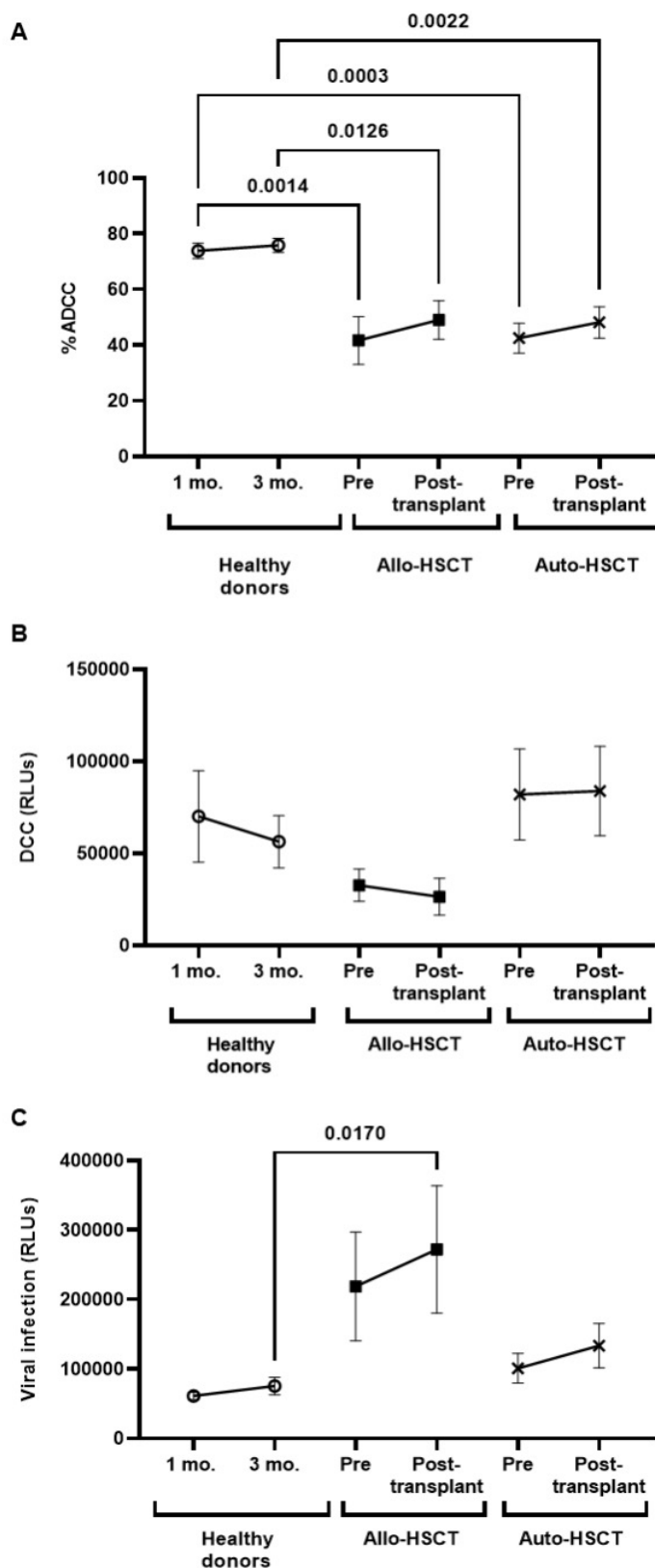


Figure 26. ADCC and DCC responses against SARS-CoV-2 of PBMCs from individuals with OHD subjected to HSCT. (A) The expression of phosphatidylserine was determined on the surface of rituximab-coated Raji cells by previous staining with Annexin V-PE of PBMCs from individuals with Allo- or Auto-HSCT before and after receiving transplantation and also compared with healthy donors. (B) DCC was determined in SARS-CoV-2-infected Vero E6 cells after co-culture with PBMCs isolated from the participants by determining caspase-3 activity in the monolayer. (C) PBMCs' antiviral activity against SARS-CoV-2-infected Vero E6 cells was evaluated by determining the synthesis of Renilla (RLUs) after co-culture for 1 h. Each dot corresponds to the mean \pm standard error of the mean (SEM). A one-way ANOVA test was applied to calculate the statistical significance between groups, and test-test was applied to calculate the statistical significance within groups.

5.3.1.6. Characterization of Cytotoxic Cell Populations in PBMCs of Transplanted Individuals

Total levels of CD3+ T lymphocytes were similar to healthy donors in individuals previous to Auto-HSCT, but they were significantly reduced in individuals with Allo-HSCT (-1.6-fold; $p = 0.0219$) (*Figure 27A*). After the transplant, no significant differences were observed within groups.

Total levels of CD8+ T cells were only significantly increased in individuals with Auto-HSCT 2.5 months after transplant (1.3-fold; $p = 0.0042$) (*Figure 27B*). The expression of the degranulation marker CD107a decreased 1.4-fold ($p = 0.0247$) in CD8+ T cells isolated from healthy donors three months after the first sample (*Figure 27C*). The expression of this marker was also reduced 1.7-fold ($p = 0.0038$) in CD8+ T cells from individuals with Auto-HSCT before transplant, in comparison with healthy donors, but no significant changes were observed after transplantation in either group.

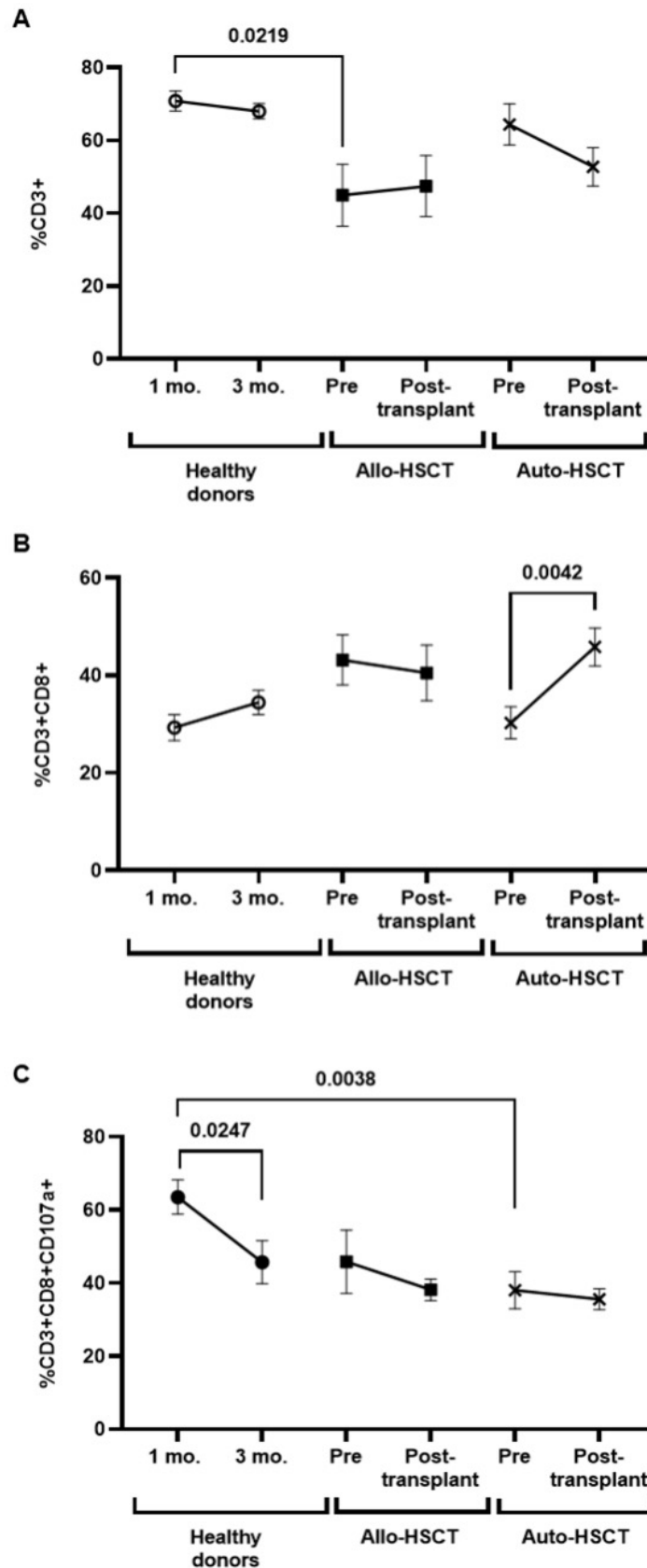


Figure 27. Characterization of total lymphocytes and CD8+ T cells in PBMCs from individuals with OHD before and after receiving Allo- or Auto-HSCT. (A) Total CD3+ T cells in PBMCs from individuals with Allo- or Auto-HSCT were evaluated by flow cytometry before and after HSCT. CD8+ cell count (B) and expression of CD107a in these cells (C) were determined in PBMCs from individuals with OHD, before and after HSCT, in comparison with healthy donors. Each dot in the graphs corresponds to mean \pm SEM. Statistical significance between groups was calculated using a one-way ANOVA test, and statistical significance within groups was calculated using a test-test.

Individuals with Allo- and Auto-HSCT showed increased levels of CD8+ T cells with TCR $\gamma\delta$ + before and after transplant (3.2-fold; $p = 0.0106$ and 2.4-fold; $p = 0.0496$, respectively), in comparison with healthy donors (*Figure 28A*), while individuals with Auto-HSCT showed increased levels of CD3+CD8-TCR $\gamma\delta$ + cells before and after transplant (3.4-fold; $p = 0.0035$ and 5.9-fold; $p = 0.0014$, respectively), in comparison with healthy donors (*Figure 28B*).

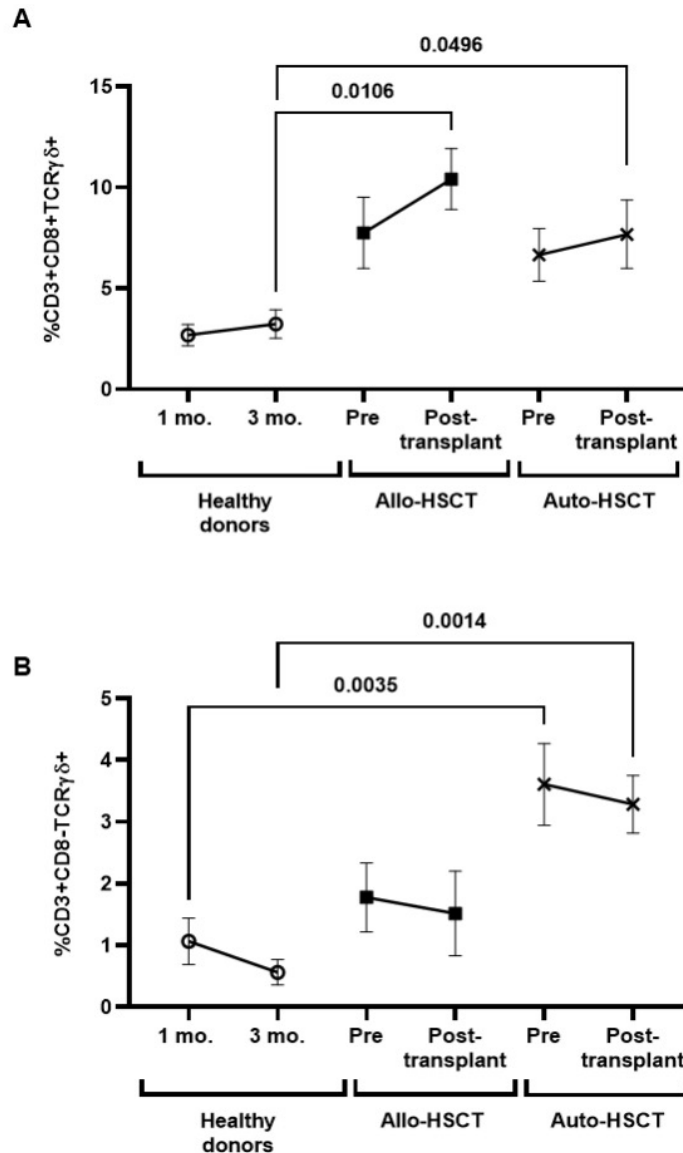


Figure 28. Characterization of TCR $\gamma\delta$ + cells in PBMCs from individuals with OHD before and after receiving Allo- or Auto-HSCT. Levels of CD3+CD8+TCR $\gamma\delta$ + (A) and CD3+CD8-TCR $\gamma\delta$ + (B) cells in PBMCs from individuals with Allo- or Auto-HSCT were evaluated by flow cytometry in comparison with healthy donors. Each dot in the graphs corresponds to mean \pm SEM. Statistical significance between groups was calculated using a one-way ANOVA test, and statistical significance within groups was calculated using a t-test.

Individuals with Auto-HSCT showed decreased levels of NK cells (CD3-CD56+) before transplant (-1.5-fold; $p = 0.0267$), in comparison with healthy donors (*Figure 29A*). The levels of NKT-like cells (CD3+CD56+) were significantly increased 1.3-fold ($p = 0.0460$) in individuals with Auto-HSCT after transplant (*Figure 29B*). No changes between groups were observed in the expression of CD107a in TCR $\gamma\delta$ +, NK, or NKT-like cells (*Figure S1*).

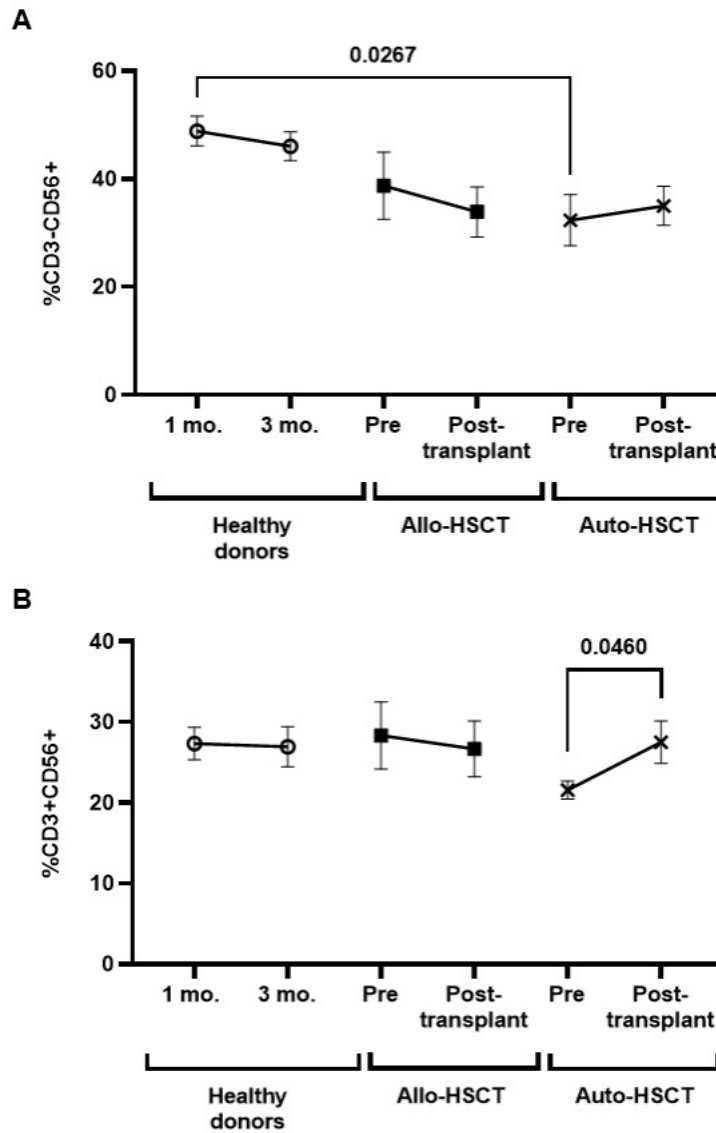


Figure 29. Characterization of NK and NKT-like cells in PBMCs from individuals with OHD before and after receiving Allo- or Auto-HSCT. Levels of NK (CD3-CD56+) (A) and NKT-like (CD3+CD56+) (B) cells in PBMCs from individuals with Allo- or Auto-HSCT were evaluated by flow cytometry in comparison with healthy donors. Each dot in the graphs corresponds to mean \pm SEM. Statistical significance between groups was calculated using a one-way ANOVA test, and statistical significance within groups was calculated using a test-test.

5.3.2. DISCUSSION

The fast development and implementation of COVID-19 vaccines are two of the most important achievements of the current medical research, and it will undoubtedly change the future of vaccine science [181]. Sixteen months after the authorization of the first vaccine against COVID-19 by the FDA, Comirnaty (Pfizer/BioNTech), and now that more than 13 billion vaccine doses have been administered globally, the cases of COVID-19 and SARS-CoV-2-related deaths have dramatically decreased [182]. However, the effectiveness of COVID-19 vaccination in individuals with OHD is still low due to the disease itself or the therapeutic procedures that are implemented, among them HSCT. Some studies show variable rates of immune responses in individuals with OHD who were vaccinated against COVID-19 after receiving HSCT [183,184]. Until now, only one study has evaluated the persistence of the immune response in individuals who were vaccinated before receiving HSCT, and it suggests that donor vaccination status may impact the post-HSCT humoral response to early vaccination against SARS-CoV-2 after Allo-HSCT [185].

In the present study, we analyzed the persistence of both humoral and cellular immune responses developed against SARS-CoV-2 in individuals with OHD who were subjected to Allo- or Auto-HSCT after receiving the complete vaccination schedule. Both groups of individuals showed detectable IgG titers against SARS-CoV-2 before HSCT that, although reduced in comparison with healthy donors, remained unchanged 2.5 months after transplantation. These reduced IgG levels are probably related to significant B-cell lymphopenia, with high levels of immature B cells observed in both groups of individuals, which may have contributed to low titers of neutralizing antibodies. Normal levels of total B cells are described as taking about 6–12 months to normalize after HSCT, and functional recovery of B lymphocytes takes several months to years [186]. However, these levels were also reduced in healthy donors within 6 months after receiving the last dose of the complete vaccination schedule, which is in accordance with previous reports [187,188], mostly in never infected, vaccinated individuals [189]. In addition, ADCC response was impaired in both groups of individuals in comparison with healthy donors before and after HSCT, which may also be related to low IgG titers. Therefore, humoral immunity in response to COVID-19 vaccination was impaired in individuals with OHD before HSCT, and transplantation did not significantly modify this reduced capacity, which was maintained at least 2.5 months after HSCT, independently of if it was allogeneic or autologous. Total IgG levels were slightly increased after transplantation in the Allo-HSCT group, which may be due to all donors had been previously vaccinated, but this difference did not achieve statistical significance, and no changes were observed in the neutralizing capacity or ADCC response in this group in comparison with individuals with Auto-HSCT.

On the other hand, we observed significant differences in the cellular immune response between groups. Individuals with Allo-HSCT showed significantly reduced antiviral activity against target cells infected with pseudotyped SARS-CoV-2, in comparison with individuals with Auto-HSCT who showed similar DCC activity than healthy donors, which was translated into an increased antiviral activity against the infected cells.

In the current guidelines, recommendations for Allo-HSCT and auto-HSCT recipients are uniform [115,190,191], while immune reconstitution and immunologic memory differ [190,192]. It is described as a faster increase of lymphocytes in the autologous group, with faster reconstitution in B-cells and higher CD3 and CD4+ cell counts in T lymphocytes [192], which may affect susceptibility to infections and response to vaccines. Despite this, due to the lack of data on post-Auto-HSCT patients, recommendations derived from studies in post-Allo-HSCT patients generally apply [190]. The diffe-

rences in the cellular immune response showed in our study, where the DCC activity was similar to healthy donors, contribute to thinking that a more tailored approach might be indicated depending on the type of transplantation. In line with previous observations, individuals with Allo-HSCT showed the lowest levels of total lymphocyte counts. And although the levels of CD8+ T cells were similar between groups, without changes in the expression of the degranulation marker CD107a, only individuals with Auto-HSCT showed a significant increase of these cells after HSCT. Moreover, highly cytotoxic CD3+CD8-TCR $\gamma\delta$ + [193] were also increased in individuals with Auto-HSCT, before and after transplantation, which may contribute to a higher antiviral activity of PBMCs from these individuals, even with similar levels of CD107a and significantly reduced NK cell levels. Other factors probably contribute to the observed differences, such as the presence of immunosuppressive treatment in post-Allo-HSCT patients, underlying disease, pre-transplant therapy, type of conditioning regimen, etc. All these elements differ between autologous and allogenic transplantation.

The efficacy of the different vaccines received by the participants in the study (Spikevax, Comirnaty, and Vaxzevria) has been described to be similar (approximately 90%) within the first 6 months after the full vaccination schedule of two doses [194]. Therefore, we do not expect a significant influence on the final results due to the type of vaccine. Due to age may be a factor that significantly affects the efficacy and quality of the immune response [195,196]; all individuals recruited for this study had a median age between 50 and 60 years old.

Despite the differences observed in the immune response against SARS-CoV-2 vaccines between individuals with HSCT and healthy donors, the rate of SARS-CoV-2 breakthrough infections was similar (38% versus 44%) and with low clinical relevance, supporting that both individuals with Allo- and Auto-HSCT maintained some degree of protection after HSCT. The strict protective measures that are applied during the clinical management of these individuals may also contribute to this protection due to their level of exposure to SARS-CoV-2 and other respiratory viruses being likely much lower than the control population.

5.3.3. CONCLUSIONS

In conclusion, this study demonstrated that individuals with OHD had low but probable protective levels of IgGs against SARS-CoV-2 after HSCT that showed some neutralizing effect. Although ADCC activity was impaired, the direct cellular immune response was similar to healthy donors in participants with Auto-HSCT, likely due to the different immune reconstitution and the absence of immunosuppressive therapy after transplantation in this group. No significant improvement in the immune response was observed in individuals who received Allo-HSCT from previously vaccinated donors. Interestingly, no significant changes were observed in ADCC or DCC before and after HSCT in any group, proving that the immune response may persist after HSCT. In accordance, although the rate of breakthrough infections recorded in our series was high, most individuals presented a mild course of infection with a very low rate of hospitalization, which supported the maintenance of some degree of immunity after HSCT, despite significant B-cell lymphopenia and immaturity. These results emphasize that COVID-19 vaccination is effective, necessary, and safe for individuals with OHD and also provides some reassurance of immune protection in the first three months post-transplantation when the patients cannot be vaccinated. Further studies on vaccine response are needed to establish if a booster dose may be sufficient or if these individuals would benefit more from repeating the full vaccination schedule.

5.4. “STRONG HUMORAL BUT NOT CELLULAR IMMUNE RESPONSES AGAINST SARS-COV-2 IN INDIVIDUALS WITH ONCOHEMATOLOGICAL DISEASE WHO WERE TREATED WITH RITUXIMAB BEFORE RECEIVING A VACCINE BOOSTER”

Este capítulo se corresponde los resultados, discusión y conclusión del artículo:

Torres, M. & **Corona, M.**; Rodriguez-Mora, S.; Casado-Fernandez, G.; Zurdo-Castronuno, A.; Mateos, E.; Ramos-Martin, F.; Sanchez-Menendez, C.; Murciano-Anton, M.A.; Garcia-Perez, J.; et al. ***Strong Humoral but Not Cellular Immune Responses against SARS-CoV-2 in Individuals with Oncohematological Disease Who Were Treated with rituximab before Receiving a Vaccine Booster.*** Cancers (Basel) 2022, 14, doi:10.3390/cancers14225537.

5.4.0. PRESENTACIÓN

En este artículo presentamos 18 pacientes de una cohorte que había sido tratada con al menos 4 dosis de rituximab, con un intervalo máximo desde la última dosis de 12 meses en el momento del reclutamiento. Estos pacientes fueron de los primeros en recibir la dosis booster de la vacuna frente a la COVID-19, por sus pobres resultados de seroconversión, fruto de la prolongada aplasia de células B que implica el tratamiento con rituximab.

