

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE MEDICINA



**TESIS DOCTORAL**

Respuesta inmunitaria de pacientes con inmunodeficiencia común  
variable: estudio en el contexto de las nuevas vacunas para SARS-VOV-2

Immune reponse of patients with common variable immunodeficiency: study in  
SARS-COV-2 new vaccines context

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Daniel Arroyo Sánchez

Dirigida por

Estela Natividad Paz Artal  
Óscar Cabrera Marante

Madrid

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE MEDICINA



**TESIS DOCTORAL**

RESPUESTA INMUNITARIA DE PACIENTES CON  
INMUNODEFICIENCIA COMÚN VARIABLE: ESTUDIO EN EL  
CONTEXTO DE LAS NUEVAS VACUNAS PARA SARS-COV-2

IMMUNE RESPONSE OF PATIENTS WITH COMMON  
VARIABLE IMMUNODEFICIENCY: STUDY IN SARS-COV-2  
NEW VACCINES CONTEXT

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Daniel Arroyo Sánchez

DIRECTORES

Estela Natividad Paz Artal; Oscar Cabrera Marante

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE MEDICINA



**TESIS DOCTORAL**

**D9AN - Investigación biomédica**

RESPUESTA INMUNITARIA DE PACIENTES CON  
INMUNODEFICIENCIA COMÚN VARIABLE: ESTUDIO EN EL  
CONTEXTO DE LAS NUEVAS VACUNAS PARA SARS-COV-2

IMMUNE RESPONSE OF PATIENTS WITH COMMON  
VARIABLE IMMUNODEFICIENCY: STUDY IN SARS-COV-2  
NEW VACCINES CONTEXT

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Daniel Arroyo Sánchez

DIRECTORES

Estela Natividad Paz Artal; Oscar Cabrera Marante



## Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer al lector su interés en este trabajo. Aunque me he encontrado en muchas ocasiones con dificultades tanto para desarrollarlo como para concluirlo, quiero constatar que la alegría de poder descubrir cosas supera a las decepciones de la ausencia de éxito. Me gusta pensar que casi nada carece de interés y casi todo de importancia, así que animo al lector a afrontar con dicha actitud los hallazgos aquí recogidos.

Quisiera incluir en mis agradecimientos a aquellas personas que me han conducido a poder presentar esta tesis, tanto los que se han involucrado directa como a los que lo han hecho indirectamente.

No se puede considerar a casi ninguna obra como exclusiva de quien la concibe o la realiza, ya que detrás de esa concepción y/o realización hay muchas cabezas que han realizado su aportación, tanto desde el punto de vista del propio trabajo como de mantenerme con el objetivo perenne de concluir mis investigaciones.

Por ello, quiero empezar agradeciendo a aquellos sin cuya aportación directa esto no sería posible. El primer lugar es para las chicas de la séptima, Marta, Patri y Ceci, quienes deben considerar esta tesis como suya, tanto por su participación manual como por las charlas a última hora en la séptima, necesarias para querer continuar, aunque las cosas pintasen mal. Aunque no es una chica de la séptima, mi gratitud es mayúscula con Miguel Batanero. Su temprana partida del 12 no le ha permitido estar cuando se ha elaborado la última mitad del trabajo, pero se dejó el alma en la primera mitad.

Después quisiera agradecer tanto al grupo de la consulta clínica del 12 de Octubre como a los pacientes su participación, ya que sin ellos no habría nada que contar. En especial quisiera agradecerlo a Daniel Pleguezuelo, quien desde el principio ha visto con buenos ojos mis ideas de proyectos; y a Oscar Cabrera Marante, director de esta tesis, con quien tan bien me he compenetrado para sacar adelante no sólo esta tesis, sino muchos más trabajos. De él no sólo me llevo su experiencia diplomática y su control de situaciones tensas, también una bonita amistad.

También quiero agradecer al grupo de genética del CNIO, encabezado por Orlando Domínguez, su colaboración con la parte de transcriptómica. No sólo aportaron su labor, sino los mejores consejos para extraer un ARN que hasta entonces era muy difícil de obtener en condiciones óptimas.

Incluiré en esta parte a los profesionales del Ospedale San Raffaele, tanto los clínicos como los investigadores, pero en especial a Vero, Chiara, Beppe, Lucca, Adri y Julia, quienes hicieron de un lugar lejano una experiencia preciosa.

Por último, para esta parte, quisiera agradecer a Estela Paz Artal, mentora, directora de tesis y amiga, que ha puesto todos los medios para que los proyectos pudieran llevarse a cabo. Ha demostrado ser una buena jefa, tanto cuando señalaba las imperfecciones como cuando celebraba los éxitos. Esta tesis probablemente sea una más de su colección, pero se ha desvivido para que pareciera que fuera única.

Como he comentado, muchas otras personas han permitido que este trabajo saliera adelante por su apoyo emocional y motivación. Quiero destacar a los residentes de Inmunología del Hospital 12 de Octubre: Laura Díez, Marcos, Laura Naranjo, ARF, Dani Nehme, Álex, Javi Gil, Javi Arroyo, Fran, Sandra, Miriam, Luis Alejandro, Ángel y Carlota. Sobre todo, destacar a María, mi coR, y a Sara, mi otra coR, con quienes tanto he compartido. Habéis sido muy buenos compañeros, algunos caballeros y hadas, pero muy cucas y responsables. Aunque no sean residentes, Marta y Celia han permitido formar un grupo en el 12 de Octubre muy especial, sin quienes 5 años de mi vida habrían sido muy difíciles. Por último, quiero también agradecer al grupo de la UNICA su inclusión y amistad.

Por otro lado, quiero también agradecer a mis amigos de toda la vida su paciencia por no haberme presentado tantas veces como hubiera querido, soportando así mi ausencia con el fin de obtener esta tesis.

Muchas gracias por estar siempre ahí Álvaro A.P., Iván, Álex Ruiz, Álex Peña, Manza, Jesús, Carol, grupo del EU4, Palomas y Unicornios de Peraleda (en especial, Álex, quien además es compañero de profesión y ha sido un ejemplo de seguir adelante, aunque todo duela), Álvaro Pascual, Carlos, Jaime y todo el grupo de la US. Sin vuestra complicidad no hubiera aguantado esto.

Para terminar, quiero agradecer a mi familia, tanto política (Elenas, Ana, Jose, Manu y Julia) como de sangre: Argelia, Modesto, Felicita, Marcelo, papá, mamá, Anita y Tate. Muchas veces he pensado si lo que quería era lo que yo prefería o era lo que suponía que a mi familia mejor le iba a parecer, pero he podido comprobar que lo que me hacía feliz coincidía con lo que ellos preferían.

Por último, esta tesis es en gran parte obra de Alicia, a quien dedico esta tesis. Este trabajo ha quitado horas a su lado e incluso la ha requerido como revisora. No puedo tener ni una palabra

en contra de la estoicidad con la que ella se ha enfrentado a esta situación, por lo que agradecería que se pensara en ella cuando se comente esta tesis. Muchas gracias Alicia, te quiero.



# Índice

1.- Abreviaturas .....	9
2.- Resumen.....	12
3.- Abstract .....	16
4.- Introducción .....	20
4.1 Errores innatos de la inmunidad .....	20
4.1.1 Clasificación de los errores innatos de la inmunidad .....	20
4.1.2 Errores innatos de la inmunidad en el adulto .....	22
4.1.3 Errores innatos de la inmunidad humores .....	24
4.2 Inmunodeficiencia común variable (IDCV).....	25
4.2.1 Incidencia y prevalencia de la IDCV.....	25
4.2.2 Evolución de la clasificación de la IDCV.....	26
4.2.3 Criterios diagnósticos de la IDCV.....	29
4.2.4 Fisiopatología de la IDCV .....	30
4.2.5 Genética de la IDCV.....	31
4.2.6 Manifestaciones clínicas de la IDCV .....	31
4.2.6.1 Infecciones.....	31
4.2.6.2 Complicaciones autoinmunes .....	32
4.2.6.3 Linfadenopatías y esplenomegalia .....	32
4.2.6.4 Linfomas y cáncer .....	32
4.2.6.5 Complicaciones en el aparato respiratorio.....	32
4.2.6.6 Complicaciones en el aparato digestivo .....	33
4.2.7 Sub-clasificación de la IDCV según el fenotipo clínico.....	34
4.2.8 Tratamiento de la IDCV.....	35
4.2.9 Relación entre vacunación y la IDCV .....	36
4.2.10 Seguimiento de la IDCV .....	36
4.3 Estudio funcional de Linfocitos B .....	37
4.4 Inmunodeficiencias primarias en el contexto de la COVID-19 .....	40
4.4.1 Antecedentes de la pandemia por COVID-19.....	40
4.4.2 SARS-CoV-2: descripción general del virus y estructura.....	41
4.4.3 Enfermedad COVID-19 .....	42
4.4.4 Respuesta inmunitaria al virus .....	42
4.4.5 Enfermedad COVID-19 en pacientes con inmunodeficiencias .....	43
4.4.6 Vacunación contra el SARS-CoV-2 .....	44
4.5 Respuesta vacunal en las Inmunodeficiencias primarias .....	45

4.6 Inmunodeficiencia por déficit de CD8 $\alpha$ .....	47
5.- Objetivos .....	51
6.- Pacientes y métodos.....	53
6.1 Pacientes con IDCV y paciente con déficit de CD8 $\alpha$ .....	53
6.2 Obtención de muestras .....	53
6.3 Secuenciación de ADN por NGS .....	54
6.4 Determinación de anticuerpos específicos frente a S y específicos frente a N mediante ELISA.....	58
6.5 Determinación de anticuerpos neutralizantes .....	58
6.6 Determinación de la inmunidad celular de los Linfocitos T específica frente a S1 mediante FluoroSpot.....	59
6.7 Estimulación <i>ex vivo</i> de Linfocitos B.....	60
6.8 Citometría de flujo espectral y marcaje intracitoplasmático .....	62
6.9 Determinación de Linfocitos B específicos frente a RBD mediante EliSpot B .....	64
6.10 Análisis del transcriptoma de Linfocitos B.....	66
6.11 Análisis de citoquinas en el sobrenadante .....	67
6.12 Análisis estadístico .....	68
6.13 Aprobación ética .....	68
7.- Resultados .....	70
7.1 Descripción de los pacientes sometidos a estudio.....	70
7.1.1 Pacientes con IDCV.....	70
7.1.2 Paciente con deficiencia de CD8 $\alpha$ .....	94
7.3 Respuesta humoral y celular de los distintos subgrupos clínicos de pacientes con IDCV a la vacunación frente a SARS-CoV-2 .....	98
7.4 Magnitud de la respuesta inmunológica a la vacunación .....	99
7.5 Seguimiento de los pacientes tras vacunación.....	101
7.6 Respuesta humoral y celular de los pacientes con IDCV tras la vacunación de recuerdo .....	102
7.7 Caracterización del fenotipo y función de linfocitos B .....	103
7.7.1 Fenotipo linfocitario .....	103
7.7.1.1 Poblaciones celulares T .....	104
7.7.1.2 Poblaciones celulares B.....	107
7.7.1.3 Fenotipo tras seis días de cultivo .....	111
7.7.2 Producción de anticuerpos en el cultivo de estimulación.....	113
7.7.3 Análisis transcriptómico .....	114
7.7.4 Análisis de la producción de citoquinas postcultivo.....	124
7.8 Resultados en la paciente con déficit de CD8 $\alpha$ .....	125

8.- Discusión .....	128
9. Conclusions.....	141
10.- Bibliografía.....	144
11.- Artículos .....	168
12.- Anexo I.....	168
13.- Anexo II.....	169



# 1.- Abreviaturas

A/L: Autoinmunidad/Linfoproliferación

ACE2: Receptor de angiotensina 2

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

CO: Monóxido de carbono

COVID: Enfermedad por SARS-CoV-2

DO: Densidad óptica

EII: Error innato de la inmunidad

ESID: Sociedad Europea de Inmunodeficiencias

FDR: False discovery rate

FBS: Suero fetal bovino

GLILD: Enfermedad pulmonar intersticial granulomatosa-linfocítica

IDCV: Inmunodeficiencia común variable

IGIV: Inmunoglobulina intravenosa

IGSC: Inmunoglobulina subcutánea

ITR: Infecciones del tracto respiratorio

LB: Linfocito B

LT: Linfocitos T

LOCID: Inmunodeficiencia combinada de inicio tardío

MALT: Tejido linfoide asociado a mucosas

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

NGS: Secuenciación de nueva generación

PBMCs: Célula mononuclear de sangre periférica

Proteína M: Proteína de membrana del SARS-CoV-2

Proteína N: Proteína de nucleocápside del SARS-CoV-2

Proteína S: Proteína spike del SARS-CoV-2

SFU: Unidades formadoras de puntos

R848: Resiquimod (agonista TLR7 y TLR8)

RBD: Dominio de unión al receptor del SARS-CoV-2

RPM: Revoluciones por minuto

TH: Linfocito T helper

TLR: Toll like receptor

UMI: Identificador molecular único

VOUS: Variante de significado incierto



## 2.- Resumen

### RESPUESTA INMUNITARIA DE PACIENTES CON INMUNODEFICIENCIA COMÚN VARIABLE:

#### ESTUDIO EN EL CONTEXTO DE LAS NUEVAS VACUNAS PARA SARS-COV-2

**Introducción:** Los errores innatos de la inmunidad o inmunodeficiencias primarias implican en su gran mayoría un defecto a la hora de responder frente agentes patógenos. Además, los mecanismos de prevención mediante inmunización activa como son las vacunas suelen tener beneficios limitados en pacientes con enfermedades como la Inmunodeficiencia Común Variable (IDCV). Sin embargo, nuevas tecnologías vacunales han aparecido recientemente en el contexto de la pandemia por SARS-CoV-2, las cuales pueden presentar un mejor perfil que las vacunas previas en estos pacientes.

**Objetivos:** El objetivo principal de esta tesis es averiguar si la vacunación frente a SARS-CoV-2 con vacunas ARNm origina una adecuada inmunización en pacientes con IDCV y en una paciente con déficit de CD8 $\alpha$ . Adicionalmente, en los pacientes con IDCV se pretende analizar el fenotipo, transcriptoma y capacidades funcionales de los linfocitos B *in vitro* con el fin de comprender mejor su defecto.

**Materiales y métodos:** Se ha analizado una cohorte de 22 pacientes con IDCV, de los que se ha recogido su perfil clínico, analítico y genético y una paciente con déficit de CD8 $\alpha$ . Para valorar la respuesta de las vacunas ARNm, se analizó la respuesta humoral y celular frente a SARS-CoV-2 en 18 pacientes con IDCV tras la primera y segunda dosis de vacunación y se comparó con una cohorte de 50 controles sanos. Posteriormente, se realizó a 20 pacientes con IDCV un test funcional con estimulación inespecífica consistente en un cultivo de PBMC en presencia de IL2 y R848 de 10 días de duración, en el que se realizaron: test de Elispot, perfiles de citometría, análisis de sobrenadante (detección de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 y perfil de citoquinas generadas) y análisis de transcriptoma de los linfocitos B. Los resultados se compararon con los de 32 controles sanos. A la paciente con déficit de CD8 $\alpha$  se le determinó la respuesta humoral y celular tras la vacunación/infección y se realizó un marcaje intracitoplasmático para detectar qué células eran las responsables de la respuesta celular. Los resultados se compararon con 5 controles sanos.

**Resultados:** Después de completar la vacunación, el 83% de los pacientes con IDCV tenían anticuerpos específicos y el 83% tenían células T específicas frente al virus en comparación con el 100% y el 98% de los controles sanos ( $p = 0,014$  y  $p = 0,062$ , respectivamente), pero sólo se detectaron anticuerpos neutralizantes en el 50% de los pacientes. La potencia de las respuestas humorales y celulares fue significativamente menor en IDCV en comparación con los controles sanos. Las respuestas humorales y celulares ausentes o discordantes se asociaron con antecedentes previos de autoinmunidad y/o linfoproliferación.