En estos pacientes evaluamos la respuesta inmune humoral y celular tras la segunda dosis de la vacuna y 1 mes después del booster. La pauta de vacunación se hizo con Spikevax. Como grupo control se incluyen 15 individuos sanos vacunados con Comirnaty. Ni pacientes ni donantes habían padecido previamente la infección por SARS-CoV-2. El diseño del estudio se resume en la *Figura 30*.

Este estudio es esencial para conocer la respuesta inmune global de los pacientes tratados con terapias anti-CD20 frente a la vacuna de la COVID-19, no reduciendo únicamente los resultados a los datos de seroconversión, que probablemente sean bajos por la linfopenia B. Además, proporciona información importante sobre el beneficio de una dosis booster en estos pacientes, también a nivel humoral y celular, dado que la evidencia del beneficio del booster cuando este se indicó era bastante escasa.

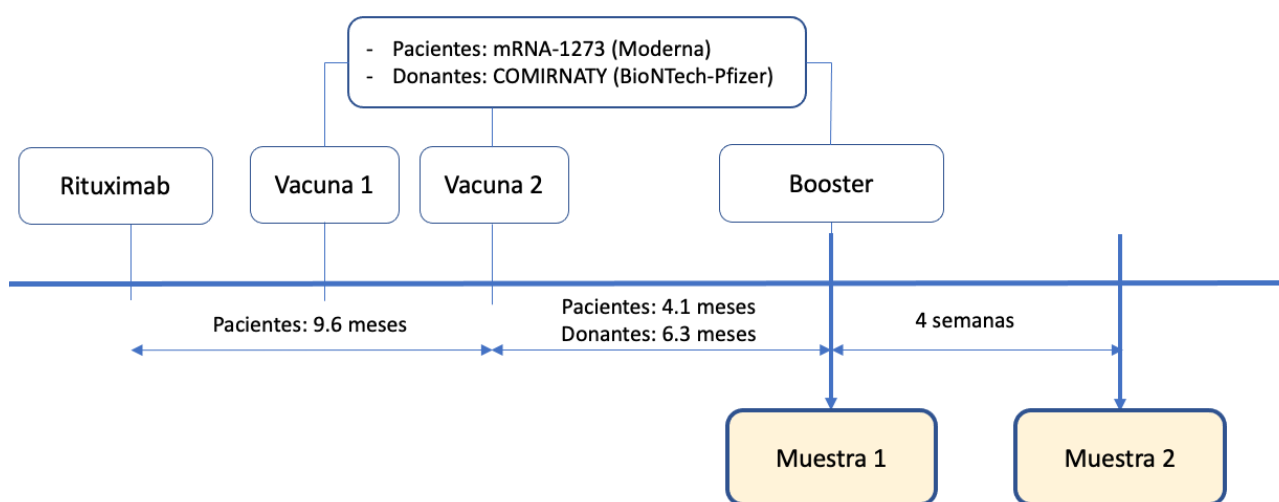


Figure 30. Diseño del estudio del capítulo 5.4.

5.4.1. RESULTS

5.4.1.1. Patients' Characteristics

This was an observational, longitudinal study that included 18 patients diagnosed with NHL (n = 16), ITP associated with SLE (n = 1), or AIHA associated with DMS (n = 1) who received two doses and a booster dose of the authorized mRNA-based COVID-19 vaccine Spikevax (mRNA-1273, Moderna). The main sociodemographic and clinical characteristics of all patients are summarized in *Table 7*. The median age of the individuals with hematological disease was 61 years (interquartile range (IQR) 53.2–72.8), and most of them (n = 12; 66.66%) were female. Individuals with ITP and AIHA received 4 weekly doses of rituximab. Thirteen patients with NHL were treated with four (n = 4; 22.22%) and six (n = 9; 50%) monthly doses associated with chemotherapy, whereas the remainder (n = 5; 27.78%) completed a

maintenance scheme with several more doses of rituximab (>8 doses). All individuals with NHL were in complete response at the time of the booster vaccine, and they had not received additional chemotherapy after the last dose of rituximab.

The last dose of rituximab was administered at a median of 9.6 months (IQR 6–15) before receiving the second dose of the vaccine Spikevax, and 13.8 months (IQR: 9.4–19) before receiving the booster dose. Patients received a third booster vaccine dose with Spikevax (mRNA-1273, Moderna) within a median of 124.5 days (IQR: 123–128) after the second dose against COVID-19. The first peripheral blood sample was collected the same day all individuals received the booster dose, whereas the second blood sample was collected a median of 28 days (IQR 28.0–33.5) after receiving the booster dose.

In addition, 15 healthy donors who had received two doses and a booster vaccine dose of the authorized mRNA-based COVID-19 vaccine COMIRNATY (BNT162b2, Pfizer-BioNTech) were also recruited. The median age of the healthy donors was 77 years (IQR, 72.0–79.0), and most of them (n = 12; 80%) were female. Healthy donors received a third booster vaccine dose within a median of 189.3 days (IQR: 184–189) after the second dose. Similarly to individuals with hematological disease, the first peripheral blood sample was collected the same day they received the booster dose, whereas the second blood sample was collected a median of 29 days (IQR 29.0–42.5) after the booster dose.

	Patients (n=18)	Healthy controls (n=15)
Age, median (IQR)	61 (53.2-72.8)	77 (72-79)
Sex: Female, n (%)	12 (66.66)	12 (80)
Diagnosis		
NHL, n (%)	16 (88.89)	-
AIHA, n (%)	1 (5.56)	-
IT/SLE, n (%)	1 (5.56)	-
Number of doses of rituximab		
4 doses	4 (22.22)	-
6 doses	9 (50)	-
>8 doses	5 (27.78)	-
Concomitant chemotherapy within 18 months prior to booster		
None	4 (22.22)	-
Prednisone	2 (11.11)	-
CHOP	10 (55.56)	-
Bendamustine	2 (11.11)	-
Loncastuximab	1 (5.56)	-
Radiotherapy	2 (11.11)	-
Methotrexate	1 (5.56)	-
Months from last treatment with rituximab to second vaccine dose, median (IQR)	9.6 (6-15)	-
Months from last treatment with rituximab to third vaccine dose, median (IQR)	13.8 (9.4-19)	-
Days from second dose to first sample, median (IQR)	124.5 (122.75-126)	189.3 (184-189)
Days from booster dose to second sample, median (IQR)	28 (28-33.5)	29 (29-42.5)

AIHA, Autoimmune hemolytic anemia; IQR, Interquartile Range; IT, Immune Thrombocytopenia; NHL, Non-Hodgkin Lymphoma; SLE, Systemic Lupus Erythematosus; CHOP, cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, prednisone.

Table 7. Baseline sociodemographic and clinical characteristics of the individuals with hematological disease who were recruited for this study.

5.4.1.2. Serological Response against COVID-19 Vaccination

After receiving two doses of mRNA-based COVID-19 vaccine and prior to receiving a booster dose, 13 of 18 (72.22%) individuals of the rituximab-treated cohort developed specific IgGs against SARS-CoV-2 in plasma, in comparison with 14 of 15 (93.33%) healthy donors (*Figure 31A*). After receiving the booster dose, all (100%) healthy donors and 16 of 18 (88.9%) rituximab-treated patients showed IgGs against SARS-CoV-2 in plasma. Three (16.7%) rituximab-treated patients and one (6.7%) healthy donor, who were seronegative prior the booster dose, seroconverted. One of the individuals that did not seroconvert had received the last dose of rituximab with a concomitant anti-CD19 conjugated antibody (loncastuximab) 40 days prior to the booster, while the other patient received the last treatment of R-CHOP 14 months before.

Titers of specific IgGs against SARS-CoV-2 were increased 2.47-fold ($p < 0.0001$) in healthy donors and 1.53-fold ($p = 0.0098$) in rituximab-treated patients, respectively, 1 month after receiving the booster dose. No significant differences were found between both cohorts before or after receiving the booster vaccine. Similarly, the levels of neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 improved after the booster dose in both groups, with a neutralizing capacity 3.78-fold ($p = 0.0200$) higher in healthy donors and 3.03-fold ($p = 0.0381$) in rituximab-treated patients (*Figure 31B*).

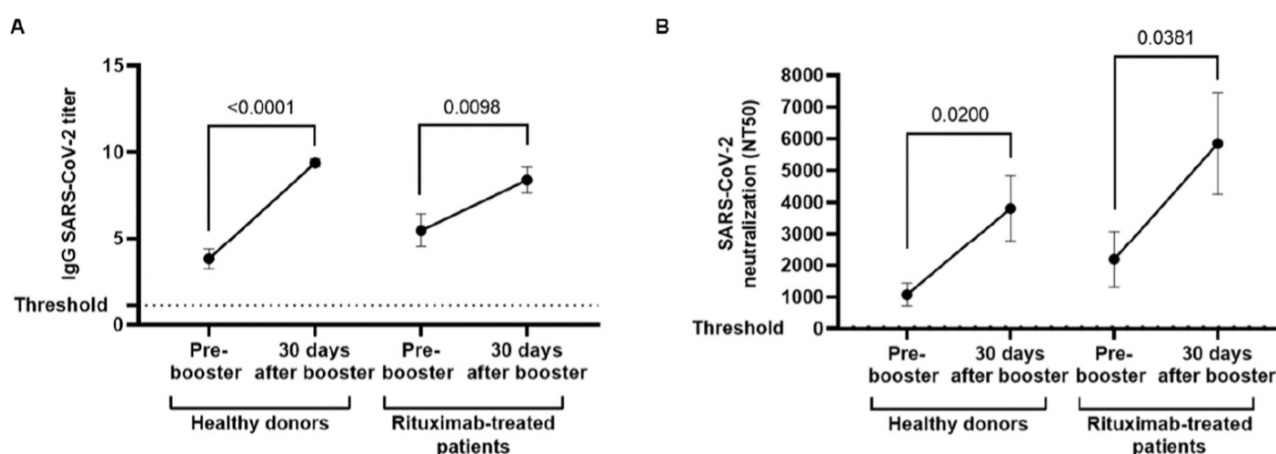


Figure 31. Serological response against COVID-19 vaccine in plasma of rituximab-treated patients and healthy donor before and after receiving the booster dose. (A) IgG titers in plasma from individuals with hematological disease who received rituximab before the second dose of vaccine (pre-booster) and the booster dose of SARS-CoV-2 vaccine, in comparison with healthy donors. (B) Neutralizing antibody titer at 50% inhibition (NT50) against SARS-CoV-2 of plasma isolated from individuals who received rituximab and healthy donors before and after the booster dose of COVID-19 vaccine. Each dot in the graphs corresponds to mean and the vertical lines correspond to standard error of the mean (SEM). Statistical significance within groups was calculated using the Wilcoxon signed-rank test.

5.4.1.3. Analysis of B-Cell Subpopulations

Total levels of B cells (CD19+) before the booster vaccine were reduced 1.6-fold ($p = 0.0217$) in rituximab-treated patients in comparison with healthy donors (*Figure 32A*). After receiving the booster, total B-cell levels were not significantly modified in either group.

The analysis of B-cell subpopulations showed that rituximab-treated patients presented predominantly an immature phenotype (CD10+CD27-), with levels that were 2.6-fold ($p = 0.0101$) and 2.5-fold ($p = 0.0049$) higher than those observed in healthy donors before and after receiving the booster

dose, respectively. On the other hand, tissue-like memory B-cells (CD10-CD27-CD21^{low}) were reduced 2.6-fold ($p = 0.012$) and 4.0-fold ($p = 0.0005$), in comparison with healthy donors, while the levels of naïve B cells (CD10-CD27-CD21^{high}) were reduced 1.7-fold before ($p = 0.0020$) and after ($p = 0.0031$) receiving the booster dose (Figure 32B).

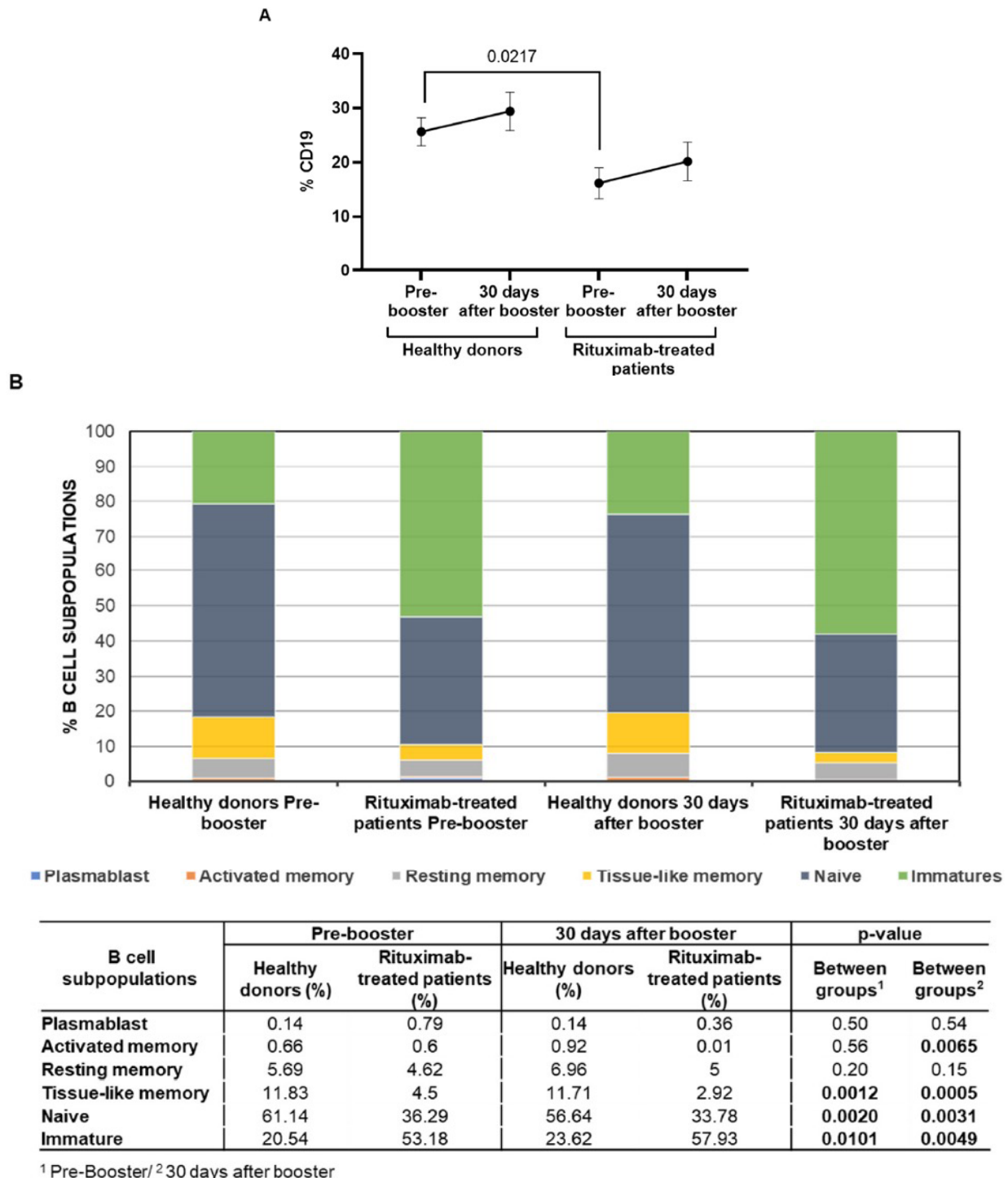


Figure 32. Total levels of B cells and distribution of B-cell subpopulations in PBMCs of rituximab-treated patients and healthy donors before and after receiving the booster dose. (A) Total levels of B cells (CD19+) in PBMCs of patients treated with rituximab and healthy donors before and after receiving the booster dose of COVID-19 vaccine. Each dot in the graphs corresponds to the mean \pm SEM. Statistical significance was calculated using the Mann-Whitney test. (B) Analysis of the distribution of B-cell subpopulations in PBMCs of patients treated with rituximab and healthy donors before and after receiving the booster dose of COVID-19 vaccine. Mean data are representing bar graphs. Data in the table show the statistical significance between groups that was calculated using Mann-Whitney test.

5.4.1.4. Antibody-Dependent Cellular Cytotoxic Response of PBMCs from Rituximab-Treated Individuals

ADCC was reduced 1.7-fold ($p = 0.0047$) in rituximab-treated patients 4 months after receiving the second dose of COVID-19 vaccine, in comparison with healthy donors, and the booster dose did not improve this response in either group of participants (*Figure 33A*). The analysis of the cytotoxic cell populations that could be responsible for this ADCC response showed that total T-cell levels (CD3+) were increased 1.2-fold ($p = 0.042$) in rituximab-treated individuals compared to healthy donors previous to the booster dose, but these levels were reduced ($p = 0.0237$) after the booster dose (*Figure 33B*). We did not find changes in the levels of total CD8+ T lymphocytes after receiving the booster dose in any group of participants (data not shown [41]). However, the levels of highly cytotoxic populations of CD3+CD8-TCR $\gamma\delta$ + and CD3+CD8+TCR $\gamma\delta$ + cells were increased 3.8-fold ($p < 0.0001$) and 2.2-fold ($p < 0.0006$), respectively, in rituximab-treated patients in comparison with healthy donors, prior to receiving the booster dose (*Figure 33C*). The levels of these cells remained unchanged in rituximab-treated individuals after receiving the booster dose, whereas they were significantly increased in healthy donors 3.94-fold ($p = 0.0003$) and 2.59-fold ($p < 0.0001$), respectively.

The same pattern was observed in the level of NKT-like cells (CD3+CD56+) that was increased 2.7-fold ($p < 0.0001$) in rituximab-treated patients before receiving the booster dose, in comparison with healthy donors (*Figure 33D, left graph*). The level of these cells remained unchanged in rituximab-treated individuals after the booster dose, but it was increased 1.4-fold ($p = 0.0017$) in healthy donors. The levels of NK cells (CD3-CD56+) were similar in both cohorts, and they showed a significant decrease after receiving the booster dose (*Figure 33D, right graph*).

The activation of these cytotoxic cells was evaluated through the expression of the degranulation marker CD107a, but it remained stable in both cohorts before and after the booster dose (data not shown [41]).

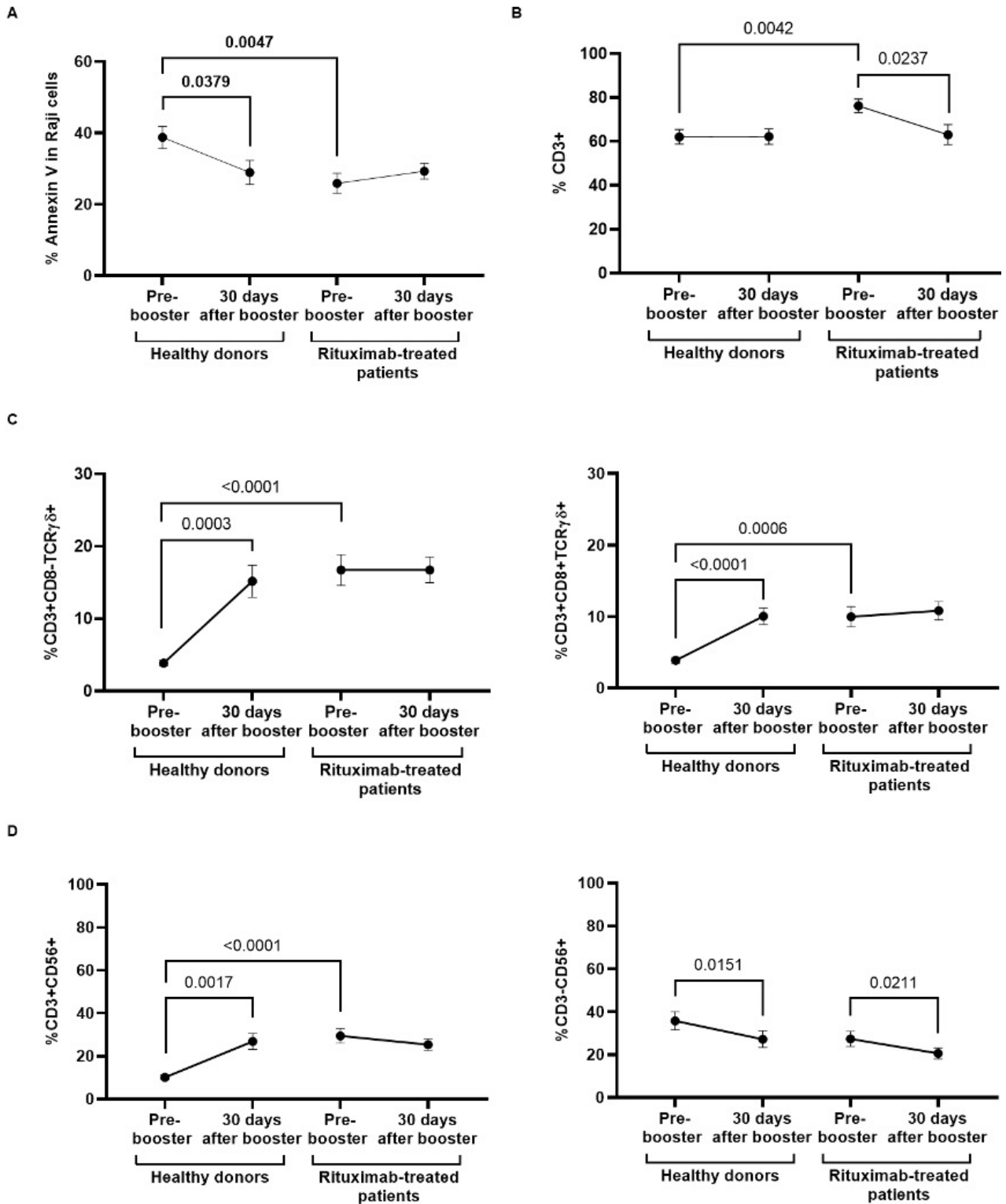


Figure 33. Analysis of ADCC response of PBMCs from rituximab-treated patients and healthy donors before and after receiving the booster dose of COVID-19 vaccine. (A) Quantification of the expression of phosphatidylserine in the surface of rituximab-coated Raji cells cocultured with PBMCs isolated from rituximab-treated patients and healthy donors before and after receiving the booster dose, after staining with Annexin V. (B) Total levels of CD3+ T cells in individuals of both cohorts that were present in the supernatant of the co-culture. (C) Levels of CD3+CD8-TCR $\gamma\delta$ + subpopulation (left graph) and CD3+CD8+TCR $\gamma\delta$ + subpopulation (right graph) in PBMCs from individuals of both cohorts. (D) Levels of NKT-like cells (CD3+CD56+) (left graph) and NK cells (CD3-CD56+) (right graph) in PBMCs from individuals of both cohorts. Each dot in the graphs corresponds to the mean \pm SEM. Statistical significance between groups was calculated using the Mann-Whitney test, and statistical significance within groups was calculated using the Wilcoxon signed-rank test.

5.4.1.5. Specific Direct Cellular Cytotoxicity of PBMCs and Viral Neutralization

The specific DCC response against Vero E6 cells infected with pseudotyped SARSCoV-2 of PBMCs isolated from rituximab-treated patients and healthy donors did not significantly change one month after receiving the booster dose, but this activity was reduced 2.0-fold ($p = 0.0086$) in PBMCs of rituximab-treated patients in comparison with healthy donors (*Figure 34A*). This diminished cytotoxic activity caused a decreased capacity of PBMCs from rituximab-treated individuals to neutralize the viral replication after co-culture with the infected cells, which was 2.0-fold ($p = 0.0004$) and 1.6-fold ($p = 0.0069$) reduced before and after receiving the booster dose, respectively, in comparison with healthy donors (*Figure 34B*).

The analysis of the cell populations that could be responsible for the DCC response showed that total T-cell count was 1.2-fold ($p = 0.0151$) higher in PBMCs from rituximab-treated patients; however, it remained steady after the booster dose, whereas it was increased 1.3-fold ($p = 0.0012$) in healthy donors (*Figure 34C*). Similarly, the booster dose did not increase the levels of NKT-like (CD3+CD56+) cells (*Figure 34D, left graph*) or NK (CD3-CD56+) cells (*Figure 34E, left graph*) in rituximab-treated individuals and healthy donors. However, the expression of CD107a in NKT-like cells of rituximab-treated patients was diminished 1.5-fold ($p = 0.0004$) before receiving the booster dose in comparison with healthy donors, and it did not significantly change after the booster dose (*Figure 34D, right graph*). The booster did not improve the activity of NKT-like cells in healthy donors either.

In addition, the level of NK cells was reduced 1.3-fold ($p = 0.0209$) in rituximab-treated individuals, in comparison with healthy donors, before receiving the booster dose, and it did not change after the booster dose. NK cell degranulation capacity was not modified after the booster dose (*Figure 34E, right graph*). No significant differences were found in CD8+ T-cell count, in the levels of TCR $\gamma\delta$ + cells, or in the expression of CD107a in these cells between both cohorts, before or after receiving the booster dose (data not shown [197]).

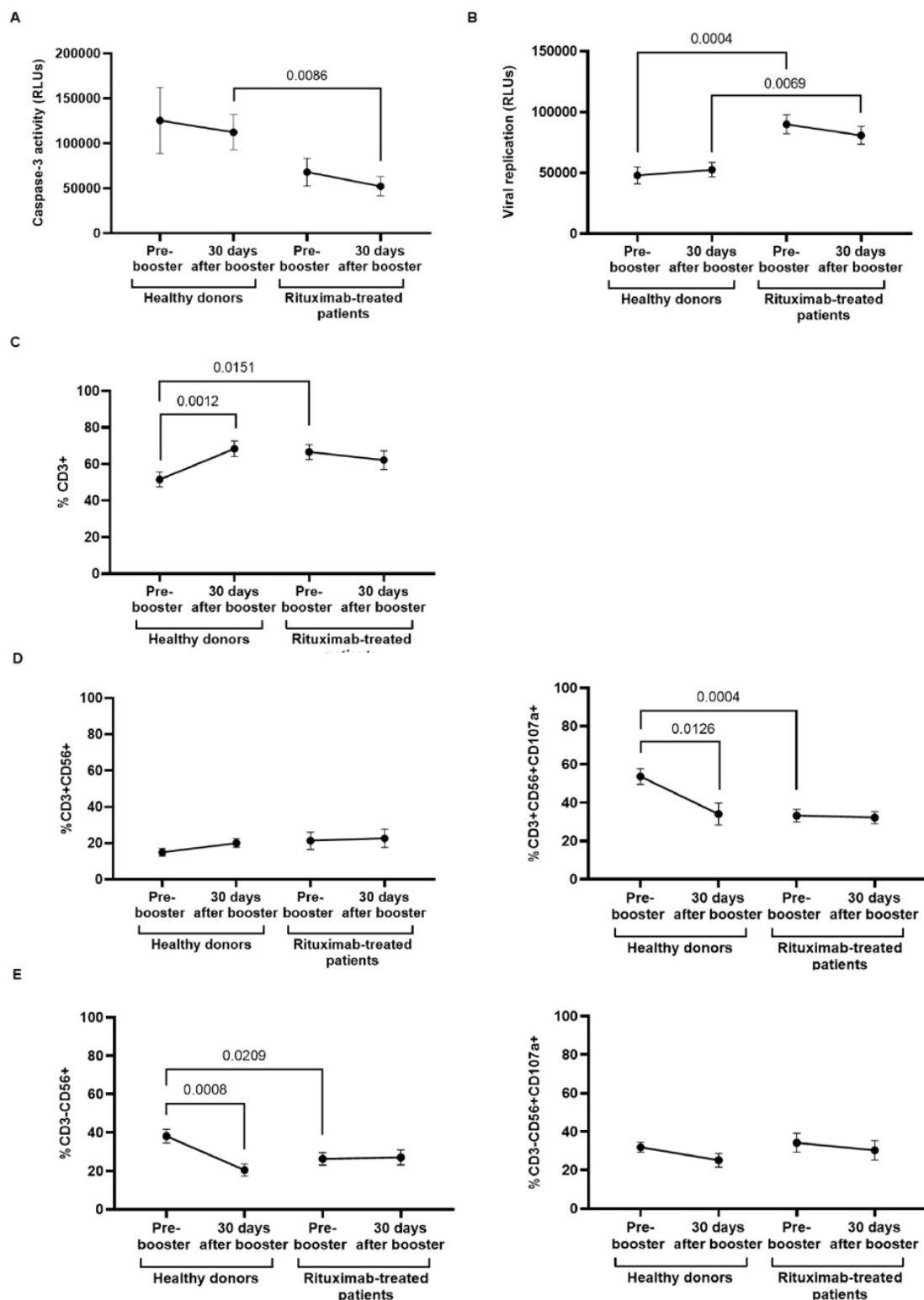


Figure 34. Analysis of DCC response of PBMCs from rituximab-treated patients and healthy donors before and after receiving the booster dose of COVID-19 vaccine. (A) DCC was assessed by measuring the activity of caspase-3 in pseudotyped-SARS-CoV-2-infected Vero E6 cells cocultured with PBMCs from rituximab-treated patients in comparison with healthy donors before and after the booster dose. (B) The capacity of PBMCs from both cohorts to eliminate pseudotyped SARS-CoV-2-infected Vero E6 cells was determined by quantifying the production of renilla (relative light units, RLUs) after coculture for 1 h. (C) Total levels of CD3+ T cells in individuals of both cohorts that were present in the supernatant of the coculture. (D) Total levels of NKT-like cells (CD3+CD56+) (left graph) and NKT-like cells expressing the degranulation marker CD107a (CD3+CD56+CD107a+) (right graph) in PBMCs from individuals of both cohorts. (E) Total levels of NK cells (CD3-CD56+) (left graph) and NKT-like cells expressing the degranulation marker CD107a (CD3-CD56+CD107a+) (right graph) in PBMCs from individuals of both cohorts. Each dot in the graphs corresponds to the mean \pm SEM. Statistical significance between groups was calculated using the Mann-Whitney test, and statistical significance within groups was calculated using the Wilcoxon signed-rank test.

5.4.3.6. Breakthrough Infections

Six of 18 (33.33%) rituximab-treated patients had a breakthrough infection with SARS-CoV-2 within a median time of 92 days (IQR: 70–134) since receiving the booster vaccine dose. Infection was determined by positive antigen COVID-19 test or specific RT-qPCR. Five (83.4%) infected patients suffered mild infection that did not require hospitalization.

One (16.6%) patient required admission to the hospital and low-oxygen-flow support before complete recovery without further complications. This patient had received the last dose of rituximab more than 1 year before receiving the booster and presented proper neutralizing antibodies titers after the second dose against SARS-CoV-2 that were stable after the booster vaccine. There were no infections reported in the healthy donor group.

5.4.2. DISCUSSION

Individuals with hematological diseases on treatment with immunosuppressive or anticancer agents are more susceptible to developing severe forms of COVID-19, due to the characteristics of the disease or the treatment they received [198]. Therefore, the vaccination of this population has been a priority since the authorization of the first COVID-19 vaccines [199]. Most studies about the efficacy of COVID-19 vaccines have been focused on the analysis of the humoral response, although some studies have also evaluated the cellular response at 6 months following a completed primary series of vaccination. Although elevated T-cell responses have been observed in most individuals at 6 months, the results have varied from a 42% to a 90% increase [200], and there is still controversy about the correlation among these increased levels of T cells, the development of memory B cells, and the presence of neutralizing antibodies. Anti-CD20 antibodies such as rituximab are known to efficiently cause a peripheral B-cell aplasia that begins to recover 6 to 9 months after the last dose of the antibody [201,202]. This aplasia, along with other treatments that may be associated with the anti-CD20 antibodies in the patients, such as chemotherapy, or the disease itself, confers high immunosuppression. Consequently, there is major concern about the efficacy of COVID-19 vaccines in individuals treated with B-cell-depleting immunotherapy, as the experience with other vaccines has shown an impaired humoral response [201,203,204].

Recent studies confirmed that seroconversion in individuals on treatment with anti-CD20 after receiving two doses against COVID-19 is suboptimal compared with healthy donors (<10%) [138,205]. This percentage significantly increases after ceasing the treatment, from 17.5% in patients that ended anti-CD20 less than 6 months earlier [162] to higher results of 66–80% [138,162,206,207] 6–9 months since the last dose, which also concurs with the time of peripheral B-cell aplasia recovery. Not only are seroconversion and titers decreased in these patients, but so is the neutralizing capacity of these antibodies, which was impaired even 12 months after having received rituximab [208]. Consequently, rituximab-treated individuals present a high risk for mortality, severe disease, and prolonged in-hospital stay after SARS-CoV-2 infection [209], and the full vaccination schedule presents highly variable efficacy that is mostly influenced by the time that has passed since the last dose of rituximab.

In immunocompetent patients and solid organ transplant patients, the booster vaccine dose against COVID-19 has demonstrated clinical and serological efficacy [210,211], but data regarding the improvement of this humoral immune response in patients treated with anti-CD20 are still scarce. Preliminary results in small series of patients suggest that individuals with active anti-CD20 treatment do not improve their humoral response after the booster vaccine but are likely to seroconvert

if they had discontinued immunotherapy for more than 1 year [212,213]. However, these results focused only on the humoral response; therefore, there is limited information about the cellular immune response or about the integration of both humoral and cellular immune responses in this population, which is essential to control SARS-CoV-2 infection and avoid severe disease [214-216]. This is particularly interesting in individuals treated with rituximab, as it seems to be a significant dissociation between humoral and cellular immune responses, presenting T-cell responses (71–85%) that do not rely on seropositivity [138,162,206,213,217]. Nonetheless, these results derive from the quantification of the release of proinflammatory cytokines such as IFN γ , TNF α , or IL-2, after stimulation with SARS-CoV-2 peptides, but they do not provide any information about the capacity to generate an effective cytotoxic response against SARS-CoV-2-infected cells that may contribute to clearing the infection.

In this study, we presented a cohort of patients that had been recently treated with rituximab due to their hematological disease. They received the full vaccination schedule against COVID-19 with Spikevax (mRNA-1273, Moderna) within a median of 9.6 months after receiving the last dose of rituximab. A group of 15 healthy donors were used as controls, and they had been fully vaccinated with COMIRNATY (BNT162b2, Pfizer-BioNTech). The efficacy for these vaccines has been analyzed in several clinical trials and real-world studies [78,81] that have determined similar results for both vaccines, being estimated at 92–98% efficacy against SARS-CoV-2 infection after receiving two doses [218,219]. There have been major concerns about the efficacy against the new variants of SARS-CoV-2, since these variants have multiple mutations, including those in the S protein of the virus that may change the effectiveness of the different vaccines [220]. Even though protection against the Delta variant infection seems to decrease to 53.5–88% with two doses of COMIRNATY and 76–78% with two doses of Spikevax, prevention of severe infection and death remains adequate with 89–93.1% and 90–95%, respectively [221,222]. Results for the Omicron variant showed only 33% of protection against infection, with an increased rate of breakthrough infections that were mostly mild [223]. According to this information, the results obtained from both cohorts of patients and controls would be comparable.

We analyzed that both humoral and cellular early immune responses produced approximately 4 months after receiving the second dose of vaccine and 1 month after receiving the booster dose, which was administered a median of 13.8 months after the last dose of rituximab. The information obtained could be essential to get a better understanding about the development of the immune response after COVID-19 vaccination in these individuals and the real benefit of the booster vaccine. In accordance with previously published reports, the individuals from our cohort showed levels of seroconversion and neutralizing capacity that were comparable to healthy donors 4 months after receiving the second dose of vaccine, despite the presence of a certain level of aplasia with a significantly higher count of immature B cells. Interestingly, these levels were further increased 1 month after receiving the booster dose, which indicated the development of a functional memory B-cell response 13 months after the last dose of rituximab. Moreover, rituximab-treated individuals who were seronegative after receiving the second vaccine dose developed adequate IgG titers with neutralizing capacity after receiving the booster. Therefore, extending the period without immunotherapy treatment enabled an optimal seroconversion as those patients who had received the last dose of anti-CD20 more than 9 months prior to the booster dose developed a humoral response that was comparable to healthy donors.

The role of IgGs in protecting against SARS-CoV-2 infection relies not only on their neutralizing capacity to protect cells from infection, but also on their ability to activate the complement system and ADCC response exerted by NK and CD8+ T cells to eliminate the infected cells in case of break-

through infections. We observed that the booster dose significantly increased the levels of highly cytotoxic cells such as CD3+CD8⁺ TCRγδ⁺ and NKT-like cells in PBMCs from healthy donors, although it did not correlate with an increase in the ADCC response that was previously developed after the second vaccine dose. In rituximab-treated individuals, ADCC response was significantly reduced in comparison with healthy donors, and it did not improve after the booster dose. This could be due to the cell counts or to the fact the level of activation of the essential cytotoxic population that may mediate ADCC in these patients was not modified by the booster dose, which could be related to the residual aplasia and/or to the basal high levels of some of these subpopulations, such as TCRγδ cells, which is usually observed in oncohematological patients as a consequence of the disease [172-174]. Similar results were obtained when DCC activity against cells infected with pseudotyped SARS-CoV-2 was analyzed. PBMCs from rituximab-treated individuals showed a decrease in DCC activity in comparison with healthy donors 4 months after having received the second dose, and this activity was not improved after receiving the booster dose. As a result, the overall capacity of PBMCs from rituximab-treated individuals was unable to clear the infected cells even after the booster dose. Interestingly, although the booster dose induced an overall increase in the level of total CD3+ T cells in healthy donors, we did not observe an improvement in any of the analyzed cytotoxic cell populations. This lack of enhancement in the levels and activity of cytotoxic cells was also observed in rituximab-treated individuals before and after receiving the booster dose. This translates into a suboptimal cytotoxic capacity and, consequently, an impaired DCC in rituximab-treated individuals, which may be related to other treatments that are usually associated with rituximab such as chemotherapy in NHL patients or other immunosuppressives drugs in IT and AIHA patients. In fact, 14 (78%) individuals had received a concomitant treatment within the last 18 months prior to the booster, including a high dose of corticosteroids in 12 of them, which holds a strong immunosuppressive effect even in monotherapy [224]. However, corticosteroids are often combined with other chemotherapy regimens in NHL, such as CHOP or bendamustine, which depletes hematopoietic precursor lineages, especially B- and T-cell lymphoid cells [225]. This induces more profound and long-term immunosuppression in these patients; for example, alkylate drugs, such as bendamustine, generate a prolonged CD4 lymphopenia which decreases up to 6 months after receiving the last dose and does not recover until 7–9 months after the end of treatment [226-229]. Some studies stated that this lymphopenia is more profound when bendamustine is combined with rituximab [230]. Not only may systemic treatments contribute to a suboptimal immune response, but local radiotherapy may also impair proliferation of the hematological lineages in the bone marrow, causing abnormal T-cell development in the thymus or even transient thymus atrophy [225], lymphopenia, and T dysregulation [231-233].

Breakthrough infections within 2–6 months following two doses of COMIRNATY or Spikevax are relatively low, and several studies have calculated that infections are less frequent in vaccinated healthy individuals (0.2–6.3% across studies) than in unvaccinated individuals (2.2–7.5% across studies) [234-237]. Taking into account these data, the rate of breakthrough infections detected in our cohort (six of 18; 33.33%), acquired a median time of approximately 3 months after receiving the booster dose, was considerably higher. Although most of these individuals (five of six; 83.33%) had mild infection and only one (one of six; 16.67%) required hospitalization, these data showed that the immune protection exerted by the booster dose in rituximab-treated individuals may not last as long as in untreated, healthy individuals.

5.4.3. CONCLUSIONS

In conclusion, we determined that the booster dose of Spikevax improved the humoral immune response in rituximab-treated patients, similarly to the booster dose of COMIRNATY in healthy donors. However, it has been observed that the levels of IgG against SARS-CoV-2 progressively decreased within 6 months after receiving the second vaccine dose in immunocompetent individuals [238]. Therefore, it remains to be seen if a booster dose may elicit a perdurable humoral response, not only in immunocompetent but also in immunocompromised individuals. Interestingly, the booster dose did not significantly modify the cellular immune responses elicited by the second dose in healthy individuals. Moreover, these cellular responses were reduced in rituximab-treated individuals and did not improve after receiving the booster dose. However, although breakthrough infections were higher in our cohort of rituximab-treated patients than in healthy donors, most of them developed a mild form of COVID-19, likely due to the high levels of neutralizing antibodies elicited by Spikevax booster dose. Therefore, although the cellular responses appeared to be developed suboptimally in rituximab-treated individuals after three doses of Spikevax, the excellent humoral response developed despite the low levels of B cells and the altered distribution of B-cell subpopulations was able to prevent infection in most individuals. Due to the potent residual effect of rituximab on both humoral and cellular immunity, it is essential to further investigate the effect of the booster dose in individuals who are on active treatment with rituximab or who have discontinued it recently, as this benefit over the humoral response observed in the individuals from our cohort may be reduced in those patients who received rituximab within 6 months before the booster dose.

5.5. INFECCIONES DE BRECHA

Durante el período del estudio (febrero 2021-mayo 2022) realizamos un seguimiento clínico de los participantes a través de las consultas, la historia clínica, el Horus para la información de Atención Primaria y llamadas telefónicas periódicas para registrar posibles infecciones de brecha.

Para estos resultados excluimos a los pacientes de capítulo 5.1, por haber pasado la COVID-19 antes de ser reclutados para el estudio, lo que dificulta comparar los grupos.

De los 202 pacientes restantes, hubo 68 infecciones de brecha (33.17%) y fallecieron 5 pacientes durante el seguimiento, 1 Alo-TPH y 4 LLC. Únicamente uno de los pacientes falleció por COVID-19 (1/68, 1.47%), tratándose de una paciente LLC, de muy avanzada edad, pluripatológica y en tratamiento con ibrutinib. El resto de éxitus no tuvieron relación con la COVID-19.

Del grupo de LLC, 18/40 pacientes (45%) padecieron una infección de brecha, siendo el grupo más castigado, con 4 pacientes que sufrieron una infección severa o crítica (1 éxitus), 2 con infección moderada y el resto leves. De los pacientes con infección severa 3/4 se encontraban en tratamiento con ibrutinib al igual que uno con infección moderada.

De los pacientes con LMC 13/37 (35,51%) tuvieron una infección de brecha, leve en todos los casos. De ellos, 8 eran pacientes en tratamiento con ITKs y 5 habían discontinuado tratamiento. Un paciente en régimen de discontinuación padeció 2 infecciones de brecha, ambas leves.

Sólo 10 pacientes con MM (25%) presentaron una infección de brecha, 6 no candidatos a TASPE y 4 tras recibir un TASPE, todos ellos fueron leves, permitiendo un manejo domiciliario.

De los individuos que recibieron un Alo-TPH antes de iniciar la vacunación, 8 pacientes se infectaron con SARS-CoV-2 (22.22%), todos con una severidad leve. Sin embargo, de los pacientes que recibieron un trasplante después de haber sido vacunados, 4/11 Alo-TPH (36.36%) padecieron el COVID-19, requiriendo hospitalización uno de ellos, mientras que 7/18 (38.89%) TASPE padecieron una infección leve.

Por último, de los pacientes tratados con rituximab, 7/20 (35%) presentaron una infección de brecha, siendo también leve en todos, excepto un paciente que requirió de una corta hospitalización para administración de oxígeno a dosis bajas.

La mayoría de las infecciones tuvieron lugar tras recibir la dosis booster (*Tabla 8*), durante la ola en la que predominó la variante Ómicron.

N=202	Pacientes con infecciones n (%)	Gravedad	Situación
LLC (n=40)	Total: 18 (45) • Ibrutinib 6/13 (46,15) • Otros tto 3/11 (27,27) • WW 9/16 (56,25)	Severa o crítica: 4 (1 éxitus) • 3 Ibrutinib • 1 WW Moderada: 2 • 1 Ibrutinib • 1 WW Leves: 12	Tras la 2ª vacuna: 5 (incluido el éxitus) Tras el Booster: 13 (incluidas infecciones severas)
LMC (n=37)	Total: 13 (35.51) • ITKs 8/27 (29,63) • Discontinuación 5/10 (50)	Leves: 14	Tras la 2ª vacuna: 7 Tras el Booster: 7
MM (n=40)	Total: 10 (25) • no TASPE 6/20 (30) • TASPE 4/20 (20)	Leves: 10	Tras la 2ª vacuna: 2 Tras el Booster: 8
Vacunación tras Trasplante alogénico (n=36)	Total: 8 (22.22)	Leves: 8	Tras la 2ª vacuna: 3 Tras el Booster: 5
Trasplante tras la vacunación (n=29)	Total: 11 (37.93) • Alo-TPH: 4/11 (36,36) • TASPE: 7/18 (38,89)	Moderada-severa: 1 Alo-TPH Leves: 10	Revacunación Sin revacunación: 1 Tras 1ª dosis: 4 Tras 2ª dosis: 6
Rituximab (n=20)	Total: 7 (35)	Leves: 6 Severa: 1	Tras el Booster: 7

Table 8. Infecciones de brecha en pacientes oncohematológicos.

6

DISCUSIÓN

Dentro del amplísimo espectro de pacientes inmunodeprimidos encontramos a los pacientes oncohematológicos, quienes a su vez engloban pacientes con multitud de enfermedades y circunstancias diferentes. Esto implica perfiles de inmunosupresión muy distintos, lo que dificulta realizar recomendaciones generales en relación con la vacunación o determinar un grado de riesgo unívoco ante las infecciones.

Este problema se ha puesto de especial manifiesto en los últimos 3 años con la llegada de una pandemia de consecuencias inmensurables. La respuesta de la comunidad científica ha sido inigualable, proporcionando nuevo conocimiento a diario a velocidad vertiginosa y desarrollando vacunas en un tiempo récord que lograron frenar la catástrofe sanitaria en la que nos encontrábamos.

A pesar de esto, aún quedan muchas preguntas sin responder. Uno de los grupos más perjudicados, ha sido, precisamente, el de los pacientes inmunodeprimidos oncohematológicos, una población particularmente castigada durante las diferentes “olas” de la pandemia por la altísima mortalidad de sus pacientes [55-58], consecuencia de un sistema inmune muy deteriorado por la propia enfermedad y los tratamientos, lo que condiciona también una respuesta habitualmente pobre a las vacunas [105]. Por ello, fueron rápidamente declarados grupo prioritario en la campaña de vacunación en España, si bien la eficacia real que tienen estas vacunas frente a la COVID-19 era desconocida en estos pacientes, ya que fueron excluidos de los ensayos clínicos [78,81,84,175].

Por otro lado, la mayoría de los estudios referentes a la eficacia de las vacunas toman en consideración únicamente los resultados de seroconversión, si bien el sistema inmune es mucho más complejo, tanto en términos de inmunidad humoral como también de inmunidad celular, que suele quedar relegada por la dificultad añadida que supone valorarla. Esto es especialmente importante en pacientes oncohematológicos, que, en ocasiones, pueden no seroconvertir por las razones ya mencionadas y, sin embargo, sí desarrollar una inmunidad celular que pueda resultar protectora frente a la infección por el SARS-CoV-2.

Resulta, pues, imprescindible hacer una valoración global de esta respuesta inmune en cohortes muy bien definidas, lo que constituye el objetivo de esta tesis.