Respecto al test funcional, se apreció que tras la estimulación inespecífica los pacientes con IDCV presentaban dos patrones con respecto al perfil de linfocitos B: uno minoritario que presentaba una distribución similar a los controles sanos, es decir, una mayor proporción de linfocitos B IgD-CD27+ (cambio de clase) y también un aumento del compartimento IgD-CD27- a costa de una seria reducción de linfocitos IgD+CD27- (naïve); y otro mayoritario con una prevalencia muy marcada de linfocitos IgD-CD27- con ausencia de cambio de clase. El perfil citométrico en algunos de estos pacientes fue similar a los de los controles si se analizaban de manera más temprana, en el sexto día de cultivo. Se encontró la presencia de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 en la mayoría de los sobrenadantes, incluyendo a ambos grupos de pacientes, pero en el ensayo de ELISPOT B se vio que a los 10 días no había ningún paciente que generase anticuerpos, tanto específicos frente a SARS-CoV-2 como IgG total (a diferencia de los controles). En el análisis transcriptómico se constató que, en comparación con los controles, los pacientes no generaban transcritos necesarios para la síntesis de inmunoglobulinas, mostrando además sobreexpresión de moléculas implicadas en rutas de muerte celular, señalización del BCR (destacando SYK, STAT3 y MS4A1) y señales inhibitorias. Es destacable el hecho de que los sobrenadantes de cultivos de los pacientes presentaban menor producción de IFN $\alpha$  y APRIL pero mayor producción de BTLA.

La paciente con déficit de CD8 $\alpha$  produjo una adecuada respuesta (tanto humoral como celular) que no se pudo aclarar si se debía a la infección o a la vacunación. En el marcaje intracitoplasmático de IFN- $\gamma$  se pudo observar que la distribución de la producción era similar a la de los controles sanos, es decir, no había diferencias en la proporción del tipo de células productoras de IFN- $\gamma$ .

**Discusión:** Existe una capacidad discordante para producir anticuerpos específicos y neutralizantes, lo que sugiere que la cantidad y calidad de la respuesta puede ser subóptima en sujetos con IDCV. Además, los pacientes con IDCV con manifestaciones autoinmunes/linfoproliferativas mostraron peor inmunogenicidad. Sin embargo, estos

resultados de respuesta inmunitaria a la vacunación de ARNm frente a SARS-CoV-2 son superiores a lo visto previamente con otras vacunas. Estos resultados son superiores a lo descrito con otros tipos de vacunas.

Con respecto al ensayo funcional, el hallazgo citométrico más significativo fue la polarización de los linfocitos B hacia el compartimento IgD-CD27-, que sumado a la ausencia de positividad en el ELISPOT B y la presencia de anticuerpos en el sobrenadante plantearía la posibilidad de que nos encontremos frente a células extenuadas. Dicha hipótesis se apoya también en los resultados del análisis transcriptómico y en el análisis citométrico a los 6 días de estimulación inespecífica.

La paciente con déficit de CD8 $\alpha$  mostraba una respuesta frente a SARS-CoV-2 similar a la de los controles sanos, por lo que se ha planteado que las células CD3+CD8- de la paciente puedan suplir funcionalmente la ausencia de las células CD3+CD8+ cuando se enfrenta al SARS-CoV-2.

#### **Conclusiones:**

1.-Los pacientes con IDCV presentan una mayor inmunogenicidad cuando se exponen a las vacunas ARNm contra el SARS-CoV-2 que lo descrito con vacunas previas, aunque su respuesta es subóptima en relación a la de los controles sanos

2.-Un posible mecanismo fisiopatológico de la IDCV es la extenuación temprana de los linfocitos B de los pacientes.

3.-Los linfocitos CD3+CD8- de una paciente con déficit de CD8 $\alpha$  pueden responder frente al SARS-CoV-2 de manera análoga a los linfocitos CD3+CD8+ de un control sano.



### 3.- Abstract

#### IMMUNE RESPONSE OF PATIENTS WITH COMMON VARIABLE IMMUNODEFICIENCY: STUDY IN THE CONTEXT OF THE NEW SARS-COV-2 VACCINES

**Introduction:** Inborn errors of immunity or primary immunodeficiencies mostly involve a defect when responding to pathogenic agents. Furthermore, prevention mechanisms through active immunization such as vaccines usually have limited benefits in patients with diseases such as Common Variable Immunodeficiency (CVID). However, new vaccine technologies have recently appeared in the context of the SARS-CoV-2 pandemic, which may present a better profile than previous vaccines in these patients.

**Objectives:** The main objective of this thesis is to find out if vaccination against SARS-CoV-2 with mRNA vaccines causes adequate immunization in patients with CVID and in a patient with CD8 $\alpha$  deficiency. Additionally, in patients with CVID, the aim is to analyse the phenotype, transcriptome and functional capacities of B lymphocytes in vitro in order to better understand their defect.

**Materials and methods:** A cohort of 22 patients with CVID has been analysed, of whom their clinical, analytical and genetic profile has been collected, and one patient with CD8 $\alpha$  deficiency. To assess the response of the mRNA vaccines, the humoral and cellular response to SARS-CoV-2 was analysed in 18 patients with CVID after the first and second dose of vaccination and compared with a cohort of 50 healthy controls. Subsequently, 20 patients with CVID underwent a functional test with nonspecific stimulation consisting of a PBMC culture in the presence of IL2 and R848 for 10 days, in which they were tested for: Elispot test, cytometry profiles, supernatant analysis (detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies and profile of generated cytokines) and transcriptome analysis of B lymphocytes. The results were compared with those of 32 healthy controls. In the patient with CD8 $\alpha$  deficiency, the humoral and cellular response was determined after vaccination/infection and intracytoplasmic labelling was performed to detect which cells were responsible for the cellular response. The results were compared with five healthy controls.

**Results:** After completing vaccination, 83% of CVID patients had specific antibodies and 83% had virus-specific T cells compared to 100% and 98% of healthy controls ( $p = 0,014$  and  $p = 0,062$ , respectively), but only neutralizing antibodies were detected in only 50% of patients. The

strength of humoral and cellular responses was significantly lower in CVID compared to healthy controls. Absent or discordant humoral and cellular responses were associated with a previous history of autoimmunity and/or lymphoproliferation.

About the functional test in CVID patients, it was noted that after non-specific stimulation the patients presented two profiles when regarding the B lymphocyte profile: a minority one that presented a distribution similar to healthy controls, that is, a greater proportion of IgD-CD27+ B lymphocytes (switch class) and also an increase in those of the IgD-CD27- compartment at the cost of a serious reduction in IgD+CD27- lymphocytes (Naïve); and another majority with a very marked prevalence of IgD-CD27+ lymphocytes with absence of switch class. Surprisingly, the cytometric profile in some of these patients was similar to those of controls if they were analysed at day 6 of culture. The presence of anti-SARS-CoV-2 antibodies was found in the majority of the supernatants, including both groups of patients, but in the ELISPOT B assay it was seen that after 10 days no patient generated antibodies, neither SARS-CoV-2 specific antibodies nor total IgG (unlike controls).. In the transcriptomic analysis, it was found that, compared to controls, patients did not generate transcripts necessary for the synthesis of immunoglobulins, also showing overexpression of molecules involved in cell death pathways, BCR signalling (highlighting SYK, STAT3 and MS4A1) and inhibitory signals. It is noticeable that the culture supernatants of the patients showed lower production of IFN $\alpha$  and APRIL but higher production of BTLA.

The patient with CD8 $\alpha$  deficiency produced an adequate response (both humoral and cellular) that could not be determined if it was due to the infection or the vaccination. In the intracytoplasmic labelling of IFN- $\gamma$  it could be observed that the distribution of production was similar to that of healthy controls.

**Discussion:** The development of humoral and cellular responses was slower in CVID patients compared to healthy controls. Furthermore, there is a discordant capacity to produce specific and neutralizing antibodies, suggesting that the quantity and quality of the response may be suboptimal in subjects with CVID. Furthermore, CVID patients with autoimmune/lymphoproliferative manifestations showed worse immunogenicity. However, these immune response to mRNA vaccination against SARS-CoV-2 results are superior to what was previously seen with other vaccines.

With respect to the functional assay, the most significant cytometric finding was the polarization of B lymphocytes towards the IgD-CD27- compartment, which, together with the absence of

positivity in the ELISPOT B and the presence of antibodies in the supernatant, would raise the possibility that these are exhausted (B) cells. This hypothesis is also supported by the results of the transcriptomic analysis and the cytometric analysis after 6 days.

The patient with CD8 $\alpha$  deficiency showed a response to SARS-CoV-2 similar to that of healthy. Therefore, it has been proposed that the patient's CD3+CD8- cells can functionally compensate for the absence of CD3+CD8+ cells when facing SARS-CoV-2.

**Conclusions:**

1.-Patients with CVID present greater immunogenicity when exposed to mRNA vaccines against SARS-CoV-2. They improve, compared to the results seen in previous vaccines, although their response is not suboptimal when compared with healthy controls.

2.-A possible pathophysiological mechanism of CVID is the early exhaustion of patients' B lymphocytes.

3.-The CD3+CD8- lymphocytes of a patient with CD8 $\alpha$  deficiency can respond in an analogous manner against SARS-CoV-2 when compared to the CD3+CD8+ lymphocytes of a healthy control.



## **4.- Introducción**

### **4.1 Errores innatos de la inmunidad**

En el ámbito de la Inmunología Clínica, las inmunodeficiencias primarias, o errores innatos de la inmunidad (EII) según su denominación actual, representan un reto continuo. Su fisiopatología, la dificultad para disponer de cohortes numerosas que sirvan a la investigación científica y las implicaciones, llamativas por su variedad y en ocasiones gravedad, hacen de estas patologías entidades muy complejas.

Por EII se conoce a un grupo de desórdenes genéticos que se manifiestan como defectos en la función o el número de los elementos del sistema inmune. En el momento en el que se escribe esta tesis doctoral se han descrito en la literatura científica más de 400 defectos moleculares que podrían ser clasificados como EII (1). Al ser un grupo tan amplio presenta una gran heterogeneidad clínica en su forma de presentación. Además, la edad de debut puede ser variable asociándose en muchos casos con un retraso significativo del diagnóstico. En este sentido, y dada la elevada morbimortalidad que presentan estos pacientes, es importante conocerlas para poder diagnosticarlas en forma precoz.

#### **4.1.1 Clasificación de los errores innatos de la inmunidad**

Históricamente, el Comité de Expertos en Inmunodeficiencia Primaria de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS) ha propuesto una clasificación de los síndromes que asocian defectos inmunitarios o inmunodeficiencias primarias (IDP) cada 2 años desde el año 1973 (2). Con el paso del tiempo nuevos defectos de la inmunidad se han ido incluyendo, creándose de esta manera nuevos grupos para su clasificación. Entre estos grupos de reciente creación encontramos a aquellos que condicionan principalmente la aparición de enfermedades autoinmunes, desregulación, linfoproliferación y malignidad hematológica. Por esta razón, en el 2019 la clasificación pasa a llamarse “Clasificación IUIS de EII” de 2019, siendo presidida en ese momento por Faith Osier (1).

En la última actualización de la clasificación de la IUIS los EII se subdividen en 10 grupos diferentes:

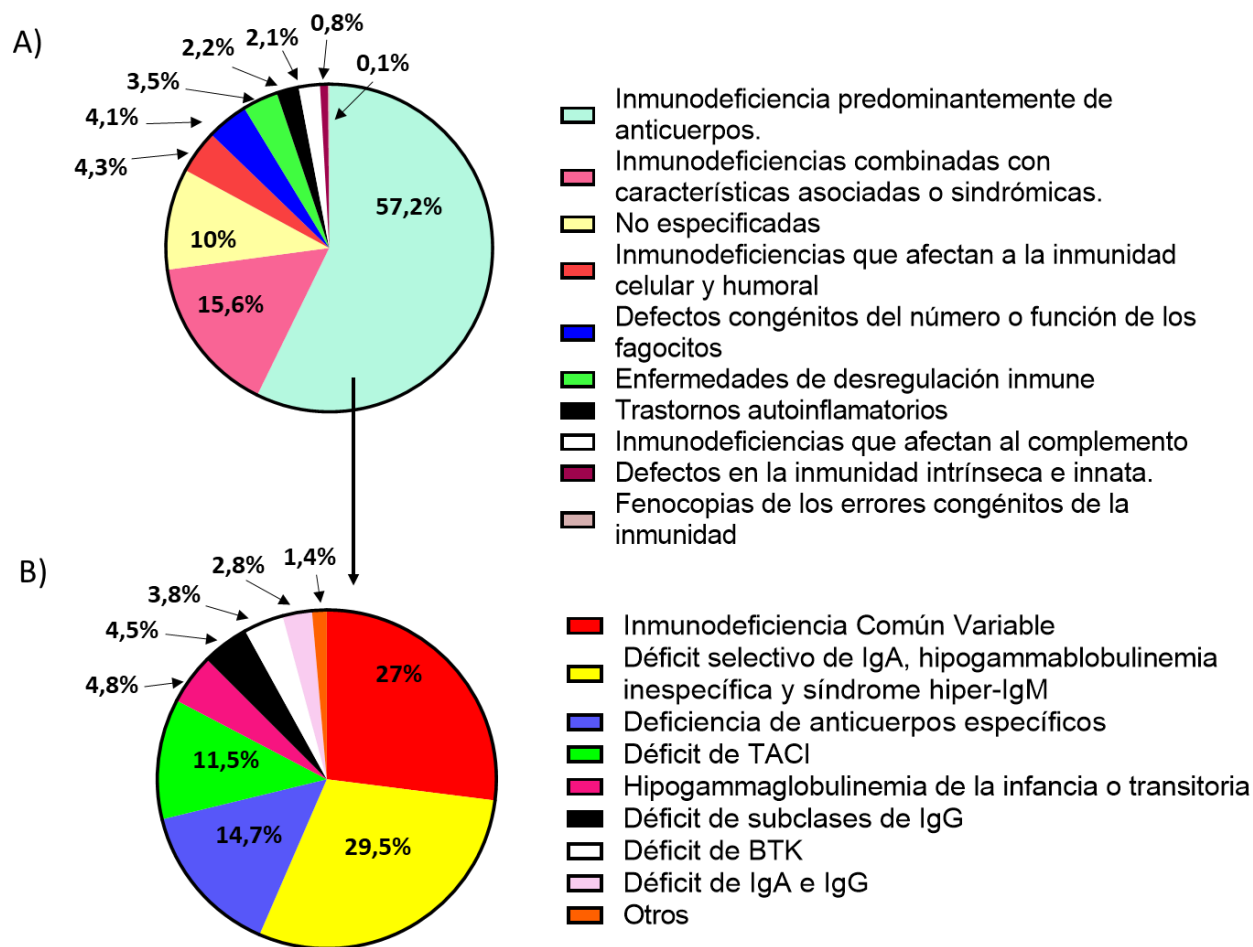
- 1.- Inmunodeficiencias que afectan a la inmunidad celular y humoral.
- 2.- Inmunodeficiencias combinadas con características asociadas o sindrómicas.
- 3.- Inmunodeficiencia predominantemente de anticuerpos.

- 4.- Enfermedades de desregulación inmune.
- 5.- Defectos congénitos del número o función de los fagocitos.
- 6.- Defectos en la inmunidad intrínseca e innata.
- 7.- Trastornos autoinflamatorios.
- 8.- Inmunodeficiencias que afectan al complemento.
- 9.- Fracaso medular.
- 10.- Fenocopias de los errores congénitos de la inmunidad

La clasificación divide las IDP en función del componente de la inmunidad afectado y las manifestaciones asociadas (Fig. 1.). Aquellas patologías que cursan con un defecto para producir anticuerpos (grupo 3) están englobadas en la categoría de inmunodeficiencias humorales, pero si además presentan un defecto a otro nivel en el desarrollo del linfocito, pertenecerán a una inmunodeficiencia combinada (grupos 1 y 2). También se abarcan las enfermedades asociadas a una excesiva activación del sistema inmunitario, ya que en ocasiones se emparejan manifestaciones de desregulación que compaginan la inmunodeficiencia con autoinmunidad (grupo 4) o en los que el estado de inmunodeficiencia es secundario a la presencia de autoanticuerpos, como en el grupo grupo 10 (fenocopias de enfermedades o patologías de origen somático). Existe además una categoría adicional para aquellas patologías que no implican un fenómeno de autoinmunidad, pero sí una inflamación indebida, calificándose de fenómenos autoinflamatorios (grupo 7).