6.1. Bloque I: Determinación de la respuesta inmune celular y humoral de pacientes con neoplasias hematológicas que se someten a un TASPE tras padecer una infección natural por COVID-19

La recomendación actual para los pacientes que reciben un trasplante de médula ósea, ya sea alogénico o autólogo, es la de reiniciar el calendario vacunal asumiendo que la inmunidad pre-existente frente a vacunas e infecciones naturales se pierde durante y tras la terapia de trasplante [115,191,239]. Sin embargo, la evidencia que hay sobre la pérdida de la inmunidad tras el trasplante y la eficacia de la vacunación posterior es muy escasa y generalmente antigua, sin contemplar nuevos escenarios como los creados por la introducción del rituximab o sus análogos, presentes en casi todos los pacientes con LNH de estirpe B; de la lenalidomida o talidomida, usada en la mayoría de los pacientes con MM tanto antes del TASPE como durante la fase de mantenimiento posterior; el trasplante haploidéntico; la ciclofosfamida post-TPH... [115] En el caso específico del SARS-CoV-2, con una evidencia prácticamente inexistente, se adoptaron estas mismas recomendaciones para los pacientes que habían pasado la COVID-19 o los que habían recibido la vacuna previamente al tras-

plante, decidiendo, dado el altísimo riesgo de estos pacientes, optar por una actitud conservadora y reiniciar “de novo” la vacunación.

En nuestra población únicamente 3/9 pacientes presentaron seroconversión tras la infección natural, lo que es una ratio muy inferior a la de los pacientes inmunocompetentes. Todos los pacientes evaluados que seroconvierten presentan una disminución de los títulos de IgGs y de la capacidad neutralizante frente al SARS-CoV-2 en la valoración post-trasplante, lo que resulta acorde con lo descrito en la respuesta inmune a otras infecciones o vacunas en individuos que reciben un trasplante de células madre (ya sea alogénico o autólogo), en los que es frecuente que los títulos disminuyan o seronegativicen incluso después del primer año tras el trasplante [240-243]. Por tanto, dado que sólo había pasado una media de 3,4 meses desde que los pacientes se trasplantaron hasta que se recolectó la segunda muestra, es probable que los niveles de anticuerpos pudieran continuar disminuyendo progresivamente en estos pacientes en los meses posteriores en ausencia de un nuevo estímulo (reinfección o inicio de la vacunación frente a la COVID-19). Además, observamos una marcada alteración en la distribución de las subpoblaciones de linfocitos B, con un porcentaje muy elevado de plasmablastos y células B inmaduras, propios de una médula ósea todavía en reconstitución y que probablemente condicionará una respuesta humoral subóptima.

Resulta esperanzador observar que sí se conserva cierta respuesta celular después del trasplante, aunque hay que matizar que, si bien la ADCC está conservada *in vitro*, muchos de estos pacientes no podrán depender de ella en caso de infección, ya que no presentan IgGs anti-SARS-CoV-2 (el estudio *in vitro* se realiza con rituximab) ni probablemente tengan capacidad para producirlos *in vivo* durante los primeros meses tras la infusión, a causa de la desregulación de linfocitos B y de la lenta recuperación de linfocitos T CD4+ tras el TASPE, necesarios para desarrollar una respuesta inmune adquirida eficaz y duradera [145,149]. Es precisamente esta pobre actividad de las células T CD4+ una de las responsables de que también la respuesta a las vacunas se encuentre reducida incluso después del primer año tras el TASPE.

En estas circunstancias, la DCC puede ser resultado de células T de memoria específicas frente al SARS-CoV-2 que hayan sobrevivido al efecto de la quimioterapia de acondicionamiento o que se hayan infundido en el producto del trasplante; o bien producto de la actividad citotóxica innata de células que responden a antígenos sin necesidad de que sean presentados por los MHC de las células presentadoras de antígeno [151]. En nuestros resultados objetivamos también una actividad adecuada de DCC, pero en el estudio de las poblaciones responsables de esta respuesta encontramos una proporción elevada de células NK y NKT, así como de células $\gamma\delta$, estas además muy activadas, con gran capacidad de producción de citoquinas (TNF α e IFN γ) en los individuos trasplantados respecto a los sanos. Esto parece sugerir que la respuesta es principalmente debida a estas poblaciones, que además son las primeras en reconstituirse tras el periodo de leucopenia del TASPE.

Debe tenerse en cuenta que para este estudio fueron seleccionados tanto donantes sanos como pacientes que habían padecido previamente una infección leve o asintomática. Se ha comprobado que infecciones de este tipo provocan un pico menos elevado de anticuerpos IgG y de respuesta celular T que las infecciones moderadas o severas [244-246]. Un territorio diferente es el estudio de pacientes que se someten al TASPE tras haber sido previamente vacunados, como que veremos más adelante.

Por tanto, si bien es posible que una infección previa de COVID-19 confiera cierta protección en el periodo de post-TASPE inmediato, sí parece probable que esta respuesta resulte insuficiente e incluso que continúe disminuyendo con el transcurso del tiempo. Por ello, un inicio precoz de la vacuna-

ción frente a la COVID-19 es recomendable, si bien es coherente pensar que la respuesta también sea diferente a lo descrito para pacientes inmunocompetentes, como sucede también en otras vacunas.

6.2. Bloque II: Determinación de la respuesta inmune celular y humoral temprana de pacientes con LMC, MM, LLC y Alo-TPH tras la primera dosis de la vacuna frente a la COVID-19

Los primeros resultados de eficacia de las vacunas de la COVID-19 en pacientes oncohematológicos revelaban respuestas muy diversas según el tipo de neoplasia o tratamiento. Sin embargo, como ya hemos mencionado, los estudios se centraban principalmente en datos de seroconversión, con poca atención a la inmunidad celular o limitándola a estudios indirectos de cuantificación de citoquinas proinflamatorias tras la estimulación de células citotóxicas [161,162,168].

El estudio sobre la respuesta inmune temprana tras la primera dosis de la vacuna en pacientes oncohematológicos pretendía responder este interrogante y dar respuesta a si una única dosis de la vacuna podría proporcionar cierta protección, aunque fuera parcial, frente a la infección. Además, estos primeros resultados podrían anticipar pistas sobre la respuesta tras la vacunación completa.

Probablemente los resultados más llamativos obtenidos son los que conciernen a los pacientes con LLC y LMC. En los pacientes con LLC, los resultados de seroconversión tras la primera dosis son pésimos (13%), acordes con lo esperado según publicaciones similares [166], y van unidos a una capacidad neutralizante prácticamente inexistente, lo que también coincide con lo que previamente se había publicado [170,171,208]. Sin embargo, es interesante observar que estos pacientes sí presentan una reactividad citotóxica que puede compensar en cierta forma la pobre respuesta humoral que deriva de una línea de células B muy afectada por la enfermedad y el tratamiento, lo que confirma que puede haber discrepancias entre la respuesta serológica y la celular. La DCC, por ejemplo, parece conservada, principalmente debido a células T CD8+ que, sin presentar una reactividad muy marcada (la expresión de CD107a es baja), parece suficiente para frenar la replicación viral de célula infectadas. Es significativo que esta respuesta celular está presente incluso antes del inicio de la vacunación, y puede ser fruto tanto de una actividad citotóxica innata conservada, cuyas subpoblaciones pueden encontrarse aumentada en pacientes con cáncer, como es el caso de los linfocitos T $\gamma\delta$; o de una reactividad cruzada de células T de memoria a la proteína S del SARS-CoV-2. En individuos sanos se ha observado que hasta en un 30% se pueden encontrar reactividades cruzadas probablemente con otros virus respiratorios [244,247,248].

Cabe recordar que 4/15 (26,7%) pacientes, que se encontraban bajo régimen de WW, sin tratamiento activo, recibieron la vacuna de AstraZeneca. No realizamos análisis de las diferencias entre las vacunas al ser cohortes pequeñas, pero sería interesante analizarlo en estudios más amplios.

En el caso de la LMC, lo llamativo es que presenta una respuesta celular muy similar a los donantes sanos, con poblaciones citotóxicas muy parecidas. Resulta sorprendente, sin embargo, que los resultados de seroconversión (90%) son aún mejores que los de donantes sanos (42,8%) con excelentes resultados de capacidad neutralizante. Si bien es conocido el efecto inmunomodulador de los ITKS [113], no hay que olvidar que 4/10 (60%) pacientes de LMC se encontraban en régimen de discontinuación, lo que puede implicar que el efecto inmunomodulador puede prolongarse incluso tras la suspensión del fármaco, como han sugerido otros trabajos [169]. Es también interesante observar que esta excelente respuesta tuvo lugar habiendo recibido un 60% de los pacientes la vacuna

de AstraZeneca y siendo evaluados 3 semanas después de recibirla (el esquema de administración de esta vacuna era mucho más largo). Si bien no realizamos un análisis por subgrupo dentro de la cohorte, estos pacientes podrían presentar una adecuada respuesta también a esta vacuna, que fue objeto de discusión cuando hubo que seleccionar qué vacuna administrar a cada grupo. Tampoco hemos encontrado estudios que comparen diferentes vacunas frente a la COVID-19 en pacientes con LMC, pero un estudio recientemente publicado que describe de forma longitudinal la respuesta, tanto celular como humoral, en 40 pacientes con LMC bajo tratamiento con ITKs en contraste con un grupo control de donantes sanos no encontró diferencias entre ambas poblaciones en ningún momento del seguimiento (tras la primera, segunda vacuna y el booster). Entre los pacientes con LMC, 22/62 habían recibido AstraZeneca frente a únicamente 3/44 en los donantes sanos [249].

Por último, pacientes con MM y Alo-TPH, presentan una seroconversión similar a la de los donantes sanos (40 y 41,6% respectivamente) con una capacidad de neutralización media (57 y 67%), a medio camino entre los de LLC y la de los LMC. La respuesta celular es también similar a la de los controles, en la que, si bien se objetiva una disfunción cualitativa en la activación de las subpoblaciones citotóxicas (expresión de CD107a), esto no impide que un aumento en el porcentaje de linfocitos T CD8+, NKs y linfocitos $\text{T}\gamma\delta$ consiga un control de la replicación viral parecido al de los donantes sanos.

Cabe destacar que, en el período comprendido entre la administración de la primera y la segunda dosis de la vacuna, ninguno de los pacientes seleccionados para este estudio (n= 52) ni en el total de pacientes que reclutamos para el proyecto global (n=211) padeció una infección de brecha por SARS-CoV-2. Por tanto, si bien las respuestas son muy variadas dentro de los 4 grupos de pacientes (LMC, LLC, MM, Alo-TPH), en general podemos concluir que, excepto los pacientes con LMC, que desarrollan una respuesta excelente a la primera dosis, el resto de los pacientes oncohematológicos presentan una respuesta humoral disminuida; que, sin embargo, parece compensarse parcialmente con una discreta respuesta celular dependiente principalmente de linfocitos CD8+ y linfocitos T CD8 \pm TCR $\gamma\delta$. Es posible que esta respuesta celular proporcione al menos una protección parcial frente a la infección.

6.3. Bloque III: Determinación de la respuesta inmune celular y humoral de pacientes vacunados para la COVID-19 que se someten posteriormente a un trasplante de médula ósea

Tras estudiar la necesidad de vacunación de pacientes que reciben un trasplante tras haber pasado la infección natural COVID-19, diseñamos un estudio que evaluara la respuesta inmune post-trasplante de pacientes que previamente habían sido vacunados frente a la COVID-19.

En el estudio observamos que todos los pacientes llegan al trasplante con IgGs anti- SARS-CoV-2, pero con títulos más bajos que los donantes sanos, lo que coincide con lo visto en nuestros estudios sobre la vacunación en pacientes oncohematológicos y otras publicaciones, y concuerda con una importante disminución de la población de linfocitos B, presente en estos pacientes, que justifica la escasa respuesta serológica. Los niveles de IgGs y la capacidad de neutralización tienden a decaer con el tiempo tal y como se ha descrito previamente [187-189]. Llama la atención que, al comparar estos resultados con los obtenidos en pacientes que se someten a TASPE tras una infección natural por SARS-CoV-2 (capítulo 5.1), observamos que el 100% de los pacientes vacunados presenta seroconversión antes del trasplante frente a únicamente 3/9 (33,33%) de los que habían pasado la infección natural. Además, en el caso de los pacientes vacunados, los títulos se mantienen tras el trasplante, mientras

que en los 3 pacientes de la infección natural caen bruscamente. Estos niveles de IgGs mantenidos tras el trasplante pueden aportar cierta protección al paciente hasta que pueda revacunarse, pero en los estudios de la respuesta inmune en pacientes trasplantados frente a otras vacunas se ha observado que los anticuerpos pueden continuar disminuyendo en título [240-243], al igual que en capacidad neutralizante, por lo que es probable que la protección sea insuficiente a medio plazo. Del mismo modo, la severa alteración que describimos en las poblaciones linfocitarias B, además de la linfopenia, implica una disminuida capacidad de ADCC en estos pacientes tanto pre como post-trasplante.

Sí encontramos diferencias entre los grupos de Alo-TPH y TASPE en relación con la DCC, siendo esta claramente más pobre en el grupo de Alo-TPH tanto antes como después del tratamiento, probablemente como reflejo de una población mucho más castigada con tratamientos más intensivos y citotóxicos que el grupo de TASPE.

A pesar de esta respuesta inmune tan dañada tanto en Alo-TPH como en TASPE, fruto del trasplante y de los tratamientos previos recibidos (los pacientes también presentan respuestas disfuncionales antes del trasplante), observamos un claro beneficio en la vacunación y revacunación de estos pacientes. Previamente a la vacuna, la mortalidad en esta población para la COVID-19 se encontraba cercana al 25% [72,73]. Tras la aprobación de la vacuna, y su administración antes del trasplante y la revacunación tras recibirlo, un 38% continuó infectándose en los 8 meses siguientes, pero sólo 1/11 pacientes requirió hospitalización, precisando únicamente dosis bajas de oxígeno. Si bien la vacunación no ha impedido la infección, es especialmente llamativa la buena evolución de estos pacientes, teniendo en cuenta que uno de los mayores factores de riesgo de mortalidad en los receptores de un trasplante es haberlo recibido en los 12 meses anteriores a la infección, como era el caso de la mayoría de estos pacientes [73].

Por tanto, en estos pacientes concluimos que, si bien no se observan grandes diferencias 2,5 meses después del trasplante ni en la respuesta humoral ni en la celular, sí presentan una respuesta inmune muy deteriorada respecto a donantes sanos. Esta respuesta residual que mantienen puede ser parcialmente protectora, pero tal y como vemos para otras vacunas y también en la vacuna de la COVID-19 en individuos inmunocompetentes, es probable que continúe decayendo a lo largo del tiempo. Por esta razón, la vacunación y revacunación tras el trasplante es recomendable, tanto por la probable pérdida progresiva de la respuesta, como por tratarse de pacientes que ya presentaban una pobre respuesta inmune previa al trasplante, consecuencia de las múltiples toxicidades de los tratamientos recibidos y, en definitiva, tratarse de individuos de muy alto riesgo frente a la COVID-19.

6.4. Bloque IV: Determinación de la respuesta inmune celular y humoral tras el booster para la COVID-19 en pacientes tratados previamente con rituximab

Los individuos que han recibido tratamiento con rituximab presentan una seroconversión muy disminuida tras la pauta vacunal contra la COVID-19, fruto de la aplasia B secundaria al tratamiento. Esta seroconversión, sin embargo, varía mucho y depende de factores como el tiempo desde la última administración de rituximab o de los tratamientos concomitantes y se ha demostrado que su ausencia no siempre se correlaciona con una falta de respuesta celular T [138,162,205,206,213,217]. A pesar de ello, estos pacientes fueron priorizados para recibir el booster, con gran esperanza de que este mejorara la respuesta inmune.

Nuestra cohorte presentaba una buena seroconversión previa al booster, superior a muchos de los estudios publicados para rituximab, probablemente porque hubo una mediana de 9,6 meses desde la última dosis de rituximab hasta la administración de la segunda vacuna, lo que coincide con el período de recuperación de la aplasia de linfocitos B. A pesar de ello, 1 de los 3 pacientes que no había seroconvertido previamente lo hizo tras el booster con una espectacular mejoría tanto en títulos como en capacidad neutralizante de los anticuerpos. Por tanto, a pesar de que los linfocitos B totales aún se encuentran disminuidos respecto al grupo control y que predominan las células B inmaduras, debido a una reconstitución temprana de la aplasia B, impresiona que las células B de memoria, aunque con un porcentaje disminuido, son en este momento tras el tratamiento, funcionales en grado suficiente para responder potentemente al booster de forma similar a los donantes sanos.

Es llamativo, sin embargo, que lo que se encuentra más alterado es la respuesta celular, con una ADCC discretamente disminuida a pesar de mantener un incremento de la proporción de células muy citotóxicas, como son las NKT o los linfocitos CD8 \pm TCR $\gamma\delta$, lo que lleva a pensar que, a pesar de mantener cifras adecuadas, son cualitativamente menos funcionales. Lo mismo sucede con la DCC, con una pobre capacidad de control de la replicación viral en células infectadas por el SARS-CoV-2 pseudotipado. Todo ello sugiere que, además del efecto anti-CD20, existen otros factores que están contribuyendo a esta disfunción celular, como puede ser el uso de quimioterapia o radioterapia concomitante en estos pacientes, algunos ya politratados y con una pobre reserva medular.

Los resultados de infecciones de brecha (33,33%) son más elevados a los descritos en individuos inmunocompetentes, pero, una vez más, hablamos de pacientes que previamente a la vacunación presentaban una mortalidad cercana al 30% [55,74,250] y en esta ocasión sólo 1/7 individuos precisó hospitalización, requiriendo oxigenoterapia a dosis bajas. Esto sugiere que, si bien la incidencia sigue siendo superior a los inmunocompetentes, en pacientes que han recibido tratamiento con rituximab la vacunación sí protege frente a infecciones graves.

6.5. Bloque V: Infecciones de brecha

En cuanto a los resultados clínicos, más limitados por ser un grupo reducido de pacientes con 16 meses de seguimiento, coincide con otras publicaciones en que, si bien la respuesta inmune a la vacuna puede estar alterada, los resultados tanto de tasa de infección como de severidad han bajado drásticamente desde la introducción de la vacunación. El 36,13% de nuestros pacientes se infectaron a lo largo del seguimiento, con únicamente un 1,37% de mortalidad, muy lejos del 30% del que se hablaba en las primeras olas [55-58]. Son mejores resultados que los presentados en otras series, en los que la mortalidad se estima entre el 8-9% [251,252], probablemente porque seleccionamos poblaciones diferentes, con una proporción alta de individuos con buen pronóstico a la COVID-19 y respuesta a la vacuna, como son los pacientes con LMC, y excluyendo otros de peor pronóstico, como los afectados por las Leucemias Agudas, lo que dificulta comparar las poblaciones.

No determinamos las cepas del SARS-CoV-2 de las infecciones de brecha, pero la mayoría de estas infecciones tuvieron lugar durante la ola de Ómicron en España. La variante Ómicron supuso un nuevo pico de incidencia de infección por SARS-CoV-2, ya que diversas mutaciones en el dominio RBD de la proteína S confirieron a esta variante mayor infectividad y evasión de la inmunidad lograda tras la infección natural o la vacunación, con una menor capacidad neutralizante de los anticuerpos. La introducción del booster mejoró la eficacia de la vacunación al fortalecer esta capacidad neutralizante, pero, aun así, la eficacia se mantenía en torno al 65% [101]. Afortunadamente, como también

se observa en nuestros resultados, la respuesta inmune lograda sí era suficiente para evitar una infección severa, crítica o letal [253].

Nuestros resultados aportan una descripción detallada de la respuesta inmune de diferentes grupos de pacientes oncohematológicos en distintos momentos de la vacunación. Si bien los resultados *in vitro* tienen la limitación de que compartimentalizan procesos que *in vivo* tienen lugar al mismo tiempo y se intercorrelacionan, y que estos resultados precisan ser interpretados clínicamente, el análisis de la respuesta humoral y celular de cohortes bien definidas de pacientes nos permite un acercamiento a la respuesta inmune real más completo que el basado únicamente en los datos de seroconversión. A esto se suma el seguimiento clínico que hemos realizado a los pacientes durante más de un año. Por otro lado, el haber realizado todos los experimentos bajo un mismo protocolo y en un mismo laboratorio permite comparar los resultados de las distintas cohortes de pacientes marcando claramente las diferencias que se encuentran en las distintas enfermedades.

7

CONCLUSIONES

1. Los pacientes con neoplasias oncohematológicas presentan una respuesta inmune a la vacunación frente a la COVID-19 que, globalmente, se encuentra disminuida respecto a la población inmunocompetente y que será diferente entre los distintos tipos de neoplasias.
2. La respuesta temprana tras la primera dosis es excelente, tanto en términos de respuesta humoral como celular en pacientes con LMC, siendo similar a la de los donantes sanos.
3. La respuesta temprana tras la primera dosis en pacientes con LLC confirma una pobre respuesta humoral en términos de seroconversión (<20%) y actividad neutralizante de los anticuerpos, que contrasta con una respuesta citotóxica eficiente basada en linfocitos T CD8+. Esta respuesta puede proporcionar cierta protección frente a la infección, a pesar de lo cual un 10% de estos pacientes presentará una infección de brecha severa o crítica al completar la pauta de vacunación.
4. La respuesta temprana tras la primera dosis en pacientes con MM y Alo-TPH muestra una seroconversión cercana al 40%, con unos resultados de citotoxicidad celular directa similar a los donantes sanos. La baja reactividad de las poblaciones citotóxicas parece compensarse con un aumento de las poblaciones de linfocitos CD8+, células NK y linfocitos T $\gamma\delta$ permitiendo un control de la replicación viral en células infectadas por SARS-CoV-2.
5. Los pacientes que reciben un trasplante de médula ósea habiendo sido previamente vacunados presentan una respuesta humoral mejor y más estable tras el trasplante que aquellos que lo reciben tras haber pasado la infección. La respuesta celular se encuentra globalmente disminuida en estos pacientes, especialmente en aquellos que van a recibir un Alo-TPH.
6. Administrar una dosis booster de la vacuna mejora la respuesta humoral en pacientes en los que ha pasado un año desde que recibieron su última dosis de rituximab, a pesar de que en ellos puedan predominar todavía subpoblaciones B inmaduras.
7. Nuestra experiencia en relación con la tasa de infección de brecha y una mortalidad inferior al 1,5%, confirman que la vacunación es beneficiosa en estos pacientes a pesar de la disfunción inmune global que presentan.

8

REFERENCIAS

1. WHO-China, J. *WHO-convened Global Study of Origins of SARS-CoV-2: China Part*; WHO: Online, 2021; p. 120.
2. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias; Dirección General de Salud Pública, C.e.I. *ENFERMEDAD POR NUEVO CORONAVIRUS, COVID-19*; Gobierno de España: Online, 2020.
3. Huang, C.; Wang, Y.; Li, X.; Ren, L.; Zhao, J.; Hu, Y.; Zhang, L.; Fan, G.; Xu, J.; Gu, X.; et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* **2020**, *395*, 497-506, doi:10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
4. Hu, B.; Guo, H.; Zhou, P.; Shi, Z.L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* **2021**, *19*, 141-154, doi:10.1038/s41579-020-00459-7.
5. (2005), C.d.E.d.R.S.I. Declaración sobre la segunda reunión del Comité de Emergencias del Reglamento Sanitario Internacional (2005) acerca del brote del nuevo coronavirus (2019-nCoV). 2020.
6. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of, V. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* **2020**, *5*, 536-544, doi:10.1038/s41564-020-0695-z.
7. MINISTERIO DE LA PRESIDENCIA, R.C.L.C.Y.M.D.T. Real Decreto 463/2020, de 14 de marzo, por el que se declara el estado de alarma para la gestión de la situación de crisis sanitaria ocasionada por el COVID-19. **2020**, *67*, 25390-25400.
8. Our-World-in-Data. Coronavirus (COVID-19) Cases. Available online: <https://ourworldindata.org/covid-cases> (accessed on 18/01/2023).
9. Wu, F.; Zhao, S.; Yu, B.; Chen, Y.M.; Wang, W.; Song, Z.G.; Hu, Y.; Tao, Z.W.; Tian, J.H.; Pei, Y.Y.; et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* **2020**, *579*, 265-269, doi:10.1038/s41586-020-2008-3.
10. Wang, M.Y.; Zhao, R.; Gao, L.J.; Gao, X.F.; Wang, D.P.; Cao, J.M. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front Cell Infect Microbiol* **2020**, *10*, 587269, doi:10.3389/fcimb.2020.587269.
11. Yang, H.; Rao, Z. Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. *Nat Rev Microbiol* **2021**, *19*, 685-700, doi:10.1038/s41579-021-00630-8.
12. Belouzard, S.; Millet, J.K.; Licitra, B.N.; Whittaker, G.R. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses* **2012**, *4*, 1011-1033, doi:10.3390/v4061011.
13. Weiss, S.R.; Navas-Martin, S. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiol Mol Biol Rev* **2005**, *69*, 635-664, doi:10.1128/MMBR.69.4.635-664.2005.
14. Brant, A.C.; Tian, W.; Majerciak, V.; Yang, W.; Zheng, Z.M. SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication. *Cell Biosci* **2021**, *11*, 136, doi:10.1186/s13578-021-00643-z.
15. Lu, R.; Zhao, X.; Li, J.; Niu, P.; Yang, B.; Wu, H.; Wang, W.; Song, H.; Huang, B.; Zhu, N.; et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* **2020**, *395*, 565-574, doi:10.1016/S0140-6736(20)30251-8.