Los defectos que median el reconocimiento de los patógenos mediante los mecanismos efectores de la inmunidad innata también cuentan con grupos propios, como la actividad de los fagocitos (grupo 5), así como, lo que implica incapacidad de enfrentarse a patógenos específicos (grupo 6). El complemento también puede presentar fallos en caso de la inadecuada producción de sus componentes (grupo 8). Por último, existe una categoría que engloba los defectos medulares, lo que implica un defecto en la producción de los linajes hematológicos (grupo 9).

En cuanto a la distribución por frecuencia poblaciones, el grupo mayoritario se corresponde con aquellas que producen un defecto en la producción de anticuerpos (3) (Fig. 1). De entre las inmunodeficiencias con déficit de producción de anticuerpos, destaca la Inmunodeficiencia Común Variable (IDCV), la agammaglobulinemia asociada al cromosoma X, o el déficit selectivo de IgA, entre otros.



**Figura 1.** Distribución de las inmunodeficiencias primarias reportadas por centros asociados a la Fundación Jeffrey Modell. A) Distribución por grupos de errores innatos de la inmunidad B) Distribución según los subgrupos diagnósticos de inmunodeficiencias humorales primarias. Adaptación de Gerber et al. (4). TACI: Activador transmembrana e interactivo CAML; BTK: Tirosín Kinasa de Bruton.

#### 4.1.2 Errores innatos de la inmunidad en el adulto

Las IDP son más prevalentes en la población infantil por ser en muchos casos debidas a defectos genéticos congénitos. Por esta razón los primeros casos descritos en la literatura fueron en pacientes pediátricos, condicionando la idea general de que estas patologías deben sospecharse únicamente en dicho grupo etario. A pesar de ello, tras mejorar en el reconocimiento de las IDP, el número de EII diagnosticados en el adulto ha ido incrementando. Un ejemplo es el de una de las primeras inmunodeficiencias descritas: la agammaglobulinemia ligada al cromosoma X o síndrome de Bruton, cuyo diagnóstico a partir de la sospecha clínica siempre se ha llevado a cabo en los primeros años de la infancia (5). Esta enfermedad fue descrita por primera vez en 1952, cuando Ogden Bruton identificó que la causa de las neumonías de repetición que padecía un

paciente de 8 años podía ser debida a la ausencia de gammaglobulinas detectables en sangre (6). Este paradigma ha cambiado en los últimos años, aumentando el número de casos de agammaglobulinemia ligada al cromosoma X diagnosticados en el adulto gracias a la secuenciación de nueva generación (NGS) (7), y generando una nueva recomendación de estudio genético en todos aquellos pacientes con sospecha de inmunodeficiencia humoral y menos de <1% de linfocitos B.

Además, en pacientes adultos, las infecciones recurrentes pueden deberse a otras causas adquiridas, como lesiones anatómicas, un trastorno funcional o una causa secundaria de inmunosupresión o inmunosenescencia. Los trastornos inmunitarios secundarios debidos a otras afecciones médicas o tratamientos para estas afecciones son una causa mucho más común de infecciones recurrentes que las inmunodeficiencias primarias. En los adultos podemos encontrar que la inmunodeficiencia ha debutado en edad adulta o que debutó en la infancia y el diagnóstico se produjo en la edad adulta (8). Hay enfermedades como la IDCV que muestran dos picos de inicio (en la infancia y la edad adulta).

Los avances técnicos en el diagnóstico, las nuevas inmunodeficiencias descubiertas y la mayor concienciación del mundo médico acerca de estas patologías han permitido avanzar en el diagnóstico de las mismas en etapas más avanzadas de la vida (9). Esto es fundamental para aquellas patologías cuyo conjunto de síntomas no se manifiesta al inicio de la vida, o sus síntomas no llegan a tener la suficiente intensidad como generar la sospecha (10).

La deficiencia de anticuerpos es el diagnóstico más común en la edad adulta, incluyendo patologías como la IDCV, deficiencia selectiva de inmunoglobulina A o IgA, deficiencia de anticuerpos específicos y deficiencia de subclases de inmunoglobulina G o IgG. Los adultos generalmente son remitidos para estudio debido a enfermedades como sinusitis o bronquitis crónica.

Las infecciones de repetición no deben considerarse normales en el adulto, ya que su sistema inmunitario debe ser suficientemente maduro y estar preparado para responder adecuadamente frente a patógenos, debiendo evitar que un mismo patógeno sea un problema permanente. Si se dieran infecciones de repetición causadas por un mismo patógeno sin causa desencadenante se debe sospechar de una inmunodeficiencia. El diagnóstico de las inmunodeficiencias en el adulto se puede retrasar tanto por una aparición tardía de síntomas, por la falta de conciencia de los médicos para las derivaciones oportunas, la presentación inusual de la enfermedad con diferente penetrancia o por la falta de infraestructuras sanitarias adecuadas (8).

#### **4.1.3 Errores innatos de la inmunidad humoral**

Las inmunodeficiencias humorales son un subgrupo de defectos de la inmunidad adaptativa que presentan predominantemente alteraciones en la producción de anticuerpos o inmunoglobulinas y en las células que producen los mismos (linfocitos B). Estas patologías conllevan principalmente una situación de desprotección frente a infecciones de predominio bacteriano. Sin embargo, entre las consecuencias de una mala producción de anticuerpos también se encuentra una mayor susceptibilidad a presentar fenómenos autoinmunes o manifestaciones oncológicas en algunos casos. Se excluyen de este grupo a aquellas inmunodeficiencias que presentan además alteraciones en la inmunidad celular (inmunodeficiencias combinadas) (11).

La inmunodeficiencia humoral más frecuente, sobre todo en población adulta es la inmunodeficiencia secundaria a tratamientos deplecionantes de anticuerpos o neoplasias hematológicas. Pero aun así existen otros defectos humorales relevantes tanto por su número de pacientes afectados como por las implicaciones en la salud. Entre los EII humorales se destacan:

- Déficit selectivo de IgA: la mayoría de estos pacientes son asintomáticos, pero algunos pacientes sufren diferentes complicaciones clínicas como infecciones pulmonares, alergias, enfermedades autoinmunes, trastornos gastrointestinales y neoplasias malignas. No existe un tratamiento específico para pacientes con deficiencia sintomática de IgA, aunque la terapia antibiótica profiláctica junto con el reemplazo circunstancial de inmunoglobulinas podría ser útil para pacientes con un fenotipo grave (12).
- Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X o enfermedad de Bruton: Es un trastorno ligado al cromosoma X caracterizado por una mayor susceptibilidad a bacterias encapsuladas, hipergammaglobulinemia grave y ausencia de Linfocitos B circulantes en la sangre periférica. La terapia de reemplazo con inmunoglobulinas es la piedra angular principal del tratamiento. Se necesita un manejo agresivo de las infecciones intercurrentes y antibióticos profilácticos (5).
- Inmunodeficiencias secundarias: Aunque no se incluyen dentro de las EII, son el defecto humoral más prevalente. Se producen debido a un agente desencadenante no genético, como fármacos, infecciones o cánceres. En numerosos casos no se llega a dilucidar completamente si nos encontramos frente a una inmunodeficiencia secundaria o a un EII, ya que, al presentar una clínica similar, es muy importante asegurar el orden cronológico de los hechos (es decir, confirmar que la presencia de inmunodeficiencia humoral es anterior o posterior al posible hecho desencadenante).

- Déficit selectivo de subclases
- Déficit de respuesta a antígenos específicos.
- Inmunodeficiencia común variable: Se describe en el apartado 4.2.

## **4.2 Inmunodeficiencia común variable (IDCV)**

La IDCV es una entidad ampliamente estudiada por los especialistas en Inmunología. Es una inmunodeficiencia humoral primaria cuya etiología reside en la disfunción de los linfocitos B sin ausencia de los mismos, pero que conlleva una disminución cualitativa y cuantitativa de producción de anticuerpos circulantes. Clínicamente estos defectos se traducen en un incremento de las infecciones, así como otros desórdenes tales como linfoproliferación, enteropatía o mayor propensión a los tumores (13).

Su primer reconocimiento como patología se produce en 1971, cuando la Organización Mundial de la Salud la propone para los pacientes con inmunodeficiencia cuya (sic) extraordinaria variabilidad de los hallazgos inmunológicos no podía clasificarse inequívocamente sobre la base de los criterios entonces existentes (14). Esto implica afrontar a la IDCV como una inmunodeficiencia primaria basada en la exclusión de otras inmunodeficiencias mejor conocidas y más concretas, como la agammaglobulinemia ligada al cromosoma X o las inmunodeficiencias secundarias. En lugar de una entidad única, es propicio considerar a la IDCV como un síndrome que abarca un grupo heterogéneo de fenotipos clínicos e inmunológicos, que pueden ser causados por diversos factores genéticos y/o ambientales.

Se puede definir a la IDCV como una inmunodeficiencia humoral primaria adquirida, la cual presenta unas características tanto clínicas como analíticas variables entre pacientes. Dicha variabilidad representa un obstáculo relevante a la hora de manejar esta patología, ya que tanto para el diagnóstico como el manejo terapéutico o el pronóstico no existe un perfil exclusivo. Actualmente, existen varias guías clínicas que proponen criterios diagnósticos de esta enfermedad.

### **4.2.1 Incidencia y prevalencia de la IDCV**

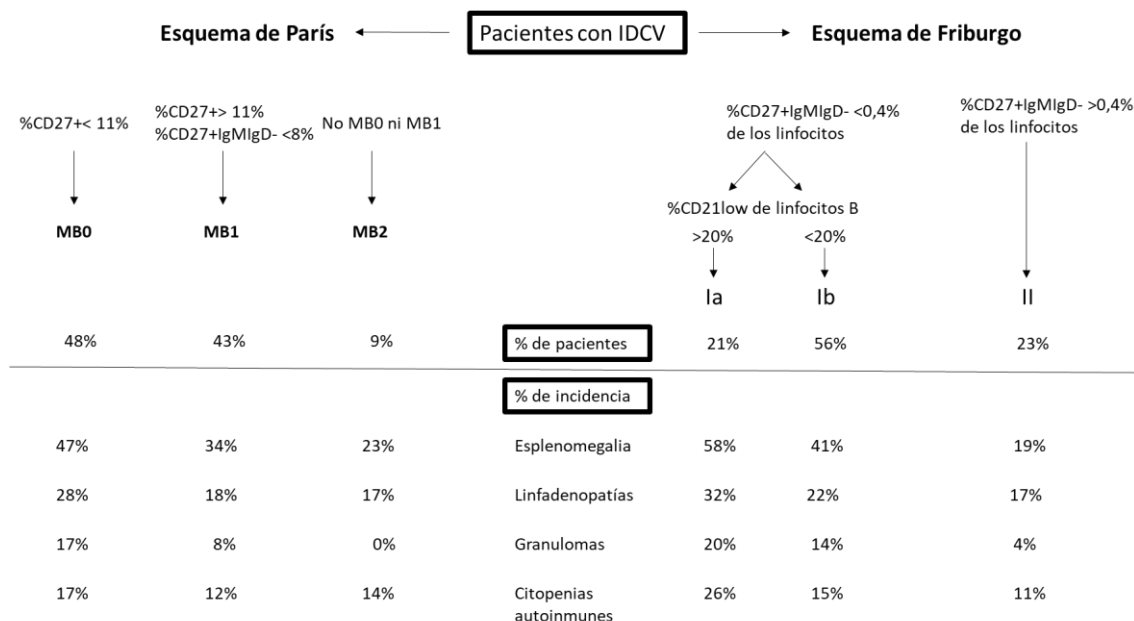
La IDCV es la inmunodeficiencia primaria sintomática más frecuente del mundo(15,16). Su incidencia descrita según un equipo es de 0,019 por cada 100.000 personas al año (17), pero según el análisis de la red de centros Jeffrey Modell la incidencia puede variar entre países, pudiendo deberse tanto a una causa poblacional como a la diferente concienciación acerca de esta enfermedad. En cuanto a su prevalencia oscila entre 1 y 4 personas afectadas por cada

100.000 individuos dependiendo del país, según estudios tanto europeos (18–20) como globales (3).

#### **4.2.2 Evolución de la clasificación de la IDCV**

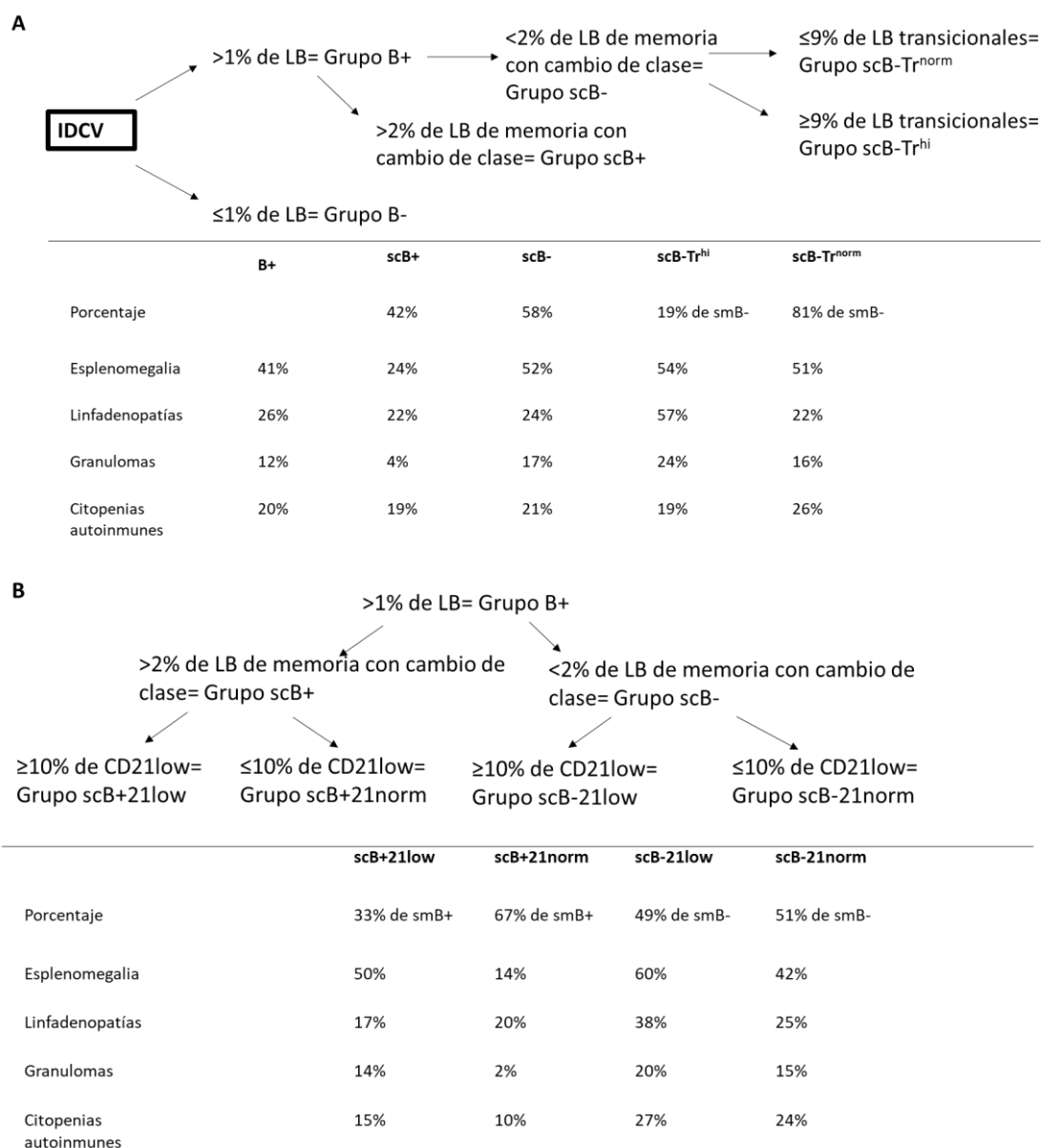
Con el objetivo de conocer y caracterizar la IDCV en el laboratorio, distintos grupos han realizado esfuerzos con los que ha sido posible conocer el fenotipo clínico y analítico del paciente para prever sus posibles complicaciones y tratarlo. Inicialmente se intentaba encuadrar las distintas presentaciones clínicas de los pacientes según criterios comunes. Es así como surgen las siguientes clasificaciones:

- Bryant et al. (21) en 1990 propusieron una clasificación de la IDCV basada en la respuesta *in vitro* de los pacientes diagnosticados en función de la presencia de anticuerpos IgG o IgM.
- En 1999 se describieron los primeros criterios diagnósticos de varias inmunodeficiencias, incluida la IDCV, por la Sociedad Europea de Inmunodeficiencias (ESID) y el Grupo Panamericano de inmunodeficiencias (PAGID) (22).
- Posteriormente, en el 2002, se propone la clasificación de Friburgo (23) como una forma de clasificar a los pacientes en función de su población B con cambio de clase (SC, CD27+IgM-IgD-) y de su expresión de CD21<sup>low</sup>. En función de si dichas poblaciones estaban alteradas, la probabilidad de presentar síntomas (como autoinmunidad, linfoproliferación, etc.) aumentaría según esta clasificación (Fig. 3).
- El esquema de París (24) propuso que la asociación entre poblaciones celulares propuestas por Friburgo y síntomas asociados debería tener en cuenta exclusivamente a las poblaciones B cambio de clase (Fig. 2).