16. To, K.K.; Hung, I.F.; Chan, J.F.; Yuen, K.Y. From SARS coronavirus to novel animal and human coronaviruses. *J Thorac Dis* **2013**, *5 Suppl 2*, S103-108, doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2013.06.02.
17. Sharma, A.; Ahmad Farouk, I.; Lal, S.K. COVID-19: A Review on the Novel Coronavirus Disease Evolution, Transmission, Detection, Control and Prevention. *Viruses* **2021**, *13*, doi:10.3390/v13020202.
18. Osuchowski, M.F.; Winkler, M.S.; Skirecki, T.; Cajander, S.; Shankar-Hari, M.; Lachmann, G.; Monneret, G.; Venet, F.; Bauer, M.; Brunkhorst, F.M.; et al. The COVID-19 puzzle: deciphering pathophysiology and phenotypes of a new disease entity. *Lancet Respir Med* **2021**, *9*, 622-642, doi:10.1016/S2213-2600(21)00218-6.
19. Hoffmann, M.; Kleine-Weber, H.; Schroeder, S.; Kruger, N.; Herrler, T.; Erichsen, S.; Schiergens, T.S.; Herrler, G.; Wu, N.H.; Nitsche, A.; et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* **2020**, *181*, 271-280 e278, doi:10.1016/j.cell.2020.02.052.
20. Wan, Y.; Shang, J.; Graham, R.; Baric, R.S.; Li, F. Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. *J Virol* **2020**, *94*, doi:10.1128/JVI.00127-20.
21. Shang, J.; Ye, G.; Shi, K.; Wan, Y.; Luo, C.; Aihara, H.; Geng, Q.; Auerbach, A.; Li, F. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature* **2020**, *581*, 221-224, doi:10.1038/s41586-020-2179-y.
22. Sungnak, W.; Huang, N.; Becavin, C.; Berg, M.; Queen, R.; Litvinukova, M.; Talavera-Lopez, C.; Matz, H.; Reichart, D.; Sampaziotis, F.; et al. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nat Med* **2020**, *26*, 681-687, doi:10.1038/s41591-020-0868-6.
23. Ruan, Q.; Yang, K.; Wang, W.; Jiang, L.; Song, J. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Med* **2020**, *46*, 846-848, doi:10.1007/s00134-020-05991-x.
24. O'Driscoll, M.; Ribeiro Dos Santos, G.; Wang, L.; Cummings, D.A.T.; Azman, A.S.; Paireau, J.; Fontanet, A.; Cauchemez, S.; Salje, H. Age-specific mortality and immunity patterns of SARS-CoV-2. *Nature* **2021**, *590*, 140-145, doi:10.1038/s41586-020-2918-0.
25. Williamson, E.J.; Walker, A.J.; Bhaskaran, K.; Bacon, S.; Bates, C.; Morton, C.E.; Curtis, H.J.; Mehrkar, A.; Evans, D.; Inglesby, P.; et al. Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY. *Nature* **2020**, *584*, 430-436, doi:10.1038/s41586-020-2521-4.
26. Vigon, L.; Fuertes, D.; Garcia-Perez, J.; Torres, M.; Rodriguez-Mora, S.; Mateos, E.; Corona, M.; Saez-Marin, A.J.; Malo, R.; Navarro, C.; 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*, 665329, doi:10.3389/fimmu.2021.665329.
27. Hu, B.; Huang, S.; Yin, L. The cytokine storm and COVID-19. *J Med Virol* **2021**, *93*, 250-256, doi:10.1002/jmv.26232.

28. Hadjadj, J.; Yatim, N.; Barnabei, L.; Corneau, A.; Boussier, J.; Smith, N.; Pere, H.; Charbit, B.; Bondet, V.; Chenevier-Gobeaux, C.; et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science* **2020**, *369*, 718-724, doi:10.1126/science.abc6027.
29. Ziegler, C.G.K.; Miao, V.N.; Owings, A.H.; Navia, A.W.; Tang, Y.; Bromley, J.D.; Lotfy, P.; Sloan, M.; Laird, H.; Williams, H.B.; et al. Impaired local intrinsic immunity to SARS-CoV-2 infection in severe COVID-19. *Cell* **2021**, *184*, 4713-4733 e4722, doi:10.1016/j.cell.2021.07.023.
30. Lamers, M.M.; Haagmans, B.L. SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* **2022**, *20*, 270-284, doi:10.1038/s41579-022-00713-0.
31. Hirano, T.; Murakami, M. COVID-19: A New Virus, but a Familiar Receptor and Cytokine Release Syndrome. *Immunity* **2020**, *52*, 731-733, doi:10.1016/j.immuni.2020.04.003.
32. Eguchi, S.; Kawai, T.; Scalia, R.; Rizzo, V. Understanding Angiotensin II Type 1 Receptor Signaling in Vascular Pathophysiology. *Hypertension* **2018**, *71*, 804-810, doi:10.1161/HYPERTENSIONA-HA.118.10266.
33. Liu, J.; Li, S.; Liu, J.; Liang, B.; Wang, X.; Wang, H.; Li, W.; Tong, Q.; Yi, J.; Zhao, L.; et al. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *EBioMedicine* **2020**, *55*, 102763, doi:10.1016/j.ebiom.2020.102763.
34. Chen, G.; Wu, D.; Guo, W.; Cao, Y.; Huang, D.; Wang, H.; Wang, T.; Zhang, X.; Chen, H.; Yu, H.; et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J Clin Invest* **2020**, *130*, 2620-2629, doi:10.1172/JCI137244.
35. Rha, M.S.; Jeong, H.W.; Ko, J.H.; Choi, S.J.; Seo, I.H.; Lee, J.S.; Sa, M.; Kim, A.R.; Joo, E.J.; Ahn, J.Y.; et al. PD-1-Expressing SARS-CoV-2-Specific CD8(+) T Cells Are Not Exhausted, but Functional in Patients with COVID-19. *Immunity* **2021**, *54*, 44-52 e43, doi:10.1016/j.immuni.2020.12.002.
36. Zheng, M.; Gao, Y.; Wang, G.; Song, G.; Liu, S.; Sun, D.; Xu, Y.; Tian, Z. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol* **2020**, *17*, 533-535, doi:10.1038/s41423-020-0402-2.
37. Law, H.K.; Cheung, C.Y.; Ng, H.Y.; Sia, S.F.; Chan, Y.O.; Luk, W.; Nicholls, J.M.; Peiris, J.S.; Lau, Y.L. Chemokine up-regulation in SARS-coronavirus-infected, monocyte-derived human dendritic cells. *Blood* **2005**, *106*, 2366-2374, doi:10.1182/blood-2004-10-4166.
38. Zhang, Y.; Zeng, X.; Jiao, Y.; Li, Z.; Liu, Q.; Ye, J.; Yang, M. Mechanisms involved in the development of thrombocytopenia in patients with COVID-19. *Thromb Res* **2020**, *193*, 110-115, doi:10.1016/j.thromres.2020.06.008.
39. De Biasi, S.; Meschiari, M.; Gibellini, L.; Bellinazzi, C.; Borella, R.; Fidanza, L.; Gozzi, L.; Iannone, A.; Lo Tartaro, D.; Mattioli, M.; et al. Marked T cell activation, senescence, exhaustion and skewing towards TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. *Nat Commun* **2020**, *11*, 3434, doi:10.1038/s41467-020-17292-4.
40. Wang, F.; Nie, J.; Wang, H.; Zhao, Q.; Xiong, Y.; Deng, L.; Song, S.; Ma, Z.; Mo, P.; Zhang, Y. Characteristics of Peripheral Lymphocyte Subset Alteration in COVID-19 Pneumonia. *J Infect Dis* **2020**, *221*, 1762-1769, doi:10.1093/infdis/jiaa150.

41. Bange, E.M.; Han, N.A.; Wileyto, P.; Kim, J.Y.; Gouma, S.; Robinson, J.; Greenplate, A.R.; Porterfield, F.; Owoyemi, O.; Naik, K.; et al. CD8 T cells compensate for impaired humoral immunity in COVID-19 patients with hematologic cancer. *Res Sq* **2021**, doi:10.21203/rs.3.rs-162289/v1.
42. Obi, A.T.; Barnes, G.D.; Napolitano, L.M.; Henke, P.K.; Wakefield, T.W. Venous thrombosis epidemiology, pathophysiology, and anticoagulant therapies and trials in severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord* **2021**, *9*, 23-35, doi:10.1016/j.jvsv.2020.08.030.
43. Owens, A.P., 3rd; Mackman, N. Tissue factor and thrombosis: The clot starts here. *Thromb Haemost* **2010**, *104*, 432-439, doi:10.1160/TH09-11-0771.
44. Kenawy, H.I.; Boral, I.; Bevington, A. Complement-Coagulation Cross-Talk: A Potential Mediator of the Physiological Activation of Complement by Low pH. *Front Immunol* **2015**, *6*, 215, doi:10.3389/fimmu.2015.00215.
45. Klok, F.A.; Kruij, M.; van der Meer, N.J.M.; Arbous, M.S.; Gommers, D.; Kant, K.M.; Kaptein, F.H.J.; van Paassen, J.; Stals, M.A.M.; Huisman, M.V.; et al. Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thromb Res* **2020**, *191*, 145-147, doi:10.1016/j.thromres.2020.04.013.
46. Klok, F.A.; Kruij, M.; van der Meer, N.J.M.; Arbous, M.S.; Gommers, D.; Kant, K.M.; Kaptein, F.H.J.; van Paassen, J.; Stals, M.A.M.; Huisman, M.V.; et al. Confirmation of the high cumulative incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19: An updated analysis. *Thromb Res* **2020**, *191*, 148-150, doi:10.1016/j.thromres.2020.04.041.
47. Sadegh Beigee, F.; Pourabdollah Toutkaboni, M.; Khalili, N.; Nadji, S.A.; Dorudinia, A.; Rezaei, M.; Askari, E.; Farzanegan, B.; Marjani, M.; Rafiezadeh, A. Diffuse alveolar damage and thrombotic microangiopathy are the main histopathological findings in lung tissue biopsy samples of COVID-19 patients. *Pathol Res Pract* **2020**, *216*, 153228, doi:10.1016/j.prp.2020.153228.
48. Carsana, L.; Sonzogni, A.; Nasr, A.; Rossi, R.S.; Pellegrinelli, A.; Zerbi, P.; Rech, R.; Colombo, R.; Antinori, S.; Corbellino, M.; et al. Pulmonary post-mortem findings in a series of COVID-19 cases from northern Italy: a two-centre descriptive study. *Lancet Infect Dis* **2020**, *20*, 1135-1140, doi:10.1016/S1473-3099(20)30434-5.
49. Bellani, G.; Laffey, J.G.; Pham, T.; Fan, E.; Brochard, L.; Esteban, A.; Gattinoni, L.; van Haren, F.; Larsson, A.; McAuley, D.F.; et al. Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries. *JAMA* **2016**, *315*, 788-800, doi:10.1001/jama.2016.0291.
50. Meyer, N.J.; Gattinoni, L.; Calfee, C.S. Acute respiratory distress syndrome. *Lancet* **2021**, *398*, 622-637, doi:10.1016/S0140-6736(21)00439-6.
51. Force, A.D.T.; Ranieri, V.M.; Rubenfeld, G.D.; Thompson, B.T.; Ferguson, N.D.; Caldwell, E.; Fan, E.; Camporota, L.; Slutsky, A.S. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA* **2012**, *307*, 2526-2533, doi:10.1001/jama.2012.5669.

52. Byambasuren, O.; Cardona, M.; Bell, K.; Clark, J.; McLaws, M.L.; Glasziou, P. Estimating the extent of asymptomatic COVID-19 and its potential for community transmission: Systematic review and meta-analysis. *J Assoc Med Microbiol Infect Dis Can* **2020**, *5*, 223-234, doi:10.3138/jammi-2020-0030.
53. Buitrago-Garcia, D.; Egli-Gany, D.; Counotte, M.J.; Hossmann, S.; Imeri, H.; Ipekci, A.M.; Salanti, G.; Low, N. Occurrence and transmission potential of asymptomatic and presymptomatic SARS-CoV-2 infections: A living systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* **2020**, *17*, e1003346, doi:10.1371/journal.pmed.1003346.
54. Salud, O.M.d.I. Manejo clínico de la COVID-19. Available online: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/340629/WHO-2019-nCoV-clinical-2021.1-spa.pdf> (accessed on 07/02/2023).
55. Vijenthira, A.; Gong, I.Y.; Fox, T.A.; Booth, S.; Cook, G.; Fattizzo, B.; Martin-Moro, F.; Razanamahery, J.; Riches, J.C.; Zwicker, J.; et al. Outcomes of patients with hematologic malignancies and COVID-19: a systematic review and meta-analysis of 3377 patients. *Blood* **2020**, *136*, 2881-2892, doi:10.1182/blood.2020008824.
56. He, W.; Chen, L.; Chen, L.; Yuan, G.; Fang, Y.; Chen, W.; Wu, D.; Liang, B.; Lu, X.; Ma, Y.; et al. COVID-19 in persons with haematological cancers. *Leukemia* **2020**, *34*, 1637-1645, doi:10.1038/s41375-020-0836-7.
57. Fung, M.; Babik, J.M. COVID-19 in Immunocompromised Hosts: What We Know So Far. *Clin Infect Dis* **2021**, *72*, 340-350, doi:10.1093/cid/ciaa863.
58. Martin-Moro, F.; Marquet, J.; Piris, M.; Michael, B.M.; Saez, A.J.; Corona, M.; Jimenez, C.; Astibia, B.; Garcia, I.; Rodriguez, E.; et al. Survival study of hospitalised patients with concurrent COVID-19 and haematological malignancies. *Br J Haematol* **2020**, *190*, e16-e20, doi:10.1111/bjh.16801.
59. Burger, J.A.; Tedeschi, A.; Barr, P.M.; Robak, T.; Owen, C.; Ghia, P.; Bairey, O.; Hillmen, P.; Bartlett, N.L.; Li, J.; et al. Ibrutinib as Initial Therapy for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* **2015**, *373*, 2425-2437, doi:10.1056/NEJMoa1509388.
60. Mato, A.R.; Roeker, L.E.; Lamanna, N.; Allan, J.N.; Leslie, L.; Pagel, J.M.; Patel, K.; Osterborg, A.; Wojenski, D.; Kamdar, M.; et al. Outcomes of COVID-19 in patients with CLL: a multicenter international experience. *Blood* **2020**, *136*, 1134-1143, doi:10.1182/blood.2020006965.
61. Scarfo, L.; Chatzikonstantinou, T.; Rigolin, G.M.; Quaresmini, G.; Motta, M.; Vitale, C.; Garcia-Marco, J.A.; Hernandez-Rivas, J.A.; Miras, F.; Baile, M.; et al. COVID-19 severity and mortality in patients with chronic lymphocytic leukemia: a joint study by ERIC, the European Research Initiative on CLL, and CLL Campus. *Leukemia* **2020**, *34*, 2354-2363, doi:10.1038/s41375-020-0959-x.
62. Mahon, F.X.; Rea, D.; Guilhot, J.; Guilhot, F.; Huguet, F.; Nicolini, F.; Legros, L.; Charbonnier, A.; Guerci, A.; Varet, B.; et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol* **2010**, *11*, 1029-1035, doi:10.1016/S1470-2045(10)70233-3.
63. Campiotti, L.; Suter, M.B.; Guasti, L.; Piazza, R.; Gambacorti-Passerini, C.; Grandi, A.M.; Squizzato, A. Imatinib discontinuation in chronic myeloid leukaemia patients with undetectable BCR-ABL transcript level: A systematic review and a meta-analysis. *Eur J Cancer* **2017**, *77*, 48-56, doi:10.1016/j.ejca.2017.02.028.

64. Hernandez-Boluda, J.C.; Pereira, A.; Pastor-Galan, I.; Alvarez-Larran, A.; Savchuk, A.; Puerta, J.M.; Sanchez-Pina, J.M.; Collado, R.; Diaz-Gonzalez, A.; Angona, A.; et al. Feasibility of treatment discontinuation in chronic myeloid leukemia in clinical practice: results from a nationwide series of 236 patients. *Blood Cancer J* **2018**, *8*, 91, doi:10.1038/s41408-018-0125-0.
65. Hochhaus, A.; Baccarani, M.; Silver, R.T.; Schiffer, C.; Apperley, J.F.; Cervantes, F.; Clark, R.E.; Cortes, J.E.; Deininger, M.W.; Guilhot, F.; et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **2020**, *34*, 966-984, doi:10.1038/s41375-020-0776-2.
66. Breccia, M.; Abruzzese, E.; Accurso, V.; Attolico, I.; Barulli, S.; Bergamaschi, M.; Binotto, G.; Bocchia, M.; Bonifacio, M.; Caocci, G.; et al. COVID-19 infection in chronic myeloid leukaemia after one year of the pandemic in Italy. A Campus CML report. *Br J Haematol* **2022**, *196*, 559-565, doi:10.1111/bjh.17890.
67. Garcia-Suarez, J.; de la Cruz, J.; Cedillo, A.; Llamas, P.; Duarte, R.; Jimenez-Yuste, V.; Hernandez-Rivas, J.A.; Gil-Manso, R.; Kwon, M.; Sanchez-Godoy, P.; et al. Impact of hematologic malignancy and type of cancer therapy on COVID-19 severity and mortality: lessons from a large population-based registry study. *J Hematol Oncol* **2020**, *13*, 133, doi:10.1186/s13045-020-00970-7.
68. de la Rubia, J.M., MV, Blade, J; et al. *Guía de Mieloma Múltiple. Grupo Español de Mieloma; Luzán5: 2021.*
69. Chari, A.; Samur, M.K.; Martinez-Lopez, J.; Cook, G.; Biran, N.; Yong, K.; Hungria, V.; Engelhardt, M.; Gay, F.; Garcia Fera, A.; et al. Clinical features associated with COVID-19 outcome in multiple myeloma: first results from the International Myeloma Society data set. *Blood* **2020**, *136*, 3033-3040, doi:10.1182/blood.2020008150.
70. Hultcrantz, M.; Richter, J.; Rosenbaum, C.A.; Patel, D.; Smith, E.L.; Korde, N.; Lu, S.X.; Mailankody, S.; Shah, U.A.; Lesokhin, A.M.; et al. COVID-19 Infections and Clinical Outcomes in Patients with Multiple Myeloma in New York City: A Cohort Study from Five Academic Centers. *Blood Cancer Discov* **2020**, *1*, 234-243, doi:10.1158/2643-3230.BCD-20-0102.
71. Martinez-Lopez, J.; Mateos, M.V.; Encinas, C.; Sureda, A.; Hernandez-Rivas, J.A.; Lopez de la Guia, A.; Conde, D.; Krsnik, I.; Prieto, E.; Rianza Grau, R.; et al. Multiple myeloma and SARS-CoV-2 infection: clinical characteristics and prognostic factors of inpatient mortality. *Blood Cancer J* **2020**, *10*, 103, doi:10.1038/s41408-020-00372-5.
72. Ljungman, P.; de la Camara, R.; Mikulska, M.; Tridello, G.; Aguado, B.; Zahrani, M.A.; Apperley, J.; Berceanu, A.; Bofarull, R.M.; Calbacho, M.; et al. COVID-19 and stem cell transplantation; results from an EBMT and GETH multicenter prospective survey. *Leukemia* **2021**, *35*, 2885-2894, doi:10.1038/s41375-021-01302-5.
73. Sharma, A.; Bhatt, N.S.; St Martin, A.; Abid, M.B.; Bloomquist, J.; Chemaly, R.F.; Dandoy, C.; Gauthier, J.; Gowda, L.; Perales, M.A.; et al. Clinical characteristics and outcomes of COVID-19 in haematopoietic stem-cell transplantation recipients: an observational cohort study. *Lancet Haematol* **2021**, *8*, e185-e193, doi:10.1016/S2352-3026(20)30429-4.
74. Levavi, H.; Lancman, G.; Gabrilove, J. Impact of rituximab on COVID-19 outcomes. *Ann Hematol* **2021**, *100*, 2805-2812, doi:10.1007/s00277-021-04662-1.

75. Avouac, J.; Drumez, E.; Hachulla, E.; Seror, R.; Georgin-Lavialle, S.; El Mahou, S.; Pertuiset, E.; Pham, T.; Marotte, H.; Servettaz, A.; et al. COVID-19 outcomes in patients with inflammatory rheumatic and musculoskeletal diseases treated with rituximab: a cohort study. *Lancet Rheumatol* **2021**, *3*, e419-e426, doi:10.1016/S2665-9913(21)00059-X.
76. BOE. Acuerdo entre la Comisión Europea y los Estados miembros sobre vacunas contra la COVID-19, hecho en Madrid el 20 de julio de 2020. **2020**.
77. sanitarios, A.e.d.m.y.p. Ficha técnica o resumen de las características del producto (Comirnaty 30 microgrmos). Available online: https://cima.aemps.es/cima/pdfs/ft/1201528004/FT_1201528004.pdf (accessed on 04/02/2023).
78. Polack, F.P.; Thomas, S.J.; Kitchin, N.; Absalon, J.; Gurtman, A.; Lockhart, S.; Perez, J.L.; Perez Marc, G.; Moreira, E.D.; Zerbini, C.; et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med* **2020**, *383*, 2603-2615, doi:10.1056/NEJMoa2034577.
79. agency, E.m. Comirnaty. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/comirnaty> (accessed on 04/02/2023).
80. agency, E.m. Ficha Técnica o resumen de las características del producto (Spikevax). Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/spikevax-previously-covid-19-vaccine-moderna-epar-product-information_es.pdf (accessed on 04/02/2023).
81. Baden, L.R.; El Sahly, H.M.; Essink, B.; Kotloff, K.; Frey, S.; Novak, R.; Diemert, D.; Spector, S.A.; Rouphael, N.; Creech, C.B.; et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med* **2021**, *384*, 403-416, doi:10.1056/NEJMoa2035389.
82. Agency, E.M. Spikevax (previously COVID-19 Vaccine Moderna). Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/spikevax> (accessed on 04/02/2023).
83. Agency, E.M. Ficha técnica o resumen de las características del producto (Vaxzevria). Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/vaxzevria-previously-covid-19-vaccine-astrazeneca-epar-product-information_es.pdf (accessed on 04/02/2023).
84. Sadoff, J.; Gray, G.; Vandebosch, A.; Cardenas, V.; Shukarev, G.; Grinsztejn, B.; Goepfert, P.A.; Truylers, C.; Fennema, H.; Spiessens, B.; et al. Safety and Efficacy of Single-Dose Ad26.COV2.S Vaccine against Covid-19. *N Engl J Med* **2021**, *384*, 2187-2201, doi:10.1056/NEJMoa2101544.
85. Falsey, A.R.; Sobieszczyk, M.E.; Hirsch, I.; Sproule, S.; Robb, M.L.; Corey, L.; Neuzil, K.M.; Hahn, W.; Hunt, J.; Mulligan, M.J.; et al. Phase 3 Safety and Efficacy of AZD1222 (ChAdOx1 nCoV-19) Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med* **2021**, *385*, 2348-2360, doi:10.1056/NEJMoa2105290.
86. sanitarios, A.E.d.M.y.p. Ficha Técnica o resumen de las características del producto (Jcovden). Available online: https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/1201525001/FT_1201525001.pdf (accessed on 04/02/2023).
87. WHO. COVID-19 Vaccines with WHO Emergency Use Listing. Available online: <https://extranet.who.int/pqweb/vaccines/vaccinescovid-19-vaccine-eul-issued> (accessed on 25/04/2023).

88. SANIDAD, D.n.G.d.S.P.b.C.A.D. Documento técnico de vacunación frente a COVID-19 en la Comunidad de Madrid. Available online: https://www.comunidad.madrid/sites/default/files/doc/sanidad/prev_doc_tecnico_vacunacion_covid-19.pdf (accessed on 06/02/2023).
89. Jeff A, R.C., Fareed K, Genovefa P, Josh H, Kanter J, et al. ASH-ASTCT COVID-19 and Vaccines: Frequently Asked Questions. Covid-19 Resources. Available online: <https://www.hematology.org/covid-19/ash-astct-covid-19-and-vaccines>. (accessed on
90. Network, N.C.C. NCCN Shares New Guidance Principles for Vaccinating People with Cancer Against COVID-19. Available online: <https://www.prnewswire.com/news-releases/nccn-shares-new-guidance-principles-for-vaccinating-people-with-cancer-against-covid-19-301213154.html>. (accessed on 06/02/2023).
91. Oncology, E.S.f.M. COVID-19 vaccination in cancer patients: ESMO statements. Available online: <https://www.esmo.org/covid-19-and-cancer/covid-19-vaccination>. (accessed on 06/02/2023).
92. Sociedad española de Hematología y Hemoterapia, S.E.d.Ty.H. Recomendaciones de Vacunación COVID-19 en el paciente hematológico. Available online: <https://www.sehh.es/covid-19/vacunacion/124452-recomendaciones-vacuna-covid-19-en-paciente-hematologico> (accessed on 06/02/2023).
93. Shu, Y.; McCauley, J. GISAID: Global initiative on sharing all influenza data - from vision to reality. *Euro Surveill* **2017**, *22*, doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.13.30494.
94. Sanidad, M.d. Enfermedad por nuevo coronavirus, COVID-19. Situación actual. Available online: <https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/situacion-Actual.htm> (accessed on 21/03/2023).
95. Barbeau, D.J.; Martin, J.M.; Carney, E.; Dougherty, E.; Doyle, J.D.; Dermody, T.S.; Hoberman, A.; Williams, J.V.; Michaels, M.G.; Alcorn, J.F.; et al. Comparative analysis of human immune responses following SARS-CoV-2 vaccination with BNT162b2, mRNA-1273, or Ad26.COV2.S. *NPJ Vaccines* **2022**, *7*, 77, doi:10.1038/s41541-022-00504-x.
96. Florentino, P.T.V.; Alves, F.J.O.; Cerqueira-Silva, T.; Oliveira, V.A.; Junior, J.B.S.; Jantsch, A.G.; Penna, G.O.; Boaventura, V.; Werneck, G.L.; Rodrigues, L.C.; et al. Vaccine effectiveness of CoronaVac against COVID-19 among children in Brazil during the Omicron period. *Nat Commun* **2022**, *13*, 4756, doi:10.1038/s41467-022-32524-5.
97. Ssentongo, P.; Ssentongo, A.E.; Voleti, N.; Groff, D.; Sun, A.; Ba, D.M.; Nunez, J.; Parent, L.J.; Chinchilli, V.M.; Paules, C.I. SARS-CoV-2 vaccine effectiveness against infection, symptomatic and severe COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* **2022**, *22*, 439, doi:10.1186/s12879-022-07418-y.
98. Kerr, S.; Vasileiou, E.; Robertson, C.; Sheikh, A. COVID-19 vaccine effectiveness against symptomatic SARS-CoV-2 infection and severe COVID-19 outcomes from Delta AY.4.2: Cohort and test-negative study of 5.4 million individuals in Scotland. *J Glob Health* **2022**, *12*, 05025, doi:10.7189/jogh.12.05025.
99. Accorsi, E.K.; Britton, A.; Fleming-Dutra, K.E.; Smith, Z.R.; Shang, N.; Derado, G.; Miller, J.; Schrag, S.J.; Verani, J.R. Association Between 3 Doses of mRNA COVID-19 Vaccine and Symptomatic Infection Caused by the SARS-CoV-2 Omicron and Delta Variants. *JAMA* **2022**, *327*, 639-651, doi:10.1001/jama.2022.0470.

100. Chin, E.T.; Leidner, D.; Lamson, L.; Lucas, K.; Studdert, D.M.; Goldhaber-Fiebert, J.D.; Andrews, J.R.; Salomon, J.A. Protection against Omicron from Vaccination and Previous Infection in a Prison System. *N Engl J Med* **2022**, *387*, 1770-1782, doi:10.1056/NEJMoa2207082.
101. Andrews, N.; Stowe, J.; Kirsebom, F.; Toffa, S.; Rickeard, T.; Gallagher, E.; Gower, C.; Kall, M.; Groves, N.; O'Connell, A.M.; et al. Covid-19 Vaccine Effectiveness against the Omicron (B.1.1.529) Variant. *N Engl J Med* **2022**, *386*, 1532-1546, doi:10.1056/NEJMoa2119451.
102. ark G. Thompson, P.K.N., PhD2; Stephanie A. Irving, MHS; et al. Effectiveness of a Third Dose of mRNA Vaccines Against COVID-19—Associated Emergency Department and Urgent Care Encounters and Hospitalizations Among Adults During Periods of Delta and Omicron Variant Predominance — VISION Network, 10 States, August 2021–January 2022. Available online: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/71/wr/pdfs/mm7104e3-H.pdf> (accessed on 22/03/2023).
103. Amelia G. Johnson, D.A.B.A., PhD1; Akilah R. Ali, MPH; et al. COVID-19 Incidence and Death Rates Among Unvaccinated and Fully Vaccinated Adults with and Without Booster Doses During Periods of Delta and Omicron Variant Emergence — 25 U.S. Jurisdictions, April 4–December 25, 2021. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9351531/pdf/mm7104e2.pdf> (accessed on 22/03/2023).
104. Ludwig, H.; Boccadoro, M.; Moreau, P.; San-Miguel, J.; Cavo, M.; Pawlyn, C.; Zweegman, S.; Facon, T.; Driessen, C.; Hajek, R.; et al. Recommendations for vaccination in multiple myeloma: a consensus of the European Myeloma Network. *Leukemia* **2021**, *35*, 31-44, doi:10.1038/s41375-020-01016-0.
105. Branagan, A.R.; Duffy, E.; Albrecht, R.A.; Cooper, D.L.; Seropian, S.; Parker, T.L.; Gan, G.; Li, F.; Zelterman, D.; Boddupalli, C.S.; et al. Clinical and Serologic Responses After a Two-dose Series of High-dose Influenza Vaccine in Plasma Cell Disorders: A Prospective, Single-arm Trial. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* **2017**, *17*, 296-304 e292, doi:10.1016/j.clml.2017.02.025.
106. Mustafa, S.S.; Shah, D.; Bress, J.; Jamshed, S. Response to PCV13 vaccination in patients with multiple myeloma versus healthy controls. *Hum Vaccin Immunother* **2019**, *15*, 452-454, doi:10.1080/21645515.2018.1534516.
107. Shadman, M.; Ujjani, C. Vaccinations in CLL: implications for COVID-19. *Blood* **2021**, *137*, 144-146, doi:10.1182/blood.2020009966.
108. Sun, C.; Gao, J.; Couzens, L.; Tian, X.; Farooqui, M.Z.; Eichelberger, M.C.; Wiestner, A. Seasonal Influenza Vaccination in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia Treated With Ibrutinib. *JAMA Oncol* **2016**, *2*, 1656-1657, doi:10.1001/jamaoncol.2016.2437.
109. Douglas, A.P.; Trubiano, J.A.; Barr, I.; Leung, V.; Slavin, M.A.; Tam, C.S. Ibrutinib may impair serological responses to influenza vaccination. *Haematologica* **2017**, *102*, e397-e399, doi:10.3324/haematol.2017.164285.
110. Pleyer, C.; Ali, M.A.; Cohen, J.I.; Tian, X.; Soto, S.; Ahn, I.E.; Gaglione, E.M.; Nierman, P.; Marti, G.E.; Hesdorffer, C.; et al. Effect of Bruton tyrosine kinase inhibitor on efficacy of adjuvanted recombinant hepatitis B and zoster vaccines. *Blood* **2021**, *137*, 185-189, doi:10.1182/blood.2020008758.

111. Yri, O.E.; Torfoss, D.; Hungnes, O.; Tierens, A.; Waalen, K.; Nordoy, T.; Dudman, S.; Kilander, A.; Wader, K.F.; Ostenstad, B.; et al. Rituximab blocks protective serologic response to influenza A (H1N1) 2009 vaccination in lymphoma patients during or within 6 months after treatment. *Blood* **2011**, *118*, 6769-6771, doi:10.1182/blood-2011-08-372649.
112. de Lavallade, H.; Khoder, A.; Hart, M.; Sarvaria, A.; Sekine, T.; Alsuliman, A.; Mielke, S.; Bazeos, A.; Stringaris, K.; Ali, S.; et al. Tyrosine kinase inhibitors impair B-cell immune responses in CML through off-target inhibition of kinases important for cell signaling. *Blood* **2013**, *122*, 227-238, doi:10.1182/blood-2012-11-465039.
113. Vigon, L.; Rodriguez-Mora, S.; Luna, A.; Sandonis, V.; Mateos, E.; Bautista, G.; Steegmann, J.L.; Climent, N.; Plana, M.; Perez-Romero, P.; et al. Cytotoxic cell populations developed during treatment with tyrosine kinase inhibitors protect autologous CD4+ T cells from HIV-1 infection. *Biochem Pharmacol* **2020**, *182*, 114203, doi:10.1016/j.bcp.2020.114203.
114. Vigon, L.; Luna, A.; Galan, M.; Rodriguez-Mora, S.; Fuertes, D.; Mateos, E.; Piris-Villaespesa, M.; Bautista, G.; San Jose, E.; Rivera-Torres, J.; et al. Identification of Immunological Parameters as Predictive Biomarkers of Relapse in Patients with Chronic Myeloid Leukemia on Treatment-Free Remission. *J Clin Med* **2020**, *10*, doi:10.3390/jcm10010042.
115. Cordonnier, C.; Einarsdottir, S.; Cesaro, S.; Di Blasi, R.; Mikulska, M.; Rieger, C.; de Lavallade, H.; Gallo, G.; Lehrnbecher, T.; Engelhard, D.; et al. Vaccination of haemopoietic stem cell transplant recipients: guidelines of the 2017 European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL 7). *Lancet Infect Dis* **2019**, *19*, e200-e212, doi:10.1016/S1473-3099(18)30600-5.
116. Cordonnier, C.; Labopin, M.; Chesnel, V.; Ribaud, P.; Camara Rde, L.; Martino, R.; Ullmann, A.J.; Parkkali, T.; Locasciulli, A.; Yakouben, K.; et al. Immune response to the 23-valent polysaccharide pneumococcal vaccine after the 7-valent conjugate vaccine in allogeneic stem cell transplant recipients: results from the EBMT IDWP01 trial. *Vaccine* **2010**, *28*, 2730-2734, doi:10.1016/j.vaccine.2010.01.025.
117. Avetisyan, G.; Aschan, J.; Hassan, M.; Ljungman, P. Evaluation of immune responses to seasonal influenza vaccination in healthy volunteers and in patients after stem cell transplantation. *Transplantation* **2008**, *86*, 257-263, doi:10.1097/TP.0b013e3181772a75.
118. Natori, Y.; Humar, A.; Lipton, J.; Kim, D.D.; Ashton, P.; Hoschler, K.; Kumar, D. A pilot randomized trial of adjuvanted influenza vaccine in adult allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* **2017**, *52*, 1016-1021, doi:10.1038/bmt.2017.24.
119. Pinana, J.L.; Perez, A.; Montoro, J.; Gimenez, E.; Gomez, M.D.; Lorenzo, I.; Madrid, S.; Gonzalez, E.M.; Vinuesa, V.; Hernandez-Boluda, J.C.; et al. Clinical Effectiveness of Influenza Vaccination After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Cross-sectional, Prospective, Observational Study. *Clin Infect Dis* **2019**, *68*, 1894-1903, doi:10.1093/cid/ciy792.
120. Vigon, L.; Galan, M.; Torres, M.; Martin-Galiano, A.J.; Rodriguez-Mora, S.; Mateos, E.; Corona, M.; Malo, R.; Navarro, C.; Murciano-Anton, M.A.; et al. Association between HLA-C alleles and COVID-19 severity in a pilot study with a Spanish Mediterranean Caucasian cohort. *PLoS One* **2022**, *17*, e0272867, doi:10.1371/journal.pone.0272867.

121. Casado-Fernandez, G.; Corona, M.; Torres, M.; Saez, A.J.; Ramos-Martin, F.; Manzanares, M.; Vigon, L.; Mateos, E.; Pozo, F.; Casas, I.; et al. Sustained Cytotoxic Response of Peripheral Blood Mononuclear Cells from Unvaccinated Individuals Admitted to the ICU Due to Critical COVID-19 Is Essential to Avoid a Fatal Outcome. *Int J Environ Res Public Health* **2023**, *20*, doi:10.3390/ijerph20031947.
122. Vigon, L.; Sanchez-Tornero, A.; Rodriguez-Mora, S.; Garcia-Perez, J.; Corona de Lapuerta, M.; Perez-Lamas, L.; Casado-Fernandez, G.; Moreno, G.; Torres, M.; Mateos, E.; et al. Strong Cellular Immune Response, but Not Humoral, against SARS-CoV-2 in Oncohematological Patients with Autologous Stem Cell Transplantation after Natural Infection. *J Clin Med* **2022**, *11*, doi:10.3390/jcm11082137.
123. Rodriguez-Mora, S.; Corona, M.; Torres, M.; Casado-Fernandez, G.; Garcia-Perez, J.; Ramos-Martin, F.; Vigon, L.; Manzanares, M.; Mateos, E.; Martin-Moro, F.; et al. Early Cellular and Humoral Responses Developed in Oncohematological Patients after Vaccination with One Dose against COVID-19. *J Clin Med* **2022**, *11*, doi:10.3390/jcm11102803.
124. Rodríguez-Mora, S.P.-L., L.; Sainero, M.S.; Torres, M.; Sánchez-Menéndez, C.; Corona, M.; Mateos, E.; Casado-Fernández, G.; Alcamí, J.; García-Pérez, J.; Pérez-Olmeda, M.; Murciano-Antón, M.A.; López-Jiménez, J.; García-Gutiérrez, V.; Coiras, M. Persistent Immunity against SARS-CoV-2 in Individuals with Oncohematological Diseases Who Underwent Autologous or Allogeneic Stem Cell Transplantation after Vaccination. *Cancers* **2023**, *15*, doi:doi:/10.3390/cancers15082344.
125. Torres, M.; Corona, M.; Rodriguez-Mora, S.; Casado-Fernandez, G.; Zurdo-Castronuno, A.; Mateos, E.; Ramos-Martin, F.; Sanchez-Menendez, C.; Murciano-Anton, M.A.; Garcia-Perez, J.; et al. Strong Humoral but Not Cellular Immune Responses against SARS-CoV-2 in Individuals with Oncohematological Disease Who Were Treated with Rituximab before Receiving a Vaccine Booster. *Cancers (Basel)* **2022**, *14*, doi:10.3390/cancers14225537.
126. Garcia-Perez, J.; Sanchez-Palomino, S.; Perez-Olmeda, M.; Fernandez, B.; Alcamí, 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*, 127-137, doi:10.1002/jmv.20770.
127. Ou, X.; Liu, Y.; Lei, X.; Li, P.; Mi, D.; Ren, L.; Guo, L.; Guo, R.; Chen, T.; Hu, J.; et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun* **2020**, *11*, 1620, doi:10.1038/s41467-020-15562-9.
128. Moir, S.; Buckner, C.M.; Ho, J.; Wang, W.; Chen, J.; Waldner, A.J.; Posada, J.G.; Kardava, L.; O'Shea, M.A.; Kottlilil, S.; et al. B cells in early and chronic HIV infection: evidence for preservation of immune function associated with early initiation of antiretroviral therapy. *Blood* **2010**, *116*, 5571-5579, doi:10.1182/blood-2010-05-285528.
129. Borobia, A.M.; Carcas, A.J.; Perez-Olmeda, M.; Castano, L.; Bertran, M.J.; Garcia-Perez, J.; Campins, M.; Portoles, A.; Gonzalez-Perez, M.; Garcia Morales, M.T.; et al. Immunogenicity and reactogenicity of BNT162b2 booster in ChAdOx1-S-primed participants (CombiVacS): a multicentre, open-label, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet* **2021**, *398*, 121-130, doi:10.1016/S0140-6736(21)01420-3.

130. Vigon, L.; Garcia-Perez, J.; Rodriguez-Mora, S.; Torres, M.; Mateos, E.; Castillo de la Osa, M.; Cervero, M.; Malo De Molina, R.; Navarro, C.; Murciano-Anton, M.A.; et al. Impaired Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in a Spanish Cohort of Patients With COVID-19 Admitted to the ICU. *Front Immunol* **2021**, *12*, 742631, doi:10.3389/fimmu.2021.742631.
131. Gudbjartsson, D.F.; Norddahl, G.L.; Melsted, P.; Gunnarsdottir, K.; Holm, H.; Eythorsson, E.; Arnthorsson, A.O.; Helgason, D.; Bjarnadottir, K.; Ingvarsson, R.F.; et al. Humoral Immune Response to SARS-CoV-2 in Iceland. *N Engl J Med* **2020**, *383*, 1724-1734, doi:10.1056/NEJMoa2026116.
132. Sasisekharan, V.; Pentakota, N.; Jayaraman, A.; Tharakaraman, K.; Wogan, G.N.; Narayanasami, U. Orthogonal immunoassays for IgG antibodies to SARS-CoV-2 antigens reveal that immune response lasts beyond 4 mo post illness onset. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2021**, *118*, doi:10.1073/pnas.2021615118.
133. Perez-Olmeda, M.; Saugar, J.M.; Fernandez-Garcia, A.; Perez-Gomez, B.; Pollan, M.; Avellon, A.; Pastor-Barriuso, R.; Fernandez-de Larrea, N.; Martin, M.; Cruz, I.; et al. Evolution of antibodies against SARS-CoV-2 over seven months: Experience of the nationwide seroprevalence ENE-COVID study in Spain. *J Clin Virol* **2022**, *149*, 105130, doi:10.1016/j.jcv.2022.105130.
134. Passamonti, F.; Cattaneo, C.; Arcaini, L.; Bruna, R.; Cavo, M.; Merli, F.; Angelucci, E.; Krampera, M.; Cairoli, R.; Della Porta, M.G.; et al. Clinical characteristics and risk factors associated with COVID-19 severity in patients with haematological malignancies in Italy: a retrospective, multicentre, cohort study. *Lancet Haematol* **2020**, *7*, e737-e745, doi:10.1016/S2352-3026(20)30251-9.
135. Jee, J.; Foote, M.B.; Lumish, M.; Stonestrom, A.J.; Wills, B.; Narendra, V.; Avutu, V.; Murciano-Goroff, Y.R.; Chan, J.E.; Derkach, A.; et al. Chemotherapy and COVID-19 Outcomes in Patients With Cancer. *J Clin Oncol* **2020**, *38*, 3538-3546, doi:10.1200/JCO.20.01307.
136. Herzog Tzarfati, K.; Gutwein, O.; Apel, A.; Rahimi-Levene, N.; Sadovnik, M.; Harel, L.; Benveniste-Levkovitz, P.; Bar Chaim, A.; Koren-Michowitz, M. BNT162b2 COVID-19 vaccine is significantly less effective in patients with hematologic malignancies. *Am J Hematol* **2021**, *96*, 1195-1203, doi:10.1002/ajh.26284.
137. Ludwig, H.; San-Miguel, J.; Munshi, N.; Sonneveld, P.; Mateos, M.V.; Moreau, P.; Terpos, E. Covid-19 vaccination in patients with multiple myeloma: Focus on immune response. *Am J Hematol* **2021**, *96*, 896-900, doi:10.1002/ajh.26263.
138. Perry, C.; Luttwak, E.; Balaban, R.; Shefer, G.; Morales, M.M.; Aharon, A.; Tabib, Y.; Cohen, Y.C.; Benyamini, N.; Beyar-Katz, O.; et al. Efficacy of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood Adv* **2021**, *5*, 3053-3061, doi:10.1182/bloodadvances.2021005094.
139. Avivi, I.; Balaban, R.; Shragai, T.; Sheffer, G.; Morales, M.; Aharon, A.; Lowenton-Spier, N.; Trestman, S.; Perry, C.; Benyamini, N.; et al. Humoral response rate and predictors of response to BNT162b2 mRNA COVID19 vaccine in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol* **2021**, *195*, 186-193, doi:10.1111/bjh.17608.
140. Cattaneo, C.; Cancelli, V.; Imberti, L.; Dobbs, K.; Sottini, A.; Pagani, C.; Belotti, A.; Re, A.; Anastasia, A.; Quaresima, V.; et al. Production and persistence of specific antibodies in COVID-19 patients with hematologic malignancies: role of rituximab. *Blood Cancer J* **2021**, *11*, 151, doi:10.1038/s41408-021-00546-9.

141. Ghione, P.; Gu, J.J.; Attwood, K.; Torca, P.; Goel, S.; Sundaram, S.; Mavis, C.; Johnson, M.; Thomas, R.; McWhite, K.; et al. Impaired humoral responses to COVID-19 vaccination in patients with lymphoma receiving B-cell-directed therapies. *Blood* **2021**, *138*, 811-814, doi:10.1182/blood.2021012443.
142. van der Maas, N.G.; Berghuis, D.; van der Burg, M.; Lankester, A.C. B Cell Reconstitution and Influencing Factors After Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Children. *Front Immunol* **2019**, *10*, 782, doi:10.3389/fimmu.2019.00782.
143. Seggewiss, R.; Einsele, H. Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood* **2010**, *115*, 3861-3868, doi:10.1182/blood-2009-12-234096.
144. Park, B.G.; Park, C.J.; Jang, S.; Chi, H.S.; Kim, D.Y.; Lee, J.H.; Lee, J.H.; Lee, K.H. Reconstitution of lymphocyte subpopulations after hematopoietic stem cell transplantation: comparison of hematologic malignancies and donor types in event-free patients. *Leuk Res* **2015**, *39*, 1334-1341, doi:10.1016/j.leukres.2015.09.010.
145. Williams, K.M.; Gress, R.E. Immune reconstitution and implications for immunotherapy following haematopoietic stem cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol* **2008**, *21*, 579-596, doi:10.1016/j.beha.2008.06.003.
146. Ogonek, J.; Kralj Juric, M.; Ghimire, S.; Varanasi, P.R.; Holler, E.; Greinix, H.; Weissinger, E. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol* **2016**, *7*, 507, doi:10.3389/fimmu.2016.00507.
147. Vsianska, P.; Rihova, L.; Varmuzova, T.; Suska, R.; Kryukov, F.; Mikulasova, A.; Kupska, R.; Penka, M.; Pour, L.; Adam, Z.; et al. Analysis of B-cell subpopulations in monoclonal gammopathies. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* **2015**, *15*, e61-71, doi:10.1016/j.clml.2014.12.003.
148. Kroger, N.; Zagrivnaja, M.; Schwartz, S.; Badbaran, A.; Zabelina, T.; Lioznov, M.; Ayuk, F.; Zander, A.; Fehse, B. Kinetics of plasma-cell chimerism after allogeneic stem cell transplantation by highly sensitive real-time PCR based on sequence polymorphism and its value to quantify minimal residual disease in patients with multiple myeloma. *Exp Hematol* **2006**, *34*, 688-694, doi:10.1016/j.exphem.2006.01.011.
149. Rueff, J.; Medinger, M.; Heim, D.; Passweg, J.; Stern, M. Lymphocyte subset recovery and outcome after autologous hematopoietic stem cell transplantation for plasma cell myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant* **2014**, *20*, 896-899, doi:10.1016/j.bbmt.2014.03.007.
150. Roux, E.; Dumont-Girard, F.; Starobinski, M.; Siegrist, C.A.; Helg, C.; Chapuis, B.; Roosnek, E. Recovery of immune reactivity after T-cell-depleted bone marrow transplantation depends on thymic activity. *Blood* **2000**, *96*, 2299-2303.
151. Porrata, L.F.; Inwards, D.J.; Lacy, M.Q.; Markovic, S.N. Immunomodulation of early engrafted natural killer cells with interleukin-2 and interferon-alpha in autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* **2001**, *28*, 673-680, doi:10.1038/sj.bmt.1703203.
152. Corral, L.G.; Haslett, P.A.; Muller, G.W.; Chen, R.; Wong, L.M.; Ocampo, C.J.; Patterson, R.T.; Stirling, D.I.; Kaplan, G. Differential cytokine modulation and T cell activation by two distinct classes of thalidomide analogues that are potent inhibitors of TNF-alpha. *J Immunol* **1999**, *163*, 380-386.