**Fig. 2.** Adaptación de la comparación entre los esquemas de Friburgo y París. Asociación entre las diferentes manifestaciones clínicas y subgrupo según citometría en la cohorte del ensayo (23,24).

- En el ensayo de Euroclass realizado en 2007 (25), Wehr et al. comparan los esquemas de Friburgo y de París para después elaborar una síntesis de ambos esquemas en los que se tiene en cuenta el porcentaje de linfocitos B, el porcentaje de linfocitos B con cambio de clase, porcentaje de linfocitos B transicionales y CD21low. El interés en estas subpoblaciones radica en la importancia de las mismas en varios procesos autoinmunes: los linfocitos B cambio de clase son agentes especializados en producir anticuerpos específicos frente antígenos a los que han sido expuestos, por lo que su implicación en la respuesta humoral es muy relevante; los linfocitos B transicionales son células medianamente diferenciadas que sufren procesos de selección negativa para evitar la producción de autoanticuerpos y linfoproliferación (26,27); y los linfocitos B CD21low es una subclase que se asocia a procesos inflamatorios crónicos y pueden producir autoanticuerpos (28,29). Dependiendo de que dichos porcentajes estén alterados con respecto a la población general los pacientes con IDCV tendrán una mayor predisposición a padecer diferentes manifestaciones (Fig. 3).



**Fig. 3.** Esquema de clasificación de la IDCV según EUROClass. Asociación entre las diferentes manifestaciones clínicas y subgrupo según citometría en la cohorte del ensayo. scB: Linfocito B con cambio de clase; Tr: transicional (25).

- El equipo de Grimbacher desarrolló en 2011 una escala de gravedad (de 0 a 3) basada en una lista de 15 complicaciones, definiendo de esta manera el perfil clínico de los pacientes (30).
- En 2013, Ameratunga y colaboradores propusieron un esquema de diagnóstico y de tratamiento basándose tanto en datos clínicos como analíticos (31). Sería posteriormente en el año 2019 cuando estas sugerencias fueron recogidas en los criterios diagnósticos de la enfermedad por la ESID (32).

- No sólo se ha intentado clasificar con criterios clínicos y analíticos. En función de la cantidad de KREC y TREC, el equipo de Nonoyama describió que los pacientes se podían dividir en cuatro grupos, los cuales presentaban características diferenciadas del resto (33).
- A estas clasificaciones se le añadió otra adicional según el perfil proteómico (34).
- Por último, recientemente han aparecido escalas que permiten estimar el pronóstico según las manifestaciones clínicas y los perfiles de riesgo de los pacientes, como la escala VISUAL, específica de IDCV del equipo de Sánchez Ramón (35) o la escala IDDA2.1 “Kaleidoscope”, genérica de inmunodeficiencias primarias del equipo de Benesch (36).

#### **4.2.3 Criterios diagnósticos de la IDCV**

Con el objetivo de estandarizar el diagnóstico de la IDCV, uno de los criterios diagnósticos más utilizado son los propuestos por la ESID (32). El diagnóstico de la enfermedad ha variado conforme han pasado los años, como se acaba de describir en el apartado anterior. Los criterios de la ESID permiten diagnosticar la enfermedad abarcando tanto antecedentes clínicos, perfil analítico y antecedentes familiares (Fig. 4).

Al menos **uno** de los siguientes:

- Mayor susceptibilidad a la infección
- Manifestaciones autoinmunes
- Enfermedad granulomatosa
- Linfoproliferación policlonal inexplicable
- Miembro de la familia afectado con deficiencia de anticuerpos

Y

-Disminución marcada de IgG  
-Disminución marcada de IgA con o sin niveles bajos de IgM (medidos al menos dos veces; <2SD de los niveles normales para su edad).

Y

Al menos **uno** de los siguientes:

- Respuesta deficiente de anticuerpos a las vacunas (y/o isohemaglutininas ausentes); es decir, ausencia de niveles protectores definidos a pesar de la vacunación
- Células B de memoria con cambio de clase bajas (<70 % del valor normal relacionado con la edad).

Y

-Se han excluido causas secundarias de hipogammaglobulinemia (p. ej., infección, pérdida de proteínas, medicación, malignidad).  
-El diagnóstico se debe establecer después del cuarto año de vida (aunque los síntomas pueden estar presentes antes)  
-No hay evidencia de deficiencia profunda de células T, definida como 2 de los siguientes (rango de edad en años):

- Números de CD4/microlitro: < 300 (2-6), < 250 (6-12), < 200 (<12).
- % de CD4 naïve sobre el total de CD4: < 25% (2-6), < 20% (6-16), < 10% (>16)
- Proliferación de células T ausente.

Fig. 4. Adaptación de los criterios diagnósticos de la IDCV según la ESID (32).

#### 4.2.4 Fisiopatología de la IDCV

Existen aspectos desconocidos sobre la fisiopatología de la IDCV. Esto es debido a que el mecanismo implicado varía de un paciente a otro.

Al no conocer exactamente la etiología, se ha intentado conocer qué piezas del sistema inmunitario presentan defectos. Se han descrito fallos en pacientes con IDCV en linfocitos B (sobre todo en los compartimentos de memoria) (37–40); en los linfocitos T (en los compartimentos de memoria como los extenuados (41–43), en los compartimentos T cooperadores (44,45) y cooperadores foliculares (cTFH), (46,47); en ambos linajes T y B (48–50); o en otras células, como las dendríticas (51,52).

A nivel genético, existen varias mutaciones que están asociadas a esta patología. Sin embargo, estas abarcan el 10-20% de los casos con IDCV, por lo que no existe de momento una explicación exclusivamente genética (53,54). En función del gen afectado, se puede inferir la repercusión clínica que puede tener el paciente, por lo que su estudio es conveniente para establecer pronósticos o decidir tratamientos (55,56).

#### **4.2.5 Genética de la IDCV**

Actualmente solo parte de los pacientes pueden ser explicados por una mutación monogénica que implique el diagnóstico de IDCV. Sin embargo, sí que existe un conjunto de genes afectados por variantes las cuales se han descrito en la literatura como asociadas a la IDCV (55,57). Además, se han descrito variantes genéticas modificadoras de la enfermedad, esto es, que pueden empeorar la presentación clínica o la gravedad de la IDCV, como es el caso de las mutaciones en TNFSF13B (activador transmembrana moduladora del calcio que interacciona con el ligando de ciclofilina) (58).

#### **4.2.6 Manifestaciones clínicas de la IDCV**

Tal como sugiere el nombre de síndrome, se ha descrito que la presentación clínica de estos pacientes varía con un amplio espectro de manifestaciones clínica y analíticas (Fig. 5). Cada individuo puede presentar un conjunto de síntomas casi exclusivo de su persona tanto en variedad como en intensidad. Las manifestaciones implicadas son:

##### **4.2.6.1 Infecciones**

Las manifestaciones clínicas más frecuentes y relevantes al inicio son las infecciones de repetición, las cuales suponen la principal causa de morbilidad tanto por su número como por su intensidad. Los principales agentes patógenos suelen ser bacterias como el *Haemophilus Influenzae* o el *Streptococcus Pneumoniae*, aunque pueden acompañarse de otras bacterias como *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* o *Ureaplasma Urealyticum*, así como virus tales como enterovirus, rinovirus o adenovirus (59,60).

#### 4.2.6.2 Complicaciones autoinmunes

Las manifestaciones autoinmunes afectan a varios órganos y sistemas, en mayor medida desde el punto de vista hematológico, donde destacan tanto la trombocitopenia como la anemia autoinmune (61). Puede afectar además al aparato locomotor en casos de enfermedades autoinmunes sistémicas (62–64), o autoinmunidad dirigida contra las glándulas del sistema endocrino (65,66) o nervioso (67).

Una complicación añadida es que las manifestaciones autoinmunes pueden ser diagnosticadas previamente a la IDCV. Es conveniente plantear la posibilidad de que subyazca esta enfermedad antes de se aplique el tratamiento inmunosupresor, ya que dicho tratamiento sembraría la duda si la situación de inmunodeficiencia es debida a una causa primaria o al tratamiento.

#### 4.2.6.3 Linfadenopatías y esplenomegalia

Es posible que los pacientes con IDCV presenten linfoproliferación, que se puede manifestar como presencia de adenopatías, sin que éstas representen una patología hematológica subyacente (68). De manera análoga, puede aparecer esplenomegalia en estos pacientes (69,70). Las causas de estas manifestaciones no están del todo claras, pero se ha descrito como un posible marcador de actividad inflamatoria (71) tanto de manera aislada como en el contexto de la formación de granulomas (72). Para validar este respecto, se esperan encontrar biomarcadores más precisos que con el fin de confirmar esta teoría.

#### 4.2.6.4 Linfomas y cáncer

La IDCV está también asociada a procesos oncológicos, tanto de tumor sólido como a tumores hematológicos tales como los leucemias (70) o linfomas (73). Es por lo tanto muy importante valorar si la manifestación del paciente es benigna o maligna, ya que los diagnósticos de linfoma se pueden confundir con la linfoproliferación benigna. Adicionalmente, existe una mayor proporción de tumores sólidos en estos pacientes (74), algunos explicados por la susceptibilidad a ciertos microorganismos, la cual puede favorecer la infección por *Helicobacter Pylori* y esta a su vez favorecer la aparición del linfoma MALT (75), y otros sin implicación directa (Fig. 5).

#### 4.2.6.5 Complicaciones en el aparato respiratorio

Las afecciones pulmonares conllevan un gran número de ingresos y se asocian a mayor mortalidad en los pacientes con IDCV (76,77). En un estudio previo realizado en 224 pacientes,

el 34% tenía enfermedad pulmonar crónica en el momento del diagnóstico, cifra que aumentó al 46% tras 11 años de seguimiento (78).

El daño pulmonar en la IDCV viene dado por dos mecanismos principales: lesión secundaria a infecciones agudas o recurrentes y daño debido a procesos inmunomediados. Por su frecuencia, la manifestación de daño pulmonar más reconocida es la bronquiectasia, presente hasta en un 60% de los pacientes (79). Estas se observan en mayor medida en sujetos de mayor edad. También se puede objetivar un daño en forma de enfermedad pulmonar intersticial, en sujetos más jóvenes, que a menudo tienen antecedentes de citopenias autoinmunes, niveles elevados de IgM sérica y recuentos más bajos de células T CD3 (80,81). La enfermedad pulmonar intersticial puede incluir infiltrados linfocíticos con o sin granulomas.

En pacientes con IDCV y patrón obstructivo en la espirometría es conveniente descartar el antecedente de asma. En el caso de cambios restrictivos en las pruebas de función pulmonar se deberá descartar la presencia de infiltrados linfocíticos, granulomatosos o ambos. Otras causas de cambios restrictivos incluyen tapones mucosos o restricción posquirúrgica.

Una complicación relevante y característica de la IDCV es la "enfermedad pulmonar intersticial granulomatosa-linfocítica" (GLILD, por sus siglas en inglés) que requiere para su confirmación de una biopsia de pulmón con afectación intersticial linfocítica y granuloma (82,83). Por lo general, se presenta en pacientes entre 20 y 50 años con el desarrollo gradual de disnea de esfuerzo con tos nueva o alterada, aunque algunos pacientes son asintomáticos cuando se detectan por primera vez los hallazgos característicos en las imágenes del tórax. La GLILD es más común en sujetos con IDCV con antecedentes de citopenia autoinmune, hiperesplenismo, poliartritis y función pulmonar restrictiva. En ocasiones, el fenotipo GLILD puede carecer de la presencia de granulomas, pero manteniendo una inflamación granulomatosa no necrotizante, neumonitis intersticial linfoide, hiperplasia linfoide, bronquiolitis folicular, neumonía organizada o fibrosis intersticial. Este fenotipo se denomina ILD y es necesario diferenciarlo de un linfoma (84).

#### 4.2.6.6 Complicaciones en el aparato digestivo

A nivel digestivo, se han descrito alteraciones hepáticas, gástricas e intestinales. El principal trastorno hepático es la hiperplasia regenerativa nodular, cuya causa aún no está clara y para la que aún no existe tratamiento. En un estudio brasileño (85) un tercio de los pacientes tenían enfermedad hepática (que abarcaba esplenomegalia, trombocitopenia y varices esofágicas) y algo más del 10% hepatomegalia. En el mismo estudio se describió infiltración linfocítica duodenal, que es otra posible afectación de los pacientes con IDCV. A este nivel destacan

manifestaciones como la diarrea, la pérdida de peso y la malabsorción, así como la posible aparición de atrofia vellosa y pólipos duodenales (86).

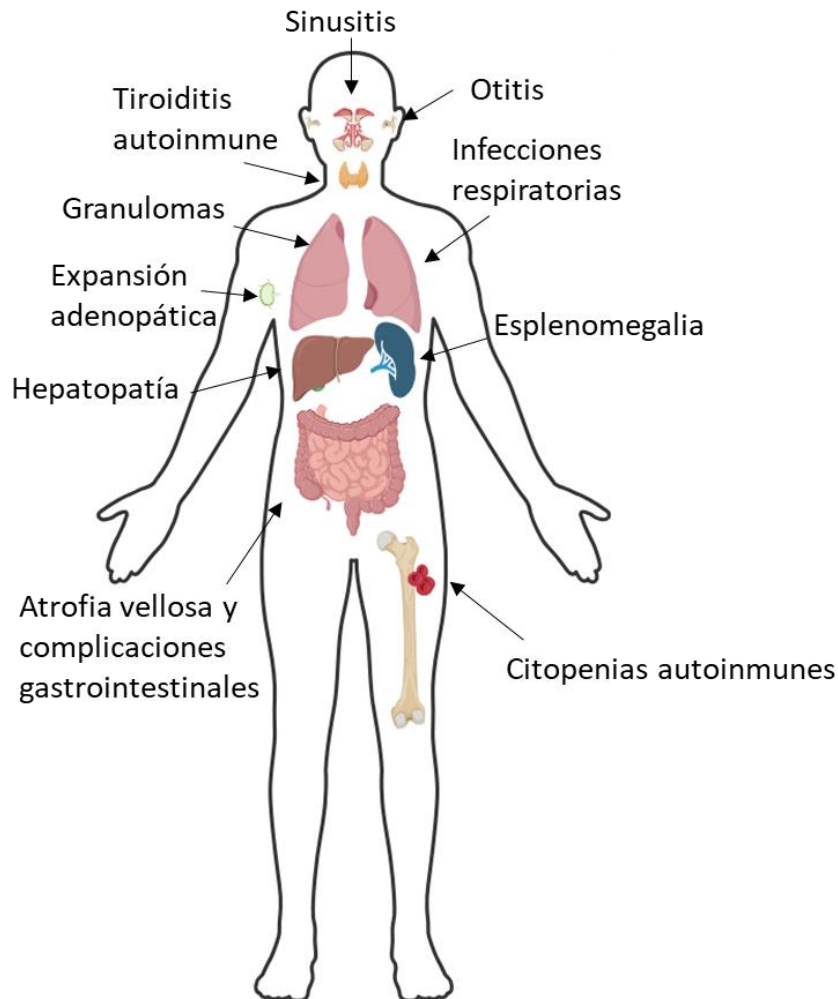


Fig. 5. Manifestaciones clínicas de la IDCV según su distribución por órganos. Adaptación de Park *et al* (87).

#### 4.2.7 Sub-clasificación de la IDCV según el fenotipo clínico

Dada la complejidad y variedad de síntomas asociados a la IDCV, se puede clasificar a los pacientes según la gravedad de su perfil clínico. Cunningham-Rundles propone clasificarlos clínicamente en dos grupos: aquellos que sólo presentan infecciones de repetición y aquellos que presentan complicaciones añadidas. Esta clasificación tiene relevancia clínica debido a que los pacientes del segundo grupo sufren un peor manejo de los síntomas y presentan peor pronóstico (88,89). En estos estudios se ha demostrado que la morbimortalidad de los pacientes que han presentado otras manifestaciones adicionales a las infecciosas es superior. Aun así, los

pacientes que sólo presentan infecciones pueden desarrollar con los años otras manifestaciones, lo que modificaría también el pronóstico.

En algunos pacientes el diagnóstico de IDVC pueden acompañarse de entidades descritas como complicaciones propias de esta IDP, como por ejemplo la enfermedad pulmonar intersticial granulomatosa-linfocítica o GLILD por sus siglas en inglés, descrita en el apartado 4.2.6.5 (90–92). Estos pacientes presentan complicaciones asociadas a estos granulomas, como una peor función respiratoria o cuadros más severos de esplenomegalia.

Otro ejemplo sería el diagnóstico de inmunodeficiencia combinada de inicio tardío o LOCID según sus siglas en inglés. Los pacientes con LOCID son aquellos que habiéndose diagnosticado inicialmente de IDCV, comienzan a desarrollar una linfopenia T. Presentan un riesgo aumentado de manifestaciones clínicas no infecciosas y de infecciones no humorales, como el aumento de la incidencia de esplenomegalias, granulomas, patología gastrointestinal y linfomas (93).

#### **4.2.8 Tratamiento de la IDCV**

El tratamiento generalmente consiste en administrar inmunoglobulina intravenosa (IGIV) o subcutánea (IGSC) como compensación al defecto de producción de anticuerpos (78,94). La dosis inicial habitual de IGIV en pacientes con IDCV es de 400 a 600 mg/kg cada tres o cuatro semanas. Se puede añadir premedicación con antihistamínicos o analgésicos en caso de que sea necesario. Los pacientes que están infectados activamente en el momento de la infusión inicial tienen más probabilidades de experimentar síntomas adversos durante la infusión, por lo que, cuando es posible, se busca tratar la infección antes de administrar la inmunoglobulina. Es posible que se requieran dosis más altas en pacientes con bronquiectasias y en aquellos con enteropatía perdedora de proteínas.

Adicionalmente y en función de la clínica, se pueden añadir tratamientos como antibióticos para infecciones concurrentes; antibioterapia profiláctica para aquellos que persisten con infecciones a pesar del tratamiento sustitutivo, los cuales se pueden pautar además de manera profiláctica (se recomienda aplicar la antibioterapia más adecuada al tipo de patógeno, por lo que el historial de aislamientos previos es de gran utilidad) (95–97); los inmunosupresores para el manejo de la autoinmunidad/linfoproliferación (98); y las terapias que requieran los distintos procesos oncológicos, como la eliminación del *H. Pylori* cuando el paciente padece un linfoma MALT gástrico(99), siendo el resto de cánceres tratados según las guías recomendadas.

#### **4.2.9 Relación entre vacunación y la IDCV**

La vacunación en pacientes con IDCV se emplea para el diagnóstico de los pacientes (ver apartado 4.2.3). El procedimiento consiste en cuantificar tras una dosis de vacunación los niveles de IgG específica frente antígenos vacunales como *Streptococcus Pneumoniae*, la *Salmonella Typhi* o el toxoide tetánico. Niveles considerados no protectores de IgG serían un criterio para el diagnóstico de IDCV.

Su utilidad en la prevención de infecciones puede ser muy limitada dado el perfil de la enfermedad. Por definición, los pacientes con IDCV presentan una inadecuada respuesta humoral a la mayoría de las vacunas, propia de defectos en la maduración o cambio de clase del linfocito B. A pesar de ello la vacunación podría reforzar la inmunidad de las células T a los agentes virales, como lo demuestran las respuestas mejoradas de las citocinas de las células T, además de inducir la formación de anticuerpos específicos. Este último mecanismo puede conservarse en algunos pacientes con IDCV, ya que existe un rango de capacidad inmunológica en este trastorno. Por ambos motivos, se aconseja administrar de forma rutinaria la vacuna contra la gripe inactivada a pacientes con IDCV. Las pautas generales de vacunación también respaldan esta práctica (100,101). Existe además controversia acerca de la efectividad de distintas pautas vacunales frente a otros virus, como la vacuna frente al virus del papiloma humano, lo cual requerirá de estudios para establecer pautas de intervención adecuadas (102). Con respecto al calendario vacunal infantil, al ser una patología con diagnóstico limitado a partir de los cuatro años, implica que las dosis comprometidas son algunas de refuerzo, por lo que en un inicio temprano cabría esperar la posibilidad de una insuficiente efectividad de dichas dosis.

#### **4.2.10 Seguimiento de la IDCV**

El seguimiento se dirige a controlar los niveles de inmunoglobulinas mediante la determinación en el momento valle (una determinación justo anterior a la infusión de nueva dosis) para valorar la dosis de inmunoglobulina intravenosa y por otro lado prevenir las complicaciones.

De la misma manera que se requiere para el diagnóstico, durante el seguimiento es importante detectar variaciones en la distribución de los linfocitos B, sobre todo en cuanto al número de células con cambio de clase o detectar aumentos en el número de linfocitos CD21low. Estos marcadores permiten determinar el riesgo de posibles complicaciones. También es recomendable realizar determinaciones de anticuerpos (ANAs, ANCAs, factor reumatoide, anticuerpos anti-transglutaminasa IgA, etc.) o marcadores tumorales ( $\beta$ 2 microglobulina) en el caso de que aparezca clínica sugerente. En el caso de la linfoproliferación benigna y la esplenomegalia no hay unas claras indicaciones para determinar su pronóstico. Sin embargo, se

está estudiando la posibilidad de emplear como biomarcador de progresión de dichos el CD25s o el seguimiento ecográfico. Con el objetivo de prevenir las complicaciones, se establece que los pacientes deben realizarse TAC cada cierto tiempo (ajustado al perfil clínico de los pacientes, aumentando la frecuencia si hay clínica de neumonías de repetición, bronquiectasias, granulomas, etc.), pruebas respiratorias funcionales anuales con difusión de CO y el test del aliento para detectar infecciones por *Helicobacter pylori*.

### **4.3 Estudio funcional de Linfocitos B**

Los estudios funcionales son una herramienta que pueden indagar acerca de qué mecanismo fisiopatológico está detrás de que linfocitos que previamente no respondían a la vacunación convencional sí que respondan frente a la nueva tecnología vacunal basada en ARNm, la cual se administró por primera vez a nivel global en la lucha contra la pandemia causada por SARS-CoV-2.

Existen varias formas de evaluar la función de los linfocitos B mediante la estimulación de los mismos con el objetivo de comprobar frente a qué antígenos son capaces de responder y de qué forma lo hacen. Por esta razón, la elección del cultivo de estimulación se fundamenta en la capacidad de generar la mayor proporción posible de linfocitos B de memoria y anticuerpos. Entre los ensayos que se han descrito en este sentido se encuentran la estimulación celular mediante cocultivos con linfocitos T (103), el uso de ligandos de coestimulación, citoquinas e interleucinas, como CD40L (104,105), IL2 (106), IL21 (107) o agonistas de diversos Toll Like Receptors (TLR) como TLR9 (108).

Se ha comprobado que la estimulación de linfocitos B con esas combinaciones es adecuada para medir las citoquinas que producen (109), la clonalidad (110) o la producción de anticuerpos (111,112).

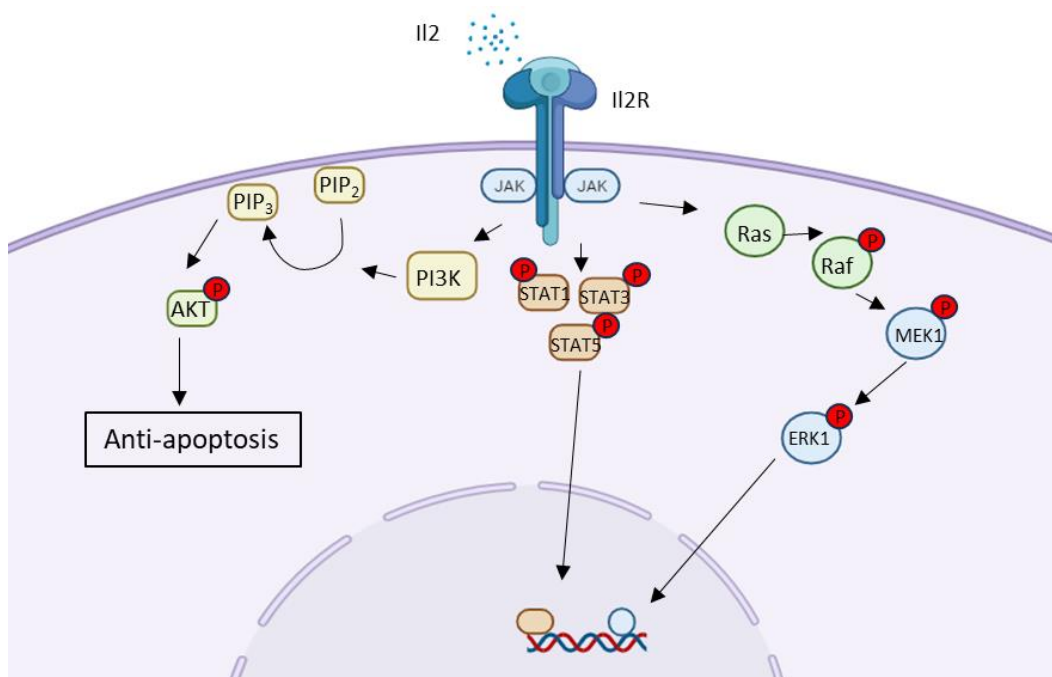
En los ensayos de estimulación citados, podemos observar cómo cada vía de activación ha servido para favorecer la proliferación y secreción de anticuerpos por parte de los linfocitos B. Wen *et al.* mostraron que el cocultivo de linfocitos B con EL4 (células derivadas de timoma) permitía que esos linfocitos B proliferaran y realizaran una respuesta policlonal en forma de IgM o IgG (103). El estímulo con IL21, CD40L y TLR9 provoca una cascada de estimulación siguiendo las rutas asociadas al estímulo del BCR que desembocan en mayor expresión de c-MYC y p-S6, factores asociados a la proliferación y actividad de los linfocitos B de centro germinal (105, 107, 108(107)). El empleo de IL2 induce tanto la proliferación como la función de los linfocitos B mediante activación de varias vías (106), las cuales se explicarán más adelante.

Como se ha recogido, existen varias técnicas que permiten el estudio funcional de los linfocitos B. Para seleccionar cuál de los estímulos es el más adecuado para aplicar en una cohorte de pacientes inmunodeprimidos, sería adecuado seleccionar aquellos reactivos que produzcan una mayor cantidad de linfocitos B de memoria y de anticuerpos no clonales, por lo que se realizó una búsqueda de ensayos en los que se comparasen los diferentes cultivos de estimulación.

Según los experimentos realizados por Karahan et al. (113–115), la combinación de resiquimod/R848 (ligando de TLR7 y TLR8) junto con la IL2 como estímulos de un cultivo de PBMCs sería la óptima para generar linfocitos B de memoria y plasmablastos junto con la producción de anticuerpos. Teniendo en cuenta estos ensayos comparativos, en este trabajo se eligió como cultivo idóneo la estimulación de PBMCs con IL2 y R848 para analizar la función de linfocitos B en los pacientes con IDCV.

El mecanismo de acción de dicha combinación sobre las PBMC se debe a la señalización producida por ambas moléculas:

- La IL2 es una citoquina que interviene en el desarrollo, proliferación y diferenciación de los linfocitos B, así como de la producción de anticuerpos (106,116). Su mecanismo de acción consiste en la unión a su receptor (formado por un trímero de cadenas alpha, beta y gamma, conocidas también como CD25, CD122 y CD132) para así activar una cascada de señalización a través de ERK/ELK1 (117), PI3K-AKT y MAPK(118), entre otros (Fig. 6).



**Fig. 6.** Rutas de señalización de la IL2. Adaptación del esquema ilustrado por R&D Systems (119)

- TLR7 es un receptor intracitoplasmático con afinidad principalmente por moléculas de ARN monocatenario (120). Su señalización se inicia a través de MyD88 e IRAK4, lo que permite activar las rutas MAPK,  $i\text{KK}\alpha/i\text{KK}\beta$  y TRAF3. Los efectos de estas vías en el linfocito B provocan una mayor diferenciación hacia plasmablastos (121) y producción de anticuerpos (122). En pacientes con IDCV se ha descrito una posible disfuncionalidad del receptor para inducir la producción de  $\text{IFN}\alpha$ (109) (Fig. 7).