153. Dredge, K.; Marriott, J.B.; Todryk, S.M.; Muller, G.W.; Chen, R.; Stirling, D.I.; Dalgleish, A.G. Protective antitumor immunity induced by a costimulatory thalidomide analog in conjunction with whole tumor cell vaccination is mediated by increased Th1-type immunity. *J Immunol* **2002**, *168*, 4914-4919, doi:10.4049/jimmunol.168.10.4914.
154. Wu, L.; Adams, M.; Carter, T.; Chen, R.; Muller, G.; Stirling, D.; Schafer, P.; Bartlett, J.B. lenalidomide enhances natural killer cell and monocyte-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity of rituximab-treated CD20+ tumor cells. *Clin Cancer Res* **2008**, *14*, 4650-4657, doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4405.
155. Tomblyn, M.; Chiller, T.; Einsele, H.; Gress, R.; Sepkowitz, K.; Storek, J.; Wingard, J.R.; Young, J.A.; Boeckh, M.J. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplant recipients: a global perspective. Preface. *Bone Marrow Transplant* **2009**, *44*, 453-455, doi:10.1038/bmt.2009.254.
156. Carpenter, P.A.; Englund, J.A. How I vaccinate blood and marrow transplant recipients. *Blood* **2016**, *127*, 2824-2832, doi:10.1182/blood-2015-12-550475.
157. Teh, B.W.; Leung, V.K.Y.; Mordant, F.L.; Sullivan, S.G.; Joyce, T.; Harrison, S.J.; Khvorov, A.; Barr, I.G.; Subbarao, K.; Slavin, M.A.; et al. A Randomized Trial of Two 2-Dose Influenza Vaccination Strategies for Patients Following Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Clin Infect Dis* **2021**, *73*, e4269-e4277, doi:10.1093/cid/ciaa1711.
158. Patel, S.R.; Ortin, M.; Cohen, B.J.; Borrow, R.; Irving, D.; Sheldon, J.; Heath, P.T. Revaccination with measles, tetanus, poliovirus, Haemophilus influenzae type B, meningococcus C, and pneumococcus vaccines in children after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* **2007**, *44*, 625-634, doi:10.1086/511641.
159. Stadtmauer, E.A.; Vogl, D.T.; Luning Prak, E.; Boyer, J.; Aquilino, N.A.; Rapoport, A.P.; McDonald, K.R.; Hou, X.; Murphy, H.; Bhagat, R.; et al. Transfer of influenza vaccine-primed costimulated autologous T cells after stem cell transplantation for multiple myeloma leads to reconstitution of influenza immunity: results of a randomized clinical trial. *Blood* **2011**, *117*, 63-71, doi:10.1182/blood-2010-07-296822.
160. Engelhard, D.; Nagler, A.; Hardan, I.; Morag, A.; Aker, M.; Baciu, H.; Strauss, N.; Parag, G.; Naparshtek, E.; Ravid, Z.; et al. Antibody response to a two-dose regimen of influenza vaccine in allogeneic T cell-depleted and autologous BMT recipients. *Bone Marrow Transplant* **1993**, *11*, 1-5.
161. Ehmsen, S.; Asmussen, A.; Jeppesen, S.S.; Nilsson, A.C.; Osterlev, S.; Vestergaard, H.; Justesen, U.S.; Johansen, I.S.; Frederiksen, H.; Ditzel, H.J. Antibody and T cell immune responses following mRNA COVID-19 vaccination in patients with cancer. *Cancer Cell* **2021**, *39*, 1034-1036, doi:10.1016/j.ccell.2021.07.016.
162. Jimenez, M.; Roldan, E.; Fernandez-Naval, C.; Villacampa, G.; Martinez-Gallo, M.; Medina-Gil, D.; Peralta-Garzon, S.; Pujadas, G.; Hernandez, C.; Pages, C.; et al. Cellular and humoral immunogenicity of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine in patients with hematologic malignancies. *Blood Adv* **2022**, *6*, 774-784, doi:10.1182/bloodadvances.2021006101.

163. Harrington, P.; de Lavallade, H.; Doores, K.J.; O'Reilly, A.; Seow, J.; Graham, C.; Lechmere, T.; Radia, D.; Dillon, R.; Shanmugharaj, Y.; 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*, 3573-3577, doi:10.1038/s41375-021-01300-7.
164. Haydu, J.E.; Maron, J.S.; Redd, R.A.; Gallagher, K.M.E.; Fischinger, S.; Barnes, J.A.; Hochberg, E.P.; Johnson, P.C.; Takvorian, R.W.; Katsis, K.; et al. Humoral and cellular immunogenicity of SARS-CoV-2 vaccines in chronic lymphocytic leukemia: a prospective cohort study. *Blood Adv* **2022**, *6*, 1671-1683, doi:10.1182/bloodadvances.2021006627.
165. Ram, R.; Hagin, D.; Kikozashvili, N.; Freund, T.; Amit, O.; Bar-On, Y.; Beyar-Katz, O.; Shefer, G.; Moshiashvili, M.M.; Karni, C.; et al. Safety and Immunogenicity of the BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine in Patients after Allogeneic HCT or CD19-based CART therapy-A Single-Center Prospective Cohort Study. *Transplant Cell Ther* **2021**, *27*, 788-794, doi:10.1016/j.jtct.2021.06.024.
166. Teh, J.S.K.; Coussement, J.; Neoh, Z.C.F.; Spelman, T.; Lazarakis, S.; Slavin, M.A.; Teh, B.W. Immunogenicity of COVID-19 vaccines in patients with hematologic malignancies: a systematic review and meta-analysis. *Blood Adv* **2022**, *6*, 2014-2034, doi:10.1182/bloodadvances.2021006333.
167. Yasuda, H.; Tsukune, Y.; Watanabe, N.; Sugimoto, K.; Uchimura, A.; Tateyama, M.; Miyashita, Y.; Ochi, Y.; Komatsu, N. Persistent COVID-19 Pneumonia and Failure to Develop Anti-SARS-CoV-2 Antibodies During Rituximab Maintenance Therapy for Follicular Lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* **2020**, *20*, 774-776, doi:10.1016/j.clml.2020.08.017.
168. Harrington, P.; Doores, K.J.; Radia, D.; O'Reilly, A.; Lam, H.P.J.; Seow, J.; Graham, C.; Lechmere, T.; McLornan, D.; Dillon, R.; 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*, 999-1006, doi:10.1111/bjh.17568.
169. Saussele, S.; Richter, J.; Guilhot, J.; Gruber, F.X.; Hjorth-Hansen, H.; Almeida, A.; Janssen, J.; Mayer, J.; Koskenvesa, P.; Panayiotidis, P.; et al. Discontinuation of tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukaemia (EURO-SKI): a prespecified interim analysis of a prospective, multi-centre, non-randomised, trial. *Lancet Oncol* **2018**, *19*, 747-757, doi:10.1016/S1470-2045(18)30192-X.
170. Gavriatopoulou, M.; Terpos, E.; Ntanasis-Stathopoulos, I.; Briasoulis, A.; Gumeni, S.; Malandrakis, P.; Fotiou, D.; Migkou, M.; Theodorakakou, F.; Eleutherakis-Papaiakevou, E.; et al. Poor neutralizing antibody responses in 106 patients with WM after vaccination against SARS-CoV-2: a prospective study. *Blood Adv* **2021**, *5*, 4398-4405, doi:10.1182/bloodadvances.2021005444.
171. Stampfer, S.D.; Goldwater, M.S.; Jew, S.; Bujarski, S.; Regidor, B.; Daniely, D.; Chen, H.; Xu, N.; Li, M.; Green, T.; et al. Response to mRNA vaccination for COVID-19 among patients with multiple myeloma. *Leukemia* **2021**, *35*, 3534-3541, doi:10.1038/s41375-021-01354-7.
172. Viale, M.; Ferrini, S.; Bacigalupo, A. TCR gamma/delta positive lymphocytes after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* **1992**, *10*, 249-253.
173. Raverdeau, M.; Cunningham, S.P.; Harmon, C.; Lynch, L. gammadelta T cells in cancer: a small population of lymphocytes with big implications. *Clin Transl Immunology* **2019**, *8*, e01080, doi:10.1002/cti2.1080.

174. Park, J.H.; Lee, H.K. Function of gammadelta T cells in tumor immunology and their application to cancer therapy. *Exp Mol Med* **2021**, *53*, 318-327, doi:10.1038/s12276-021-00576-0.
175. Voysey, M.; Clemens, S.A.C.; Madhi, S.A.; Weckx, L.Y.; Folegatti, P.M.; Aley, P.K.; Angus, B.; Baillie, V.L.; Barnabas, S.L.; Bhorat, Q.E.; 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*, 99-111, doi:10.1016/S0140-6736(20)32661-1.
176. Brosh-Nissimov, T.; Orenbuch-Harroch, E.; Chowers, M.; Elbaz, M.; Neshet, L.; Stein, M.; Maor, Y.; Cohen, R.; Hussein, K.; Weinberger, M.; et al. BNT162b2 vaccine breakthrough: clinical characteristics of 152 fully vaccinated hospitalized COVID-19 patients in Israel. *Clin Microbiol Infect* **2021**, *27*, 1652-1657, doi:10.1016/j.cmi.2021.06.036.
177. Embi, P.J.; Levy, M.E.; Naleway, A.L.; Patel, P.; Gaglani, M.; Natarajan, K.; Dascomb, K.; Ong, T.C.; Klein, N.P.; Liao, I.C.; 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*, 1553-1559, doi:10.15585/mmwr.mm7044e3.
178. Garcia-Beltran, W.F.; St Denis, K.J.; Hoelzemer, A.; Lam, E.C.; Nitido, A.D.; Sheehan, M.L.; Berrios, C.; Ofoman, O.; Chang, C.C.; Hauser, B.M.; et al. mRNA-based COVID-19 vaccine boosters induce neutralizing immunity against SARS-CoV-2 Omicron variant. *Cell* **2022**, *185*, 457-466 e454, doi:10.1016/j.cell.2021.12.033.
179. Bar-On, Y.M.; Goldberg, Y.; Mandel, M.; Bodenheimer, O.; Freedman, L.; Kalkstein, N.; Mizrahi, B.; Alroy-Preis, S.; Ash, N.; Milo, R.; et al. Protection of BNT162b2 Vaccine Booster against Covid-19 in Israel. *N Engl J Med* **2021**, *385*, 1393-1400, doi:10.1056/NEJMoa2114255.
180. Barbui, T.; Iurlo, A.; Masciulli, A.; Carobbio, A.; Ghirardi, A.; Carioli, G.; Sobas, M.A.; Elli, E.M.; Rumi, E.; De Stefano, V.; et al. Second versus first wave of COVID-19 in patients with MPN. *Leukemia* **2022**, *36*, 897-900, doi:10.1038/s41375-022-01507-2.
181. Ball, P. The lightning-fast quest for COVID vaccines - and what it means for other diseases. *Nature* **2021**, *589*, 16-18, doi:10.1038/d41586-020-03626-1.
182. WHO Coronavirus Dashboard. Available online: <https://covid19.who.int> (accessed on
183. Pinana, J.L.; Lopez-Corral, L.; Martino, R.; Montoro, J.; Vazquez, L.; Perez, A.; Martin-Martin, G.; Facal-Malvar, A.; Ferrer, E.; Pascual, M.J.; et al. SARS-CoV-2-reactive antibody detection after SARS-CoV-2 vaccination in hematopoietic stem cell transplant recipients: Prospective survey from the Spanish Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cell Therapy Group. *Am J Hematol* **2022**, *97*, 30-42, doi:10.1002/ajh.26385.
184. Redjoul, R.; Le Bouter, A.; Parinet, V.; Fourati, S.; Maury, S. Antibody response after third BNT162b2 dose in recipients of allogeneic HSCT. *Lancet Haematol* **2021**, *8*, e681-e683, doi:10.1016/S2352-3026(21)00274-X.

185. Leclerc, M.; Redjoul, R.; Le Bouter, A.; Beckerich, F.; Robin, C.; Parinet, V.; Pautas, C.; Menouche, D.; Bouledroua, S.; Roy, L.; et al. Impact of donor vaccination on recipient response to early SARS-CoV-2 mRNA vaccination after allogeneic HSCT. *Lancet Haematol* **2022**, *9*, e318-e321, doi:10.1016/S2352-3026(22)00097-7.
186. Mehta, R.S.; Rezvani, K. Immune reconstitution post allogeneic transplant and the impact of immune recovery on the risk of infection. *Virulence* **2016**, *7*, 901-916, doi:10.1080/21505594.2016.1208866.
187. Padoan, A.; Cosma, C.; Bonfante, F.; Della Rocca, F.; Barbaro, F.; Santarossa, C.; Dall'Olmo, L.; Paggiari, M.; Bortolami, A.; Cattelan, A.; et al. Neutralizing antibody titers six months after Comirnaty vaccination: kinetics and comparison with SARS-CoV-2 immunoassays. *Clin Chem Lab Med* **2022**, *60*, 456-463, doi:10.1515/cclm-2021-1247.
188. Brisotto, G.; Muraro, E.; Montico, M.; Corso, C.; Evangelista, C.; Casarotto, M.; Caffau, C.; Vettori, R.; Cozzi, M.R.; Zanussi, S.; et al. IgG antibodies against SARS-CoV-2 decay but persist 4 months after vaccination in a cohort of healthcare workers. *Clin Chim Acta* **2021**, *523*, 476-482, doi:10.1016/j.cca.2021.10.035.
189. Vicenti, I.; Basso, M.; Gatti, F.; Scaggiante, R.; Boccuto, A.; Zago, D.; Modolo, E.; Dragoni, F.; Parisi, S.G.; Zazzi, M. Faster decay of neutralizing antibodies in never infected than previously infected healthcare workers three months after the second BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine dose. *Int J Infect Dis* **2021**, *112*, 40-44, doi:10.1016/j.ijid.2021.08.052.
190. Janssen, M.; Bruns, A.; Kuball, J.; Raijmakers, R.; van Baarle, D. Vaccine Responses in Adult Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients: A Comprehensive Review. *Cancers (Basel)* **2021**, *13*, doi:10.3390/cancers13236140.
191. Carreras, E.D., C.; Mohty, M.; Kröger, N. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*; Springer Nature: Germany, 2019.
192. Wiegering, V.; Eyrich, M.; Winkler, B.; Schlegel, P.G. Comparison of Immune Reconstitution After Allogeneic Versus Autologous Stem Cell Transplantation in 182 Pediatric Recipients. *J Pediatr Hematol Oncol* **2019**, *41*, e302-e307, doi:10.1097/MPH.0000000000001340.
193. Bonneville, M.; O'Brien, R.L.; Born, W.K. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol* **2010**, *10*, 467-478, doi:10.1038/nri2781.
194. Fiolet, T.; Kherabi, Y.; MacDonald, C.J.; Ghosn, J.; Peiffer-Smadja, N. Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics, efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern: a narrative review. *Clin Microbiol Infect* **2022**, *28*, 202-221, doi:10.1016/j.cmi.2021.10.005.
195. Bernal, E.; Gimeno, L.; Alcaraz, M.J.; Quadeer, A.A.; Moreno, M.; Martinez-Sanchez, M.V.; Campillo, J.A.; Gomez, J.M.; Pelaez, A.; Garcia, E.; et al. Activating Killer-Cell Immunoglobulin-Like Receptors Are Associated With the Severity of Coronavirus Disease 2019. *J Infect Dis* **2021**, *224*, 229-240, doi:10.1093/infdis/jiab228.
196. Del Pozo-Valero, M.; Corton, M.; Lopez-Rodriguez, R.; Mahillo-Fernandez, I.; Ruiz-Hornillos, J.; Minguez, P.; Villaverde, C.; Perez-Tomas, M.E.; Barreda-Sanchez, M.; Mancebo, E.; et al. Age-dependent association of clonal hematopoiesis with COVID-19 mortality in patients over 60 years. *Geroscience* **2023**, *45*, 543-553, doi:10.1007/s11357-022-00666-5.

197. Torres, M.C., M.; Rodríguez-Mora, S.; Casado-Fernández, G.; Zurdo-Castronuño, A.; Mateos, E.; Ramos-Martín, F.; Sánchez-Menéndez, C.; Murciano-Antón, M.A.; García-Pérez, J.; et al. Hematology and Hemotherapy Service, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain. *Personal observation* **2022**.
198. Cao, Y.; Li, Q.; Chen, J.; Guo, X.; Miao, C.; Yang, H.; Chen, Z.; Li, C.; Li, L. Hospital Emergency Management Plan During the COVID-19 Epidemic. *Acad Emerg Med* **2020**, *27*, 309-311, doi:10.1111/acem.13951.
199. Negahdaripour, M.; Shafiekhani, M.; Moezzi, S.M.I.; Amiri, S.; Rasekh, S.; Bagheri, A.; Mosaddeghi, P.; Vazin, A. Administration of COVID-19 vaccines in immunocompromised patients. *Int Immunopharmacol* **2021**, *99*, 108021, doi:10.1016/j.intimp.2021.108021.
200. Goel, R.R.; Painter, M.M.; Apostolidis, S.A.; Mathew, D.; Meng, W.; Rosenfeld, A.M.; Lundgreen, K.A.; Reynaldi, A.; Khoury, D.S.; Pattekar, A.; et al. mRNA vaccines induce durable immune memory to SARS-CoV-2 and variants of concern. *Science* **2021**, *374*, abm0829, doi:10.1126/science.abm0829.
201. Vijenthira, A.; Gong, I.; Betschel, S.D.; Cheung, M.; Hicks, L.K. Vaccine response following anti-CD20 therapy: a systematic review and meta-analysis of 905 patients. *Blood Adv* **2021**, *5*, 2624-2643, doi:10.1182/bloodadvances.2021004629.
202. Moor, M.B.; Suter-Riniker, F.; Horn, M.P.; Aeberli, D.; Amsler, J.; Moller, B.; Njue, L.M.; Medri, C.; Angelillo-Scherrer, A.; Borradori, L.; et al. Humoral and cellular responses to mRNA vaccines against SARS-CoV-2 in patients with a history of CD20 B-cell-depleting therapy (RituxiVac): an investigator-initiated, single-centre, open-label study. *Lancet Rheumatol* **2021**, *3*, e789-e797, doi:10.1016/S2665-9913(21)00251-4.
203. Eisenberg, R.A.; Jawad, A.F.; Boyer, J.; Maurer, K.; McDonald, K.; Prak, E.T.; Sullivan, K.E. Rituximab-treated patients have a poor response to influenza vaccination. *J Clin Immunol* **2013**, *33*, 388-396, doi:10.1007/s10875-012-9813-x.
204. van der Kolk, L.E.; Baars, J.W.; Prins, M.H.; van Oers, M.H. Rituximab treatment results in impaired secondary humoral immune responsiveness. *Blood* **2002**, *100*, 2257-2259.
205. Tanguay, M.; Boutin, M.; Laumaea, A.; Salaciak, M.; Mendoza, A.; Cassis, C.; Ajjamada, L.; Assouline, S.; Patenaude, F.; Clark, M.W.; et al. B-cell cytopenia and time to last B-cell-depleting therapy predict response to SARS-COV-2 vaccines in patients with lymphoproliferative disorders. *Vaccine* **2022**, *40*, 1203-1207, doi:10.1016/j.vaccine.2022.01.040.
206. Schietzel, S.; Anderegg, M.; Limacher, A.; Born, A.; Horn, M.P.; Maurer, B.; Hirzel, C.; Sidler, D.; Moor, M.B. Humoral and cellular immune responses on SARS-CoV-2 vaccines in patients with anti-CD20 therapies: a systematic review and meta-analysis of 1342 patients. *RMD Open* **2022**, *8*, doi:10.1136/rmdopen-2021-002036.
207. Shields, A.M.; Venkatachalam, S.; Shafeek, S.; Paneesha, S.; Ford, M.; Sheeran, T.; Kelly, M.; Qureshi, I.; Salhan, B.; Karim, F.; et al. SARS-CoV-2 vaccine responses following CD20-depletion treatment in patients with haematological and rheumatological disease: a West Midlands Research Consortium study. *Clin Exp Immunol* **2022**, *207*, 3-10, doi:10.1093/cei/uxab018.

208. Terpos, E.; Gavriatopoulou, M.; Fotiou, D.; Giatra, C.; Asimakopoulos, I.; Dimou, M.; Sklirou, A.D.; Ntanasis-Stathopoulos, I.; Darmani, I.; Briasoulis, A.; et al. Poor Neutralizing Antibody Responses in 132 Patients with CLL, NHL and HL after Vaccination against SARS-CoV-2: A Prospective Study. *Cancers (Basel)* **2021**, *13*, doi:10.3390/cancers13174480.
209. Dulery, R.; Lamure, S.; Delord, M.; Di Blasi, R.; Chauchet, A.; Hueso, T.; Rossi, C.; Drenou, B.; Deau Fischer, B.; Soussain, C.; et al. Prolonged in-hospital stay and higher mortality after Covid-19 among patients with non-Hodgkin lymphoma treated with B-cell depleting immunotherapy. *Am J Hematol* **2021**, *96*, 934-944, doi:10.1002/ajh.26209.
210. Barda, N.; Dagan, N.; Cohen, C.; Hernan, M.A.; Lipsitch, M.; Kohane, I.S.; Reis, B.Y.; Balicer, R.D. Effectiveness of a third dose of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine for preventing severe outcomes in Israel: an observational study. *Lancet* **2021**, *398*, 2093-2100, doi:10.1016/S0140-6736(21)02249-2.
211. Hall, V.G.; Ferreira, V.H.; Ku, T.; Ierullo, M.; Majchrzak-Kita, B.; Chaparro, C.; Selzner, N.; Schiff, J.; McDonald, M.; Tomlinson, G.; et al. Randomized Trial of a Third Dose of mRNA-1273 Vaccine in Transplant Recipients. *N Engl J Med* **2021**, *385*, 1244-1246, doi:10.1056/NEJMc2111462.
212. Benucci, M.; Damiani, A.; Gobbi, F.L.; Lari, B.; Grossi, V.; Infantino, M.; Manfredi, M. Role of booster with BNT162b2 mRNA in SARS-CoV-2 vaccination in patients with rheumatoid arthritis. *Immunol Res* **2022**, doi:10.1007/s12026-022-09283-y.
213. Shapiro, L.C.; Thakkar, A.; Campbell, S.T.; Forest, S.K.; Pradhan, K.; Gonzalez-Lugo, J.D.; Quinn, R.; Bhagat, T.D.; Choudhary, G.S.; McCort, M.; et al. Efficacy of booster doses in augmenting waning immune responses to COVID-19 vaccine in patients with cancer. *Cancer Cell* **2022**, *40*, 3-5, doi:10.1016/j.ccell.2021.11.006.
214. Laing, A.G.; Lorenc, A.; Del Molino Del Barrio, I.; Das, A.; Fish, M.; Monin, L.; Munoz-Ruiz, M.; McKenzie, D.R.; Hayday, T.S.; Francos-Quijorna, I.; et al. A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. *Nat Med* **2020**, *26*, 1623-1635, doi:10.1038/s41591-020-1038-6.
215. Ansariniya, H.; Seifati, S.M.; Zaker, E.; Zare, F. Comparison of Immune Response between SARS, MERS, and COVID-19 Infection, Perspective on Vaccine Design and Development. *Biomed Res Int* **2021**, *2021*, 8870425, doi:10.1155/2021/8870425.
216. Lumley, S.F.; O'Donnell, D.; Stoesser, N.E.; Matthews, P.C.; Howarth, A.; Hatch, S.B.; Marsden, B.D.; Cox, S.; James, T.; Warren, F.; et al. Antibody Status and Incidence of SARS-CoV-2 Infection in Health Care Workers. *N Engl J Med* **2021**, *384*, 533-540, doi:10.1056/NEJMoa2034545.
217. Marasco, V.; Carniti, C.; Guidetti, A.; Farina, L.; Magni, M.; Miceli, R.; Calabretta, L.; Verderio, P.; Ljevar, S.; Serpenti, F.; et al. T-cell immune response after mRNA SARS-CoV-2 vaccines is frequently detected also in the absence of seroconversion in patients with lymphoid malignancies. *Br J Haematol* **2022**, *196*, 548-558, doi:10.1111/bjh.17877.
218. Zheng, C.; Shao, W.; Chen, X.; Zhang, B.; Wang, G.; Zhang, W. Real-world effectiveness of COVID-19 vaccines: a literature review and meta-analysis. *Int J Infect Dis* **2022**, *114*, 252-260, doi:10.1016/j.ijid.2021.11.009.

219. Liu, Q.; Qin, C.; Liu, M.; Liu, J. Effectiveness and safety of SARS-CoV-2 vaccine in real-world studies: a systematic review and meta-analysis. *Infect Dis Poverty* **2021**, *10*, 132, doi:10.1186/s40249-021-00915-3.
220. Jia, Z.; Gong, W. Will Mutations in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Lead to the Failure of COVID-19 Vaccines? *J Korean Med Sci* **2021**, *36*, e124, doi:10.3346/jkms.2021.36.e124.
221. Pormohammad, A.; Zarei, M.; Ghorbani, S.; Mohammadi, M.; Aghayari Sheikh Neshin, S.; Khatami, A.; Turner, D.L.; Djalalinia, S.; Mousavi, S.A.; Mardani-Fard, H.A.; et al. Effectiveness of COVID-19 Vaccines against Delta (B.1.617.2) Variant: A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Studies. *Vaccines (Basel)* **2021**, *10*, doi:10.3390/vaccines10010023.
222. Patel, R.; Kaki, M.; Potluri, V.S.; Kahar, P.; Khanna, D. A comprehensive review of SARS-CoV-2 vaccines: Pfizer, Moderna & Johnson & Johnson. *Hum Vaccin Immunother* **2022**, *18*, 2002083, doi:10.1080/21645515.2021.2002083.
223. Chenchula, S.; Karunakaran, P.; Sharma, S.; Chavan, M. Current evidence on efficacy of COVID-19 booster dose vaccination against the Omicron variant: A systematic review. *J Med Virol* **2022**, *94*, 2969-2976, doi:10.1002/jmv.27697.
224. Coutinho, A.E.; Chapman, K.E. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Mol Cell Endocrinol* **2011**, *335*, 2-13, doi:10.1016/j.mce.2010.04.005.
225. Velardi, E.; Tsai, J.J.; van den Brink, M.R.M. T cell regeneration after immunological injury. *Nat Rev Immunol* **2021**, *21*, 277-291, doi:10.1038/s41577-020-00457-z.
226. Gafter-Gvili, A.; Polliack, A. Bendamustine associated immune suppression and infections during therapy of hematological malignancies. *Leuk Lymphoma* **2016**, *57*, 512-519, doi:10.3109/10428194.2015.1110748.
227. Ito, K.; Okamoto, M.; Ando, M.; Kakumae, Y.; Okamoto, A.; Inaguma, Y.; Tokuda, M.; Yanada, M.; Yamada, S.; Emi, N. Influence of rituximab plus bendamustine chemotherapy on the immune system in patients with refractory or relapsed follicular lymphoma and mantle cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* **2015**, *56*, 1123-1125, doi:10.3109/10428194.2014.921298.
228. Garcia Munoz, R.; Izquierdo-Gil, A.; Munoz, A.; Roldan-Galiacho, V.; Rabasa, P.; Panizo, C. Lymphocyte recovery is impaired in patients with chronic lymphocytic leukemia and indolent non-Hodgkin lymphomas treated with bendamustine plus rituximab. *Ann Hematol* **2014**, *93*, 1879-1887, doi:10.1007/s00277-014-2135-8.
229. Yutaka, T.; Ito, S.; Ohigashi, H.; Naohiro, M.; Shimono, J.; Souichi, S.; Teshima, T. Sustained CD4 and CD8 lymphopenia after rituximab maintenance therapy following bendamustine and rituximab combination therapy for lymphoma. *Leuk Lymphoma* **2015**, *56*, 3216-3218, doi:10.3109/10428194.2015.1026818.
230. Saito, H.; Maruyama, D.; Maeshima, A.M.; Makita, S.; Kitahara, H.; Miyamoto, K.; Fukuhara, S.; Munakata, W.; Suzuki, T.; Kobayashi, Y.; et al. Prolonged lymphocytopenia after bendamustine therapy in patients with relapsed or refractory indolent B-cell and mantle cell lymphoma. *Blood Cancer J* **2015**, *5*, e362, doi:10.1038/bcj.2015.86.

231. Kleinberg, L.; Sloan, L.; Grossman, S.; Lim, M. Radiotherapy, Lymphopenia, and Host Immune Capacity in Glioblastoma: A Potentially Actionable Toxicity Associated With Reduced Efficacy of Radiotherapy. *Neurosurgery* **2019**, *85*, 441-453, doi:10.1093/neuros/nyz198.
232. Wang, X.; Wang, P.; Zhao, Z.; Mao, Q.; Yu, J.; Li, M. A review of radiation-induced lymphopenia in patients with esophageal cancer: an immunological perspective for radiotherapy. *Ther Adv Med Oncol* **2020**, *12*, 1758835920926822, doi:10.1177/1758835920926822.
233. Koukourakis, M.I.; Giatromanolaki, A. Lymphopenia and intratumoral lymphocytic balance in the era of cancer immuno-radiotherapy. *Crit Rev Oncol Hematol* **2021**, *159*, 103226, doi:10.1016/j.critrevonc.2021.103226.
234. Muhsen, K.; Maimon, N.; Mizrahi, A.; Bodenheimer, O.; Cohen, D.; Maimon, M.; Grotto, I.; Dagan, R. Effectiveness of BNT162b2 mRNA Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Vaccine Against Acquisition of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Among Healthcare Workers in Long-Term Care Facilities: A Prospective Cohort Study. *Clin Infect Dis* **2022**, *75*, e755-e763, doi:10.1093/cid/ciab918.
235. Moncunill, G.; Aguilar, R.; Ribes, M.; Ortega, N.; Rubio, R.; Salmeron, G.; Molina, M.J.; Vidal, M.; Barrios, D.; Mitchell, R.A.; et al. Determinants of early antibody responses to COVID-19 mRNA vaccines in a cohort of exposed and naive healthcare workers. *EBioMedicine* **2022**, *75*, 103805, doi:10.1016/j.ebiom.2021.103805.
236. Katz, M.A.; Harlev, E.B.; Chazan, B.; Chowers, M.; Greenberg, D.; Peretz, A.; Tshori, S.; Levy, J.; Yacobi, M.; Hirsch, A.; et al. Early effectiveness of BNT162b2 Covid-19 vaccine in preventing SARS-CoV-2 infection in healthcare personnel in six Israeli hospitals (CoVEHPI). *Vaccine* **2022**, *40*, 512-520, doi:10.1016/j.vaccine.2021.11.092.
237. Novazzi, F.; Tadorelli, S.; Baj, A.; Focosi, D.; Maggi, F. Asymptomatic SARS-CoV-2 Vaccine Breakthrough Infections in Health Care Workers Identified Through Routine Universal Surveillance Testing. *Ann Intern Med* **2021**, *174*, 1770-1772, doi:10.7326/M21-3486.
238. Levin, E.G.; Lustig, Y.; Cohen, C.; Fluss, R.; Indenbaum, V.; Amit, S.; Doolman, R.; Asraf, K.; Mendelson, E.; Ziv, A.; et al. Waning Immune Humoral Response to BNT162b2 Covid-19 Vaccine over 6 Months. *N Engl J Med* **2021**, *385*, e84, doi:10.1056/NEJMoa2114583.
239. Rubin, L.G.; Levin, M.J.; Ljungman, P.; Davies, E.G.; Avery, R.; Tomblyn, M.; Bousvaros, A.; Dhanireddy, S.; Sung, L.; Keyserling, H.; et al. 2013 IDSA clinical practice guideline for vaccination of the immunocompromised host. *Clin Infect Dis* **2014**, *58*, e44-100, doi:10.1093/cid/cit684.
240. Wahren, B.; Gahrton, G.; Linde, A.; Ljungman, P.; Lonngqvist, B.; Ringden, O.; Sundqvist, V.A. Transfer and persistence of viral antibody-producing cells in bone marrow transplantation. *J Infect Dis* **1984**, *150*, 358-365, doi:10.1093/infdis/150.3.358.
241. Pauksen, K.; Duraj, V.; Ljungman, P.; Sjolín, J.; Oberg, G.; Lonnerholm, G.; Fridell, E.; Smedmyr, B.; Simonsson, B. Immunity to and immunization against measles, rubella and mumps in patients after autologous bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* **1992**, *9*, 427-432.

242. Pao, M.; Papadopoulos, E.B.; Chou, J.; Glenn, H.; Castro-Malaspina, H.; Jakubowski, A.A.; Kernan, N.A.; Perales, M.A.; Prokop, S.; Scaradavou, A.; et al. Response to pneumococcal (PNCRM7) and haemophilus influenzae conjugate vaccines (HIB) in pediatric and adult recipients of an allogeneic hematopoietic cell transplantation (alloHCT). *Biol Blood Marrow Transplant* **2008**, *14*, 1022-1030, doi:10.1016/j.bbmt.2008.06.012.
243. Meerveld-Eggink, A.; van der Velden, A.M.; Ossenkoppele, G.J.; van de Loosdrecht, A.A.; Biesma, D.H.; Rijkers, G.T. Antibody response to polysaccharide conjugate vaccines after nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* **2009**, *15*, 1523-1530, doi:10.1016/j.bbmt.2009.07.020.
244. Sekine, T.; Perez-Potti, A.; Rivera-Ballesteros, O.; Stralin, K.; Gorin, J.B.; Olsson, A.; Llewellyn-Lacey, S.; Kamal, H.; Bogdanovic, G.; Muschiol, S.; et al. Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell* **2020**, *183*, 158-168 e114, doi:10.1016/j.cell.2020.08.017.
245. Wajnberg, A.; Amanat, F.; Firpo, A.; Altman, D.R.; Bailey, M.J.; Mansour, M.; McMahon, M.; Meade, P.; Mendu, D.R.; Muellers, K.; et al. Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. *Science* **2020**, *370*, 1227-1230, doi:10.1126/science.abd7728.
246. Ibarondo, F.J.; Fulcher, J.A.; Goodman-Meza, D.; Elliott, J.; Hofmann, C.; Hausner, M.A.; Ferbas, K.G.; Tobin, N.H.; Aldrovandi, G.M.; Yang, O.O. Rapid Decay of Anti-SARS-CoV-2 Antibodies in Persons with Mild Covid-19. *N Engl J Med* **2020**, *383*, 1085-1087, doi:10.1056/NEJMc2025179.
247. Grifoni, A.; Weiskopf, D.; Ramirez, S.I.; Mateus, J.; Dan, J.M.; Moderbacher, C.R.; Rawlings, S.A.; Sutherland, A.; Premkumar, L.; Jadi, R.S.; et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell* **2020**, *181*, 1489-1501 e1415, doi:10.1016/j.cell.2020.05.015.
248. Le Bert, N.; Tan, A.T.; Kunasegaran, K.; Tham, C.Y.L.; Hafezi, M.; Chia, A.; Chng, M.H.Y.; Lin, M.; Tan, N.; Linster, M.; et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature* **2020**, *584*, 457-462, doi:10.1038/s41586-020-2550-z.
249. Milojkovic, D.; Reynolds, C.J.; Sandoval, D.M.; Pieper, F.P.; Liu, S.; Pade, C.; Gibbons, J.M.; McKnight, A.; Loaiza, S.; Palanicawander, R.; et al. COVID-19 vaccine boosted immunity against Omicron in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors. *Leukemia* **2023**, *37*, 244-247, doi:10.1038/s41375-022-01787-8.
250. Pagano, L.; Salmanton-Garcia, J.; Marchesi, F.; Busca, A.; Corradini, P.; Hoenigl, M.; Klimko, N.; Koehler, P.; Pagliuca, A.; Passamonti, F.; et al. COVID-19 infection in adult patients with hematological malignancies: a European Hematology Association Survey (EPICOVIDEHA). *J Hematol Oncol* **2021**, *14*, 168, doi:10.1186/s13045-021-01177-0.
251. Pagano, L.; Salmanton-Garcia, J.; Marchesi, F.; Blennow, O.; Gomes da Silva, M.; Glenthøj, A.; van Doesum, J.; Bilgin, Y.M.; Lopez-Garcia, A.; Itri, F.; et al. Breakthrough COVID-19 in vaccinated patients with hematologic malignancies: results from the EPICOVIDEHA survey. *Blood* **2022**, *140*, 2773-2787, doi:10.1182/blood.2022017257.
252. Pinana, J.L.; Lopez-Corral, L.; Martino, R.; Vazquez, L.; Perez, A.; Martin-Martin, G.; Gago, B.; Sanz-Linares, G.; Sanchez-Salinas, A.; Villalon, L.; et al. SARS-CoV-2 vaccine response and rate

of breakthrough infection in patients with hematological disorders. *J Hematol Oncol* **2022**, *15*, 54, doi:10.1186/s13045-022-01275-7.

253. Abu-Raddad, L.J.; Chemaitelly, H.; Ayoub, H.H.; AlMukdad, S.; Yassine, H.M.; Al-Khatib, H.A.; Smatti, M.K.; Tang, P.; Hasan, M.R.; Coyle, P.; et al. Effect of mRNA Vaccine Boosters against SARS-CoV-2 Omicron Infection in Qatar. *N Engl J Med* **2022**, *386*, 1804-1816, doi:10.1056/NEJMoa2200797.

9

**PUBLICACIONES
Y COMUNICACIONES**

Presentaciones más relevantes de resultados en Congresos:

Ponencia invitada:

- **63rd ASH Annual Meeting & Exposition “ASH advances COVID Research”.** **Magdalena Corona de Lapuerta;** Mayte Pérez Olmeda; Sara Rodríguez Mora; Javier García Pérez; Lorena Vigón; Elena Mateos; Montserrat Torres; María-Aranzazú Murciano-Antón; María Jesús Blanchard; Juan Marquet; Fernando Martín Moro; Adolfo Sáez; Pablo Palomo; Javier López Jiménez; María Rosa López Huertas; Mayte Coiras; Valentín García Gutiérrez. Characterization of the early humoral and cellular response developed in oncohematological patients post-vaccination with one dose against COVID-19.

Comunicaciones orales:

- **Magdalena Corona;** Montserrat Torres; Sara Rodríguez-Mora; Guiomar Casado; Alejandro Zurdo-Castronuño; Javier López Jiménez; Mayte Coiras; Valentín García-Gutiérrez. *Análisis de la respuesta inmune celular y humoral tras el booster de la vacuna del COVID-19 en pacientes con enfermedades hematológicas que recibieron tratamiento con Rituximab.* **LXIV Congreso Nacional SEHH y XXXVIII.** Sociedad española de Hematología y Hemoterapia. 2022. España.
- **M. Corona de Lapuerta;** S. Rodríguez-Mora; G. Casado-Fernández; J. García-Pérez; L. Vigón; M.A. Murciano-Antón; M.J. Blanchard; J. Marquet; F. Martín-Moro; A. Zurdo Castronuño; L. Pérez Lamas; M. Pérez-Olmeda; J. López-Jiménez; M.R. López-Huertas; M. Coiras; V. García-Gutiérrez. *Longitudinal study of the humoral and cellular response developed in alloSCT patients during a two-dose vaccination schedule against COVID-19.* **EBMT 48th annual meeting. European Group for Blood and Marrow Transplantation.** 2022. República Checa.
- **Magdalena Corona de Lapuerta;** Mayte Pérez Olmeda; Sara Rodríguez Mora; Javier García Pérez; Lorena Vigón; Elena Mateos; Montserrat Torres; María-Aranzazú Murciano-Antón; María Jesús Blanchard; Juan Marquet; Fernando Martín Moro; Adolfo Sáez; Pablo Palomo; Javier López Jiménez; María Rosa López Huertas; Mayte Coiras; Valentín García Gutiérrez. *Characterization of the early humoral and cellular response developed in oncohematological patients post-vaccination with one dose against COVID-19.* **63rd ASH Annual Meeting & Exposition. American Society of Hematology.** 2021. Estados Unidos de América.
- **Corona de Lapuerta, Magdalena;** Pérez-Olmeda, Mayte; Rodríguez-Mora, Sara; García-Pérez, Javier; Vigón, Lorena; Mateos, Elena; Torres, Monserrat; Murciano-Antón, María Aranzazú; Blanchard, María Jesús; Marquet, Juan; Martín-Moro, Fernando; Sáez, Adolfo; Palomo Rumschisky, Pablo; López Jimenez, Javier; López-Huertas, María Rosa; Coiras, Mayte; García-Gutiérrez, Valentín. *Caracterización de la respuesta inmune temprana en paciente oncohematológicos tras la primera dosis de la vacuna frente a la COVID-19.* **LXIII Congreso Nacional de la SEHH y SETH.** 2021.

Artículos relacionados con la tesis:

- Rodríguez-Mora, S.* & Pérez-Lamas, L.*; Sainero, M.S.; Torres, M.; Sánchez-Menéndez, C.; **Corona, M.**; Mateos, E.; Casado-Fernández, G.; Alcamí, J.; et al. **Persistent Immunity against SARS-CoV-2 in Individuals with Oncohematological Diseases Who Underwent Autologous or Allogeneic Stem Cell Transplantation after Vaccination.** *Cancers* 2023, 15, 2344, doi:10.3390/cancers15082344
- Torres, M.* & **Corona, M.***; Rodríguez-Mora, S.; Casado-Fernandez, G.; Zurdo-Castronuno, A.; Mateos, E.; Ramos-Martin, F.; Sanchez-Menendez, C.; Murciano-Anton, M.A.; Garcia-Perez, J.; et al. **Strong Humoral but Not Cellular Immune Responses against SARS-CoV-2 in Individuals with Oncohematological Disease Who Were Treated with Rituximab before Receiving a Vaccine Booster.** *Cancers (Basel)* 2022, 14, doi:10.3390/cancers14225537. (* Co-autor principal).
- Rodríguez-Mora, S.* & **Corona, M.***; Torres, M.; Casado-Fernandez, G.; Garcia-Perez, J.; Ramos-Martin, F.; Vigon, L.; Manzanares, M.; Mateos, E.; Martin-Moro, F.; et al. **Early Cellular and Humoral Responses Developed in Oncohematological Patients after Vaccination with One Dose against COVID-19.** *J Clin Med* 2022, 11, doi:10.3390/jcm11102803. (* Co-autor principal).
- Vigon, L.; Sanchez-Tornero, A.; Rodríguez-Mora, S.; Garcia-Perez, J.; **Corona de Lapuerta, M.**; Pérez-Lamas, L.; Casado-Fernandez, G.; Moreno, G.; Torres, M.; Mateos, E.; et al. **Strong Cellular Immune Response, but Not Humoral, against SARS-CoV-2 in Oncohematological Patients with Autologous Stem Cell Transplantation after Natural Infection.** *J Clin Med* 2022, 11, doi:10.3390/jcm11082137.
- Pinana, J.L.; Lopez-Corral, L.; Martino, R.; Vazquez, L.; Perez, A.; Martin-Martin, G.; Gago, B.; Sanz-Linares, G.; Sanchez-Salinas, A.; Villalon, L.; Conesa-García, V.; Olave, M.; **Corona, M.**; et al. **SARS-CoV-2 vaccine response and rate of breakthrough infection in patients with hematological disorders.** *J Hematol Oncol* 2022, 15, 54, doi:10.1186/s13045-022-01275-7.
- Pinana, J.L.; Rodríguez-Belenguer, P.; Caballero, D.; Martino, R.; Lopez-Corral, L.; Terol, M.J.; Vazquez, L.; Calabuig, M.; Sanz-Linares, G.; Marin-Jimenez, F.; Carmen, A.; Montoro, J.; Ferrer, E.; Facal, A.; Pascual, M.J.; Rodríguez-Fernandez, A.; Olava, M.; Cascales-Hernandez, M.; Gago, B.; Hernández-Rivas, J.A.; Villalon, L.; **Corona, M.**; et al. **Applicability of probabilistic graphical models for early detection of SARS-CoV-2 reactive antibodies after SARS-CoV-2 vaccination in hematological patients.** *Ann Hematol* 2022, 101, 2053-2067, doi:10.1007/s00277-022-04906-8.
- Martin-Moro, F.; Marquet, J.; Piris, M.; Michael, B.M.; Saez, A.J.; **Corona, M.**; Jimenez, C.; Astibia, B.; Garcia, I.; Rodriguez, E.; et al. **Survival study of hospitalised patients with concurrent COVID-19 and haematological malignancies.** *Br J Haematol* 2020, 190, e16-e20, doi:10.1111/bjh.16801.

Otras publicaciones:

- Vigon, L.; Fuertes, D.; Garcia-Perez, J.; Torres, M.; Rodriguez-Mora, S.; Mateos, E.; **Corona, M.**; Saez-Marin, A.J.; Malo, R.; Navarro, C.; 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*, 665329, doi:10.3389/fimmu.2021.665329.
- Vigon, L.; Galan, M.; Torres, M.; Martin-Galiano, A.J.; Rodriguez-Mora, S.; Mateos, E.; **Corona, M.**; Malo, R.; Navarro, C.; Murciano-Anton, M.A.; et al. **Association between HLA-C alleles and COVID-19 severity in a pilot study with a Spanish Mediterranean Caucasian cohort.** *PLoS One* 2022, *17*, e0272867, doi:10.1371/journal.pone.0272867.
- Casado-Fernandez, G.; **Corona, M.**; Torres, M.; Saez, A.J.; Ramos-Martin, F.; Manzanares, M.; Vigon, L.; Mateos, E.; Pozo, F.; Casas, I.; et al. **Sustained Cytotoxic Response of Peripheral Blood Mononuclear Cells from Unvaccinated Individuals Admitted to the ICU Due to Critical COVID-19 Is Essential to Avoid a Fatal Outcome.** *Int J Environ Res Public Health* 2023, *20*, doi:10.3390/ijer-ph20031947.



Universidad
de Alcalá