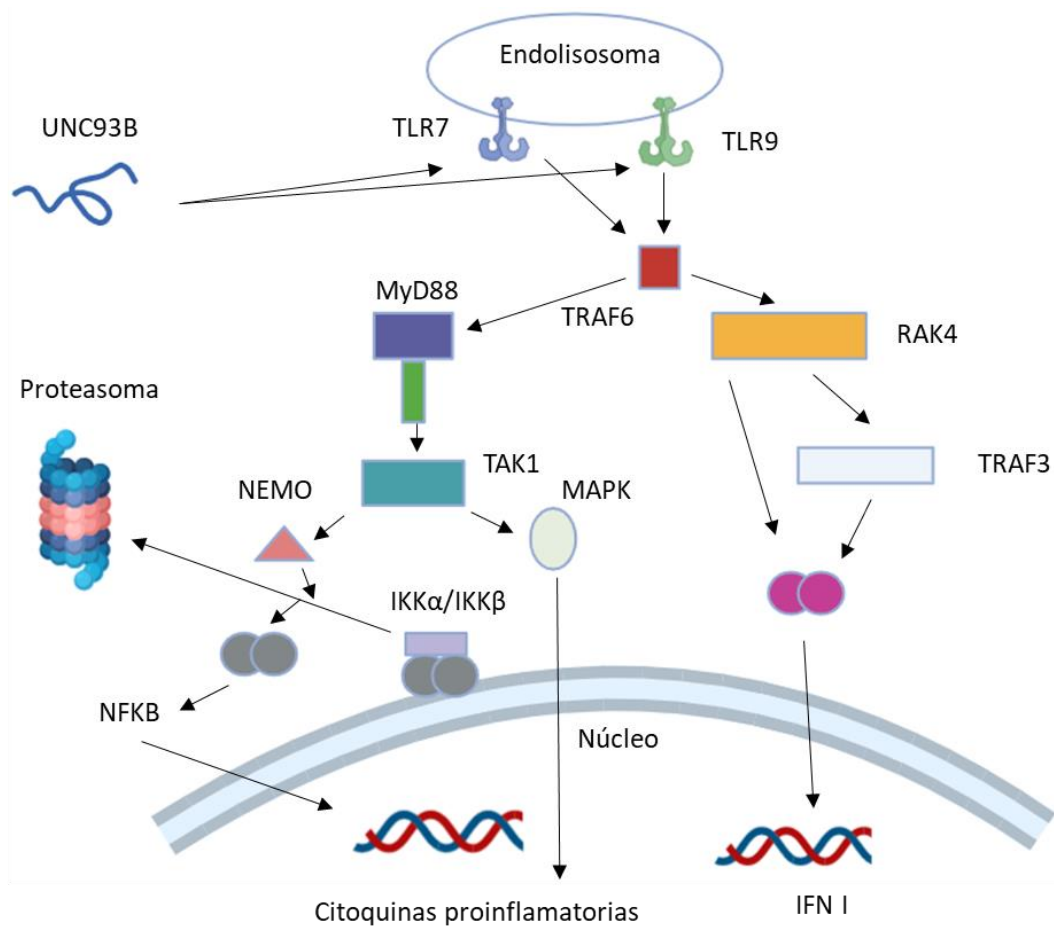


Fig. 7. Rutas de señalización del TLR7. Adaptación de MJ Herrero. (123)

- TLR8 es otro receptor intracitoplasmático con afinidad por ARN monocatenario e imidazoquinolinas(120). La ruta de señalización mediante MyD88 e IRAK4 se asemeja a la del TLR7(118), pero no es idéntica, produciendo unas repercusiones diferentes, tales como producción de  $\text{IFN}\beta$  en vez de  $\text{IFN}\alpha$  o una mayor producción de  $\text{TNF}\alpha$  en vez de  $\text{TGF}\beta$  (ambos propios de la señalización de TLR7) (120) (Fig. 8).

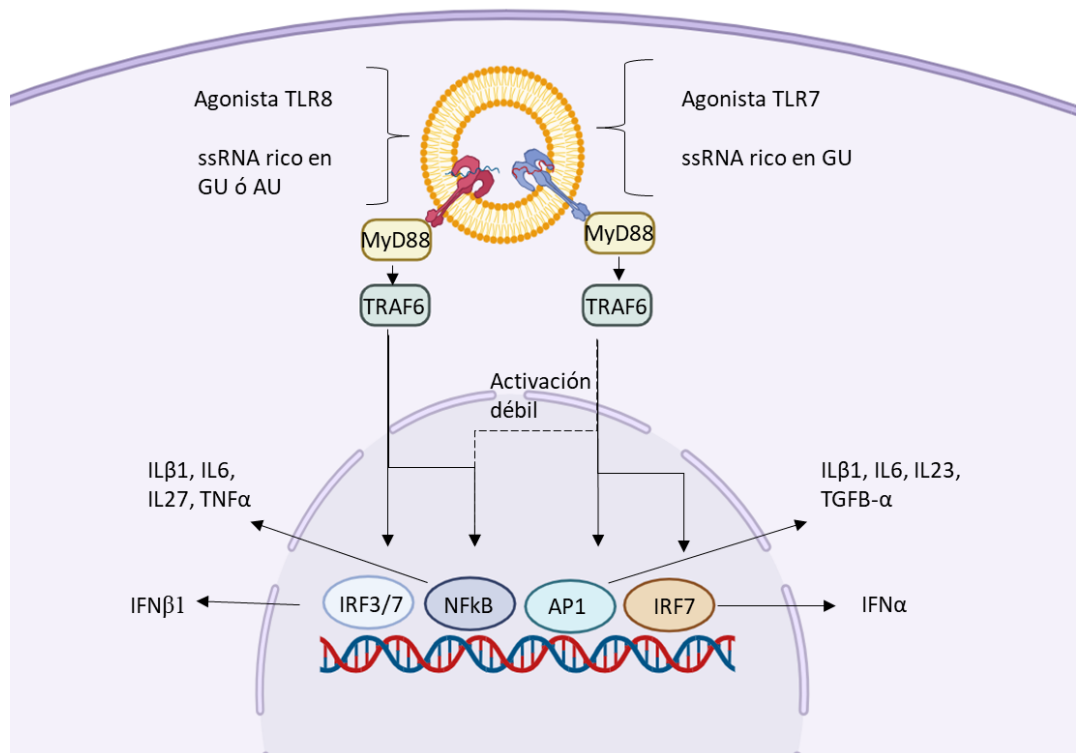


Fig. 8. Rutas de señalización del TLR8. Adaptación de Martínez-Espinosa *et al.*(120)

## 4.4 Inmunodeficiencias primarias en el contexto de la COVID-19

### 4.4.1 Antecedentes de la pandemia por COVID-19

En 2019 se describe en Wuhan, China, la aparición de un agente patógeno llamado SARS-CoV-2. Extendiéndose posteriormente, su infección llegó a ser declarada pandemia en el año 2020(124). Previamente se han descubierto otros seis coronavirus que infectaban a humanos, siendo éste por lo tanto el séptimo coronavirus que se sabe que infecta a los humanos hasta la fecha. Las investigaciones revelaron que el SARS-CoV-2 es muy parecido en cuanto a la estructura y patogenicidad del SARS-CoV estacional. Dos de estos coronavirus previamente identificados fueron responsables de grandes epidemias en las últimas dos décadas (125):

- El coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo o SARS-CoV, el cual también se originó en China en 2002-2003.
- El coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio o MERS-CoV, que se originó en Oriente Medio en 2012.

#### 4.4.2 SARS-CoV-2: descripción general del virus y estructura

Es un virus ARN monocatenario cuyo genoma consta de 29.9kb (126). Este virus presentaba modificaciones relevantes en la proteína Spike (S) cuando se compara con el virus prepandémico. Dichas modificaciones provocaban efectos funcionales relevantes, destacando un aumento del cebado de la proteína S gracias a la presencia de un sitio de escisión similar a la furina en el SARS-CoV-2, la cual estaría implicada en un aumento de la propagación del SARS-CoV-2 en comparación con otros coronavirus beta(127).

Esta molécula es esencial para invadir las células del huésped, ya que gracias a su unión a la enzima convertidora de angiotensina 2 o ACE2 y la intervención de otras moléculas como proteasas tipo furina, la proteasa transmembrana de serina 2 (TMPRSS2) y catepsina L permite la interiorización del material genético infectivo (128–130).

Adicionalmente a la proteína S, otras proteínas son relevantes para explicar la actividad viral y su propagación: La proteína M o de membrana es esencial para el ensamblaje del virus (131) y la proteína N o de nucleocápside es una proteína que tiene implicaciones en la transcripción y empaquetamiento del material genético (132,133). Además de ser moléculas fundamentales por su implicación en la actividad del virus, son interesantes por presentar inmunogenicidad (134–136). Otras moléculas importantes del virus son la proteína de envoltura o proteína E, la proteasa principal y la polimerasa ARN (126) (Fig. 9).

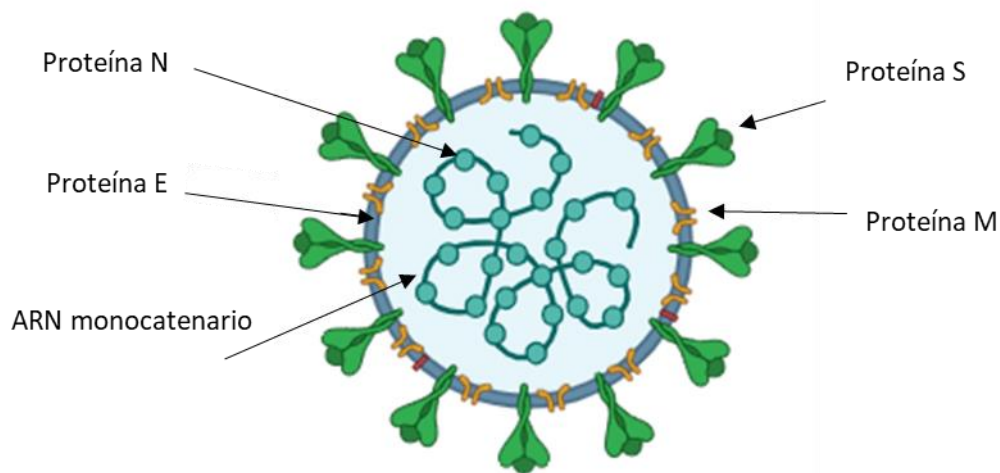


Fig. 9. Estructura del SARS-CoV-2, adaptación propia.

#### **4.4.3 Enfermedad COVID-19**

El SARS-CoV-2 se une a las células epiteliales mucosas de las cavidades bucal y nasal, pudiendo además migrar por el tracto respiratorio hasta las vías respiratorias inferiores. Se ha planteado que el SARS-CoV-2 infecta las células ciliadas primarias de las vías respiratorias de conducción. Alrededor del 80% de los pacientes infectados tendrán un curso leve y limitado al tracto respiratorio (137).

El virus puede progresar aún más e infectar las células alveolares de neumocitos tipo II provocando apoptosis celular. Por lo tanto, a medida que las partículas virales replicadas se liberan de la célula y pasan a infectar más neumocitos tipo II, la apoptosis resultante eventualmente causa daño alveolar difuso y alteración del intercambio de gases, lo que conduce al síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA). También destaca su implicación lesiva del endotelio vascular (138) provocando otros efectos sistémicos como fenómenos trombóticos o vasculitis (139,140), así como los derivados de la respuesta inmunitaria frente al virus, como la tormenta citoquímica (141). La enfermedad producida por el SARS-CoV-2 es la COVID-19, la cual, atendiendo a criterios clínicos y analíticos puede clasificarse en diferentes rangos de gravedad atendiendo a los criterios declarados por la OMS (142). En adultos, la clasificación es:

- 1.- Enfermedad leve: Paciente sintomático que no presenta neumonía vírica ni hipoxia.
- 2.- Enfermedad moderada: Paciente con signos clínicos de neumonía (fiebre, tos, disnea, taquipnea) pero sin signos de neumonía grave ( $SpO_2 \geq 90\%$  con aire ambiente).
- 3.- Enfermedad grave: Paciente con signos clínicos de neumonía más alguno de los siguientes: frecuencia respiratoria  $> 30$  inspiraciones/min, dificultad respiratoria grave o  $SpO_2 < 90\%$  con aire ambiente
- 4.- Enfermedad crítica: paciente con diagnóstico radiológico de neumonía junto con diagnóstico de septicemia, shock séptico o síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA), el cual a su vez puede ser dividido en leve ( $PaO_2/FiO_2$  entre 200 y 300mmHg), moderado ( $PaO_2/FiO_2$  entre 100 y 200mmHg) o grave ( $PaO_2/FiO_2$  menor de 100 mm Hg).

#### **4.4.4 Respuesta inmunitaria al virus**

El sistema inmunitario responde al SARS-CoV-2 de manera análoga a otros virus. Se ha demostrado que el virus activa el complemento en pulmón, piel y suero (143). Además, puede unirse a TLR7 y TLR8, lo que induce respuestas de IFN-I y la generación de diversas citoquinas, lo que resulta en la supresión de la infección viral. También RIG-I (gen I inducible por ácido

retinoico) y MDA5 (proteína asociada a la diferenciación de melanoma 5) reconocen el ARN del SARS-CoV-2 lo que induce estrés dependiente de IFN. La proteína de señalización antiviral mitocondrial (MAVS) conduce a la producción de varios complejos proteicos multifuncionales después de la activación dependiente de los receptores RIG-1 (RLR). El complejo RLR-MAVS interactúa con STING (estimulador de genes de interferón) y TRAF3 (factor 3 asociado a TNFR), activando las quinasas TBK1 (quinasa 1 de unión a TANK) e IKK (inhibidor de la quinasa B épsilon). Luego, estas quinasas activan los factores de transcripción IRF3 (factor regulador de interferón 3) y NF-κB (factor nuclear kappa B), produciendo citocinas y otras estructuras de señalización que inducen la producción de interferones (especialmente mediante la activación de IRF3) y el desarrollo de estrés celular en general (144).

En los pacientes con inmunodeficiencias es muy relevante identificar rutas alteradas, ya que defectos puntuales pueden ser determinantes para organizar una adecuada respuesta inmunitaria frente a patógenos.

#### **4.4.5 Enfermedad COVID-19 en pacientes con inmunodeficiencias**

Desde el inicio de la pandemia múltiples publicaciones han debatido sobre la posible influencia del antecedente de inmunodeficiencia tanto en la aparición de la COVID-19, en el curso clínico de la enfermedad e incluso en la mortalidad. Actualmente existen estudios que muestran tanto un incremento de la gravedad de la enfermedad en los pacientes inmunodeprimidos con respecto a la población general (145) como otros en los que sugieren que dichos pacientes presentan un riesgo similar (146). Dicho riesgo dependería del grado y tipo de inmunodeficiencia y de si esta es primaria o iatrogénica(145,147), pudiendo en algunos casos incluso no condicionar cambios en el patrón de la enfermedad o el pronóstico de la misma. Por esta razón, la valoración debería ser, por lo tanto, restringida a la inmunodeficiencia de interés, lo que conlleva dificultades con aquellas inmunodeficiencias menos frecuentes.

En el caso específico de los pacientes con IDCV, algunas publicaciones mostraban un aumento del riesgo de infección, pero con una menor mortalidad que el resto de infectados (147,148). Se ha descrito también cómo pacientes con IDCV tienen altas tasas de recuperación y aún se desconoce hasta qué punto la inmunodeficiencia primaria pudo haber sido un factor predisponente o protector contra formas graves de COVID-19 (149,150).

No se dispone de publicaciones del curso de la enfermedad en pacientes con déficit de linfocitos T CD8+, siendo este elemento un dato importante para evaluar la implicación de estas células en la protección frente a la enfermedad.

#### **4.4.6 Vacunación contra el SARS-CoV-2**

La grave situación pandémica provocada por la COVID-19 promovió el rápido desarrollo de vacunas para la prevención frente a la enfermedad. La búsqueda de una vacuna se estableció como objetivo principal para los responsables sanitarios y empresas farmacéuticas, y se estudiaron las posibles formulaciones que mejor desencadenasen una respuesta inmunitaria frente al patógeno. Entre dichas formulaciones se combinaron tanto posibles antígenos del virus como diferentes tecnologías vacunales, tales como vectores virales no replicantes, vacunas basadas en antígenos proteicos, virus inactivados o vacunas basadas en ARN mensajero (ARNm) (151,152).

En los países europeos se disponía mayoritariamente de 3 vacunas para proteger a la población de la COVID-19: ChAdOx1 (vacuna de vector adenoviral), BNT162b2 y mRNA-1273 (ambas vacunas ARNm).

Las vacunas basadas en el ARNm habían sido empleadas hasta la fecha como posible terapia frente al cáncer, presentando resultados prometedores. Su mecanismo consiste en introducir el ARNm de la molécula frente la que se quiere desarrollar la respuesta inmunitaria (en el contexto del COVID-19 la molécula mayoritariamente escogida fue la proteína S) en las células presentadoras de antígenos para que éstas inicien una respuesta al ser capaces de presentar la molécula en sus MHCs (153).

El empleo de estas vacunas fue prácticamente inmediato desde el momento en el que se aprobó su uso (154,155). Con tasas de cobertura cercanas al 90% de la población objetivo en 2021, su empleo produjo el efecto deseado y la respuesta generada fue suficiente para evitar las peores consecuencias del virus, alcanzando unas tasas de prevención de síntomas superiores al 90% y reduciendo la hospitalización y la mortalidad en más de un 80% tras una adecuada inmunización (151,156,157).

En España se estableció una categorización de la población en función de su riesgo de sufrir las consecuencias del virus. Los pacientes con diagnóstico de inmunodeficiencias primarias fueron designados como grupo prioritario para recibir tanto la vacunación inicial como las dosis de recuerdo según las recomendaciones del Ministerio de Sanidad (158). En esos momentos, no obstante, no se sabía si en los pacientes con inmunosupresión secundaria o con inmunodeficiencias primarias esta vacunación iba a generar la respuesta inmunitaria defensiva deseada, es decir, si iba a resultar beneficiosa.

#### **4.5 Respuesta vacunal en las Inmunodeficiencias primarias**

Existen dos factores pronósticos importantes que definen la necesidad de vacunación en los pacientes con IDC. En primer lugar, los posibles efectos adversos tras la vacunación en estos pacientes, presumiblemente similares a los de la población general, a diferencia de lo que sucede en inmunodeficiencias con manifestaciones autoinflamatorias como las interferonopatías. En segundo lugar, la capacidad de respuesta frente a vacunas y posterior protección frente a la enfermedad. En el caso de la IDVC, al ser una inmunodeficiencia humoral, la respuesta mediada por anticuerpos podría no llegarse a obtener ya que presentan un reconocido defecto en la producción de anticuerpos contra antígenos específicos, tanto que es considerado uno de los criterios diagnósticos según la ESID. Su tasa de respuesta frente a vacunas convencionales es mucho menor a la de sujetos sanos (159–161) (Fig. 10) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Tasa de respuesta vacunal en pacientes con IDCv.

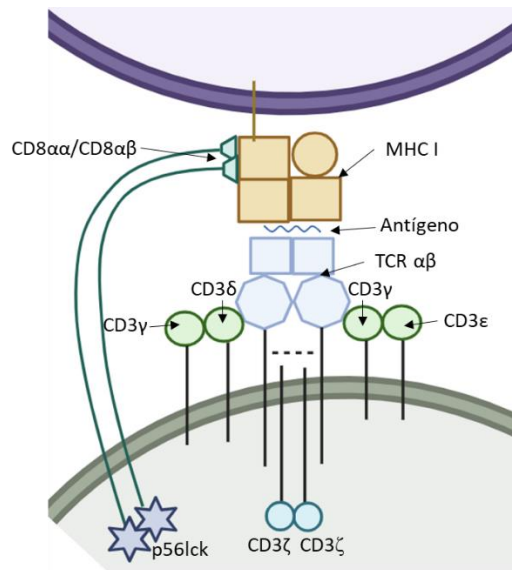
Estudio	Fecha	Antígeno vacunal	Respuesta en pacientes con IDCv (expresada en % sobre el total)
Goldacker et al.(159)	2007	<i>Toxoides tetánico y diftérico, vacuna del Pneumococco polisacárida, H. Influenzae y virus de la hepatitis A y B.</i>	Respuesta humoral: 0% contra tétanos y difteria; 4,7% contra el Pneumococco; 23,8% contra H. Influenzae; 4,7% contra la hepatitis A; 14,2% contra la hepatitis B
Hong et al.(162)	2010	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Menor producción de IL6 y TNF $\alpha$
Rezaei et al.(163)	2010	<i>Neisseria meningitidis</i> <i>Polisacárida</i>	Respuesta humoral: 65,2% a las 3 semanas, 39,1% al año
Assen et al.(160)	2011	<i>Influenza</i>	Respuesta humoral: 0% Respuesta celular: 6,6%
Chovancova et al.(164)	2011	<i>Toxoide tetánico y vacuna del Pneumococco polisacárida</i>	Respuesta humoral: 18,9% Ausencia de generación de plasmablastos
Adam y Church.(165)	2015	<i>Bordetella pertussis y Neisseria meningitidis</i>	Respuesta humoral: 26,6%
Hanitsch et al.(166)	2016	<i>Influenza</i>	Respuesta humoral: 12,5% Respuesta celular: 87,5%
Sánchez-Ramón et al.(167)	2016	<i>Vacuna del Pneumococco polisacárida y Typhi Vi</i>	Respuesta humoral: 23% frente a <i>Pneumococco</i> y 41% frente a <i>Salmonella</i>
Kumarage et al.(168)	2017	<i>Typhi Vi</i>	Respuesta humoral: 37%
Gardul et al.(169)	2018	<i>Influenza</i>	Respuesta humoral: 16,7%



a patógenos víricos, por lo que el estudio del impacto tanto de la enfermedad como de la vacunación en estos pacientes debería ser estudiada.

La actividad de los linfocitos T CD8+ es dependiente de una adecuada presentación antigénica por las células presentadoras de antígeno, las cuales a través de su MHC clase I e interacciones de coestimulación permiten que el linfocito T CD8+ se active a través de su TCR, lo cual requiere la participación del correceptor CD8, para así producir la señalización de activación linfocitaria a través de las vías calcineurina/NFAT; PKC $\theta$ –IKK–NF- $\kappa$ B; RASGRP1–RAS–ERK1/2–AP1; etc (181).

La molécula CD8 es por tanto necesaria para el correcto funcionamiento del linfocito T CD8+, ya que estabiliza la interacción Receptor de Célula T (TCR)/péptido-Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC)-I y aumenta la activación generada por péptidos con baja afinidad (182). Sus componentes son la cadena CD8 $\alpha$  y CD8 $\beta$ , siendo la conformación final CD8 $\alpha\alpha$  o CD8 $\alpha\beta$ . La expresión superficial de CD8 depende de la expresión de CD8 $\alpha$ , dado que sin CD8 $\alpha$ , los polipéptidos CD8 se retienen en el retículo endoplásmico, produciéndose su degradación (183). Además, se ha podido observar que la molécula CD8 $\alpha\alpha$  activa más a los linfocitos que la molécula CD8 $\alpha\beta$  (184) (Fig. 11).



**Fig. 11.** Esquema de interacción entre MCH I, TCR, CD3 y CD8. Adaptación de Cole DK et al. (185). MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad; TCR: Receptor de Célula T.

Existen pacientes con inmunodeficiencias primarias celulares, como el déficit de CD8 $\alpha$ , que presentarían una deficiente capacidad de respuesta celular frente a virus, ya que la eliminación de patógenos intracelulares está muy ligada a los linfocitos T CD8 (186–189). Sin embargo, se ha descrito cómo a pesar de que los linfocitos T CD8 carezcan de la molécula CD8 en superficie, éstos parecen presentar cierta actividad citotóxica(190). Por tanto, analizar los resultados de la

vacunación en estos pacientes es interesante para conocer el impacto de la vacunación en distintas inmunodeficiencias primarias.



## 5.- Objetivos

El objetivo principal de esta tesis es evaluar la capacidad de respuesta de los pacientes con inmunodeficiencia común variable (IDCV) y déficit de CD8 a las vacunas de ARNm dirigidas frente a SARS-CoV-2.

Para lograr el objetivo principal, se establecen los siguientes objetivos particulares:

1.- Determinar qué tipo de respuesta inmunológica, celular o humoral, pueden desarrollar los pacientes con IDCV y déficit de CD8 frente a las vacunas de ARNm frente al SARS-CoV-2. Se debe estudiar las variantes y mutaciones con posibles implicaciones inmunológicas de los pacientes de la cohorte y comparar la respuesta inmunológica generada por los pacientes con la de controles sanos y analizar si dicha respuesta se mantiene en el tiempo.

2.- Analizar *in vitro* la función del compartimento B de estos pacientes, en cuanto a su capacidad de producción de anticuerpos y citoquinas, evolución de las distintas subpoblaciones linfocitarias y perfil transcriptómico que permiten la respuesta frente al SARS-CoV-2.

3.- Investigar si un paciente con déficit de CD8 $\alpha$  es capaz de responder frente al SARS-CoV-2, y si la respuesta es análoga a la desarrollada por los controles sanos.



## **6.- Pacientes y métodos**

### **6.1 Pacientes con IDCV y paciente con déficit de CD8 $\alpha$**

Los pacientes con inmunodeficiencia humoral primaria que aparecen en esta tesis son pacientes diagnosticados de IDCV en el Servicio de Inmunología del Hospital 12 de Octubre según los criterios de la ESID (32).

Para analizar la respuesta a la vacunación de los pacientes con IDCV, se excluyeron los sujetos con infección previa por SARS-CoV-2 documentada. También se excluyeron los pacientes que rechazaron la vacunación en el momento del estudio o se negaron a cumplir el protocolo del proyecto, siendo 18 los sujetos a estudio.

Todos los pacientes recibieron dos dosis de una de las tres vacunas disponibles en aquel momento, BNT162b2 (Pfizer-BioNTech), mRNA-1273 (Moderna) o ChAdOx1 (Oxford-AstraZeneca), según la Estrategia Nacional de Vacunación entre febrero y junio de 2021. A efectos de comparación, reclutamos un grupo de individuos control sanos de 50 voluntarios (edad media 45 años, 42 mujeres y 8 hombres) vacunados con BNT162b2.

Para realizar el ensayo funcional de linfocitos B, se recogieron todos los pacientes con IDCV que aceptaron la invitación a participar. En total, participaron 20 pacientes, de los cuales 16 participaron también en el estudio de respuesta a vacunación. En esta ocasión, se reclutaron 38 controles sanos para realizar la comparación. Dichos controles fueron donantes de sangre voluntarios que presentaban un perfil vacunal (tipo de vacuna, número de dosis, tiempo desde última dosis) similar a los pacientes.

La respuesta vacunal para COVID-19 se analizó también en una paciente con déficit de CD8 $\alpha$  por presencia de la mutación en homocigosis p.Gly111Ser. Ésta es una paciente diagnosticada hace 29 años en el Servicio de Inmunología del Hospital 12 de Octubre (186). Para comparar los resultados se analizaron cinco controles sanos.

### **6.2 Obtención de muestras**

La respuesta a las vacunas contra la COVID-19 se evaluó en muestras de sangre periférica obtenidas antes de la vacunación, de 14 a 16 días después de la primera dosis y de 28 a 32 después de la segunda dosis. Las muestras se recogieron en tubos de 4ml con heparina de litio como anticoagulante.

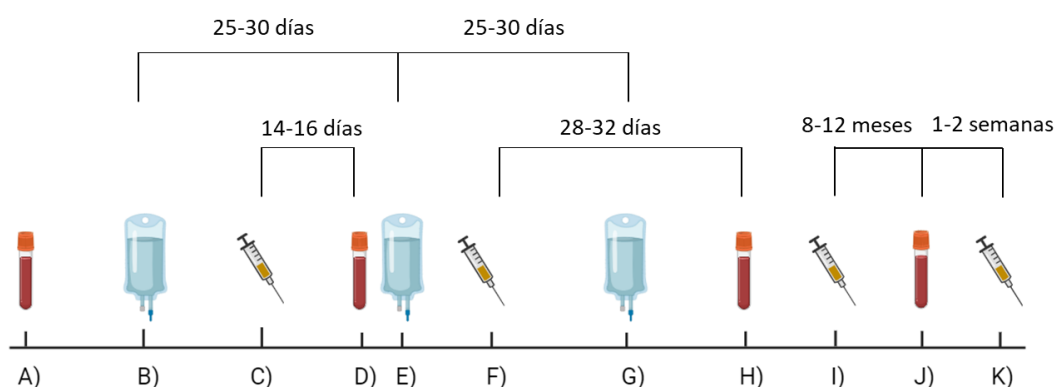
Los pacientes en tratamiento sustitutivo con inmunoglobulinas (IGIV o IGSC) recibieron la vacuna 1 o 2 semanas después de la infusión de inmunoglobulinas, según la pauta de tratamiento

(semanal o mensual, respectivamente). Todas las muestras se recogieron de 0 a 4 días antes de la infusión posterior. Se programó que los pacientes que no habían recibido inmunoglobulinas exógenas comenzaran a partir de entonces con el tratamiento.

Con el objetivo de conocer si la posible respuesta vacunal se mantenía en el tiempo, se realizó una nueva extracción posterior a la tercera dosis de vacunación (de ocho a doce meses después) y anterior a la cuarta dosis (una o dos semanas antes) (Fig. 12).

Finalmente, para realizar el estudio fenotípico y funcional de Linfocitos B *in vitro*, se realizó otra extracción entre 9 y 10 meses después de la cuarta dosis de vacunación, entre 1 y 4 días antes de la siguiente infusión de inmunoglobulinas.

Es preciso insistir en que las extracciones de sangre se realizaron justo antes de las infusiones de inmunoglobulinas, para hacer coincidir la extracción con el momento valle, es decir, el momento de un periodo en el cual un paciente con tratamiento continuado presenta la menor concentración del fármaco. Este momento es justo el anterior a una nueva infusión.



**Fig. 12.** Esquema de las extracciones en función de la vacunación y de las infusiones de inmunoglobulinas. A) 1<sup>er</sup> análisis de sangre. B) Administración de inmunoglobulinas. C) 1<sup>a</sup> dosis de vacunación. D) 2<sup>o</sup> análisis de sangre, posterior a la primera dosis vacunal. E) Administración de inmunoglobulinas. F) 2<sup>a</sup> dosis de vacunación. G) Administración de inmunoglobulinas. H) 3<sup>er</sup> análisis de sangre, posterior a la segunda dosis vacunal. I) 3<sup>a</sup> dosis de vacunación. J) 4<sup>o</sup> análisis de sangre. K) 4<sup>a</sup> dosis de vacunación.

### **6.3 Secuenciación de ADN por NGS**

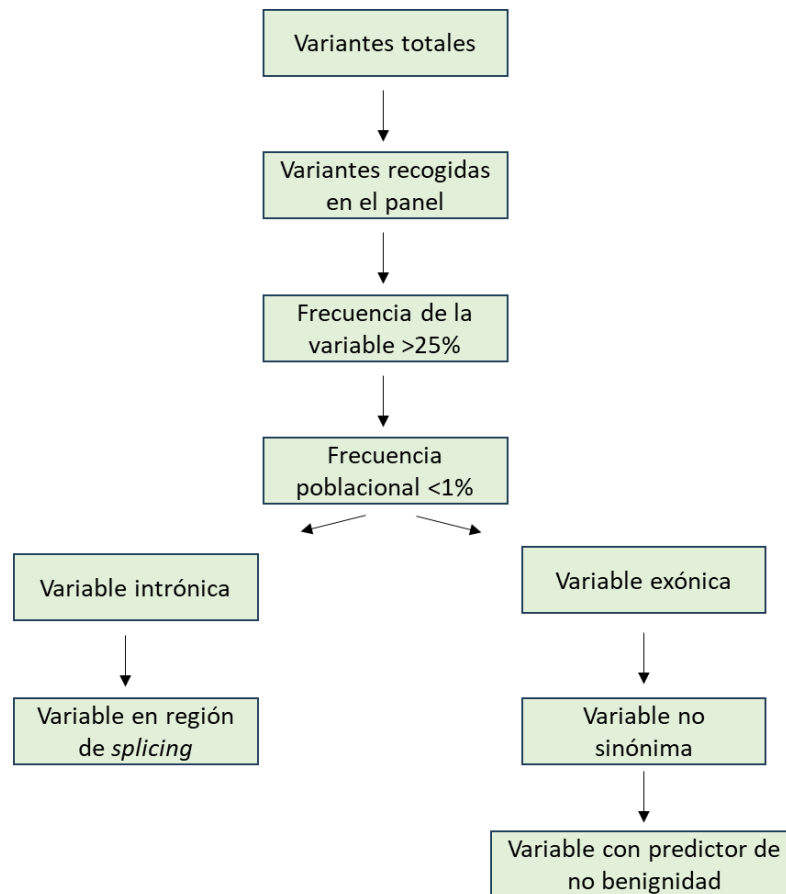
En los pacientes con IDCV se analizó por NGS un panel de 434 genes de interés implicados en inmunodeficiencias primarias. Para ello se extrajo ADN de sangre periférica de manera automática utilizando el MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche, Basilea, Suiza). La liberación y captura de las 5664 regiones implicadas se realizó con el kit SureSelect XT HS (Agilent

Technologies, Santa Clara, California) y su secuenciación se realizó en pareado (paired-end, 2x75pb) en el secuenciador MiSeq (Illumina, San Diego, California). El alineamiento de las secuencias con el genoma humano de referencia (versión GRCh37-hg19), así como la identificación, filtrado, análisis e interpretación de las variantes se realizó con el software Alissa (Agilent Technologies).

Los resultados fueron analizados teniendo en cuenta la calidad de la secuenciación. Sólo si superaba unos criterios de calidad suficiente se consideraba la prueba válida. Estos criterios eran:

- Lecturas: se deben haber realizado más de  $10^6$  lecturas del fragmento.
- Porcentaje de lecturas On target: el número de lecturas de la región considerada relevante debía superar el 80%.
- Profundidad: Número de veces que se ha leído la secuencia. Debe superar las 100 lecturas.
- Cobertura 20X: Porcentaje de bases en el fragmento objetivo con más de 20 lecturas. Debe ser superior al 80%.

Una vez la muestra era considerada válida, se aplicaba un algoritmo para determinar la importancia de las variantes. El algoritmo se refleja en la Fig. 13.



**Fig 13.** Algoritmo utilizado para detectar variantes relevantes en el panel de NGS.

La interpretación de los datos se realizó mediante las consultas a las bases de datos: ClinVar (v23); COSMIC (v19); OMIM (v18); CGDS (v3); DGV (v2); dbSNP (v6) dbNSFP (v3); 1000Genomes (v1); ExAC (v3); gnomAD (v3) y VarSome. Los predictores de efecto funcional consultados fueron: SIFT score; PolyPhen2; PolyPhen2 HumDiv; PolyPhen2 HumVar; BLOSUM45; BLOSUM62; BLOSUM80; LRT; MutationTaster; MutationAssessor; PROVEAN; FATHMM, y Human Splicing Finder 3.1. La descripción de los genes se realizó consultando las bases NCBI Gene, Locus Reference Genome, Uniprot, Protein Atlas, HGNC, Interpro y Genecards.

Una vez se dispuso de las variables relevantes, se calificó cada variable como patogénica, probablemente patogénica, benigna, probablemente benigna o variante de significado incierto (VOUS) en función de la información disponible en las bases de datos mencionadas previamente. La categorización final se realizó de acuerdo al siguiente algoritmo, el cual es empleado de rutina para la identificación de EII en el servicio de Inmunología del Hospital 12 de Octubre (Fig. 14):

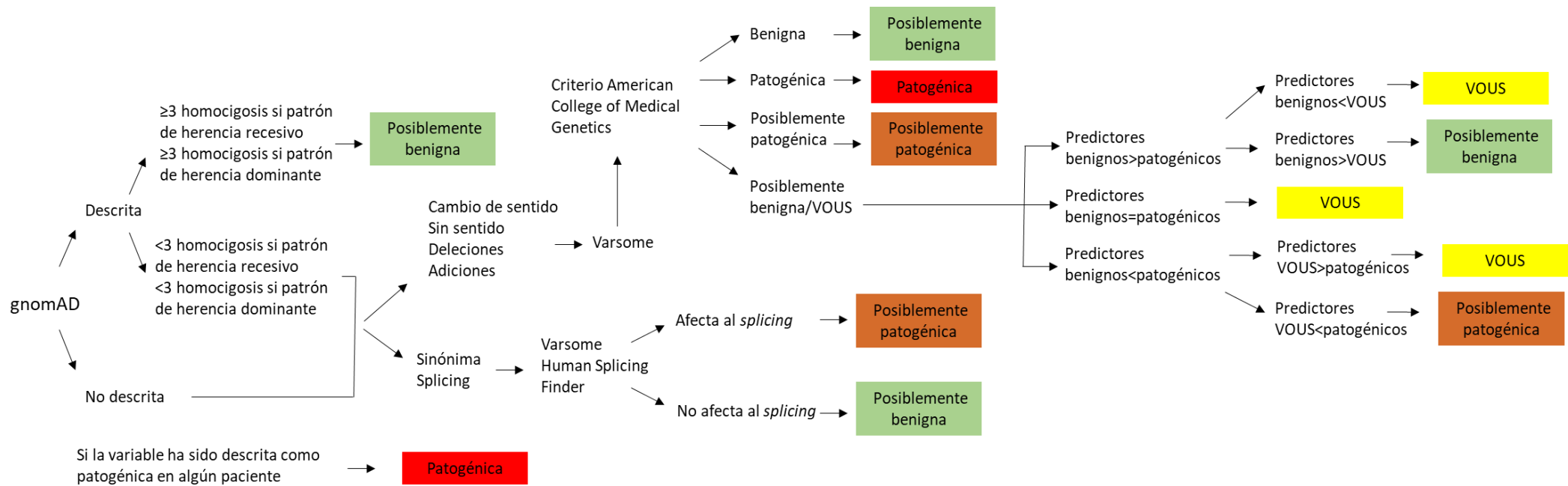


Fig. 14. Categorización de la patogenicidad de las variantes encontradas. VOUS: Variante de Significado Incierto

## **6.4 Determinación de anticuerpos específicos frente a S y específicos frente a N mediante ELISA**

Los tubos de sangre se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm para obtener el plasma. Los anticuerpos IgG dirigidos a la proteína S1 se detectaron semicuantitativamente en las muestras de plasma utilizando el kit Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG (Euroimmun AG, Lübeck, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta determinación sirvió para detectar si había una respuesta humoral presente tras las dosis de vacunación.

Adicionalmente, se empleó el kit Anti-SARS-CoV-2 NCP ELISA IgG (Euroimmun AG, Lübeck, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante para determinar anticuerpos frente a nucleocápside, que detectarían si el paciente había tenido contacto previo con el virus.

La determinación cuantitativa de los anticuerpos IgG frente a la proteína S1 se realizó utilizando el kit QuantiVac (Euroimmun AG, Lübeck, Alemania). Los valores de densidad óptica (DO) se midieron a 450 nm utilizando el lector de microplacas PR 3100 (Bio-Rad Life Science, Marnes-La-Coquette, Francia). Este ensayo se realizó con el objetivo de cuantificar y comparar la producción de anticuerpos específicos en la evaluación *ex vivo*.

El kit Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG, los resultados se evaluaron semicuantitativamente calculando el cociente entre el valor de DO de la muestra sobre el valor de DO del calibrador (DO relativa), con los siguientes valores de corte:  $< 0,8$ , negativo;  $\geq 0,8$  a  $< 1,1$ , límite; y  $\geq 1,1$ , positivo.

En el kit QuantiVac, los resultados cuantitativos se obtuvieron usando la curva de conversión de la DO de los seis calibradores según las instrucciones del fabricante. El corte para muestras negativas se estableció en  $< 25,6$  BAU/ml (unidades de unión al antígeno/ml), resultado dudoso entre 25,6 y 35,2 BAU/ml y positivo  $> 35,2$  BAU/ml.

Para la evaluación posterior a la tercera dosis de vacunación, se procedió a determinar la presencia cuantitativa de anticuerpos anti-S de los pacientes mediante inmunoensayo de electroquimioluminiscencia rutinario y analizado por un autoanalizador Cobas e 411 (Roche, Basilea, Suiza).

## **6.5 Determinación de anticuerpos neutralizantes**

Se entiende como anticuerpos neutralizantes a aquellos que neutralizan el efecto biológico de un patógeno. Para detectar si los anticuerpos generados eran neutralizantes, se utilizó un método basado en ELISA para valorar la inhibición de la interacción hACE-2/spike por

anticuerpos. Se recubrieron placas de 96 pocillos con 8 ng/ $\mu$ l de un anticuerpo monoclonal de captura de S. Después de bloquear con BSA al 1%, se añadió proteína purificada derivada de Hexapro con sustitución D614G(191), a 1 ng/ $\mu$ l en solución de bloqueo. Tras lavar con PBS la placa se incubó con el receptor monomérico StrepTag hACE-2 (20 ng/ $\mu$ l) formando un complejo con StrepTactin-HRP (1:2000).

Los sueros se incubaron con el receptor-StrepTactin-HRP y el sustrato OPD (Sigma-Aldrich), y la DO se midió a 493–620 nm. El fondo se determinó en paralelo utilizando una proteína spike de conformación cerrada incapaz de unirse al receptor hACE-2. Se utilizó un conjunto de sueros negativos para anticuerpos anti-SARS-CoV-2 y un receptor monomérico no marcado hACE-2 como controles negativos y positivos, respectivamente. Después de restar el fondo, el porcentaje de neutralización se calculó como  $[1 - (\text{suero de prueba DO495-620}/\text{control negativo DO495-620})] \times 100$ . En todos los experimentos, la incubación del receptor hACE-2 sin marcar a 200 ng/ $\mu$ l logró una tasa de neutralización superior al 85%. Se analizaron diluciones en serie de cada muestra por duplicado. El título neutralizante se definió como la dilución del suero que resultó en una reducción del 50% en la absorbancia en comparación con el control negativo (191,192).

## **6.6 Determinación de la inmunidad celular de los Linfocitos T específica frente a S1 mediante FluoroSpot**

Después de aislar las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación en gradiente de densidad utilizando Ficoll-Paque, se procedió a lavar dos veces en PBS (con centrifugaciones de 5 minutos a 1500 RPM) y se sembraron a razón de  $3 \times 10^5$  células/pocillo en placas IFN- $\gamma$  FluoroSpot<sup>TM</sup> (MabTech, Nacka Strand, Suecia) con medio de cultivo celular consistente en RPMI, 1% L. -glutamina, 1% penicilina/estreptomicina, suero bovino fetal al 10% y anticuerpo monoclonal anti-CD28 (1  $\mu$ g/ml). La estimulación se realizó con un total de 166 péptidos individuales, de 15 aminoácidos de longitud y superpuestos, que cubren el dominio S1 de la proteína S (SARS-CoV-2 S1 *scanning pool*, MabTech) a una concentración final de 1  $\mu$ g/ml. Los pocillos de control negativo carecían de péptidos y los pocillos de control positivo incluían anticuerpo anti-CD3 a una concentración de 0,1mg/ml (MabTech).

Las placas se incubaron durante 16 a 18 h a 37 °C. Tras cinco lavados, se añadió el anticuerpo de detección anti-IFN- $\gamma$  a 0,5mg/ml, el cual está asociado a la proteína  $\beta$ -amiloides (BAM). Después se incubó durante 2 horas y se volvió a lavar cinco veces. Se procedió a añadir el anticuerpo conjugado-BAM-490. Tras otra hora de conjugación se volvió a lavar cinco veces y se añadió

Fluorence enhancer-II durante cinco minutos. Se decantó la placa para eliminarlo y se dejó secar durante 45 minutos (Fig. 15). Por último, se contaron los puntos o *spots* generados utilizando un sistema lector automatizado IRIS™ FluoroSpot (MabTech). Para cuantificar las respuestas mediadas por células específicas, se restaron a los *spots* de los pocillos de las muestras los *spots* de su control negativo. Los resultados se expresaron como unidades formadoras de *spots* (SFU) productoras de IFN- $\gamma$  por  $10^6$  PBMC. Los resultados se excluyeron si los pocillos de control negativo tenían  $> 80$  SFU/ $10^6$  PBMC o los pocillos de control positivo tenían  $< 400$  SFU/ $10^6$  PBMC. Las respuestas se consideraron positivas si los resultados fueron al menos tres veces superiores a la media de los pocillos de control negativo y superiores a 25 SFU/ $10^6$  PBMCs. Este límite se había establecido con anterioridad testando a un grupo control de 30 voluntarios sanos sin evidencia microbiológica o clínica de infección por SARS-CoV-2 y a 234 pacientes recuperados de COVID-19. El punto de corte óptimo se calculó en función de los resultados de estos dos grupos y se estableció que fuera de 25 frente al antígeno S, el cual presentaba un área bajo la curva de 0,97 con un intervalo de confianza al 95% de 0,95-0,99 (sensibilidad 91.6%; especificidad: 100%) (193).

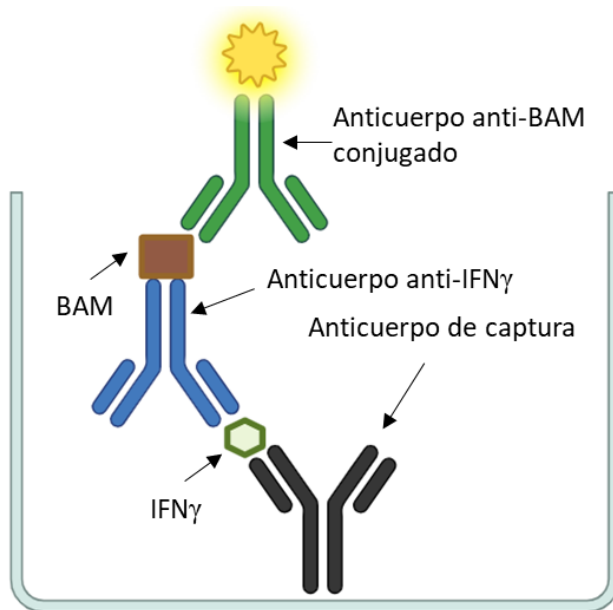


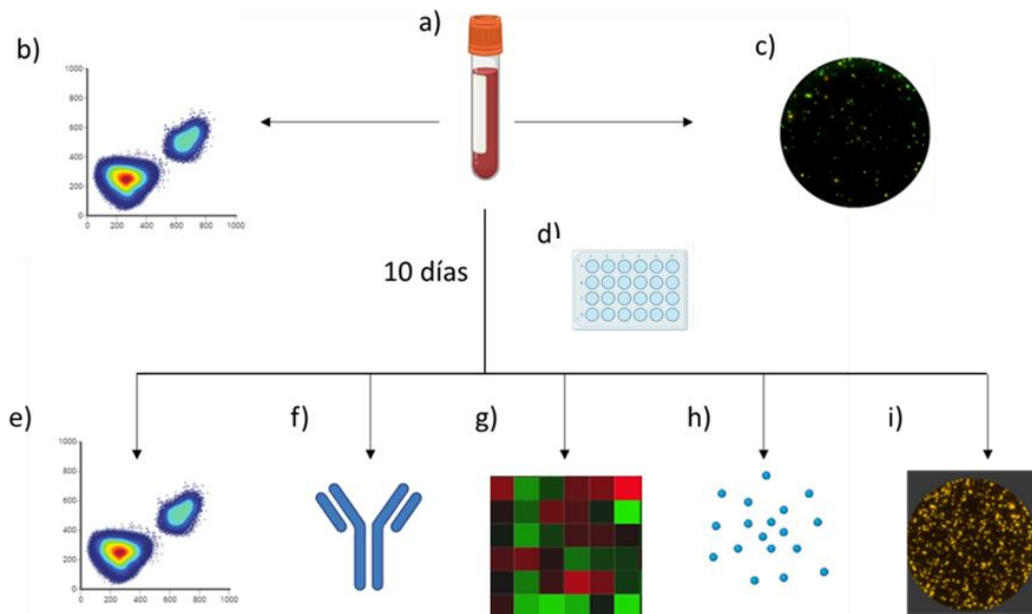
Fig. 15. Representación de un pocillo donde se realiza la técnica Fluorospot para detectar IFN- $\gamma$ . BAM:  $\beta$ -amiloide.

## 6.7 Estimulación *ex vivo* de Linfocitos B

En 20 muestras de sangre periférica obtenidas entre 9 y 10 meses después de la cuarta dosis de vacunación se aislaron PBMC mediante centrifugación en gradiente de densidad utilizando Ficoll-Paque, procesando las muestras dentro de las 6 horas posteriores a la extracción. La Figura 17 representa todos los análisis realizados. Tras comprobar la viabilidad de las PBMC y contarlas con

azul tripán, se recogieron  $1,5 \times 10^6$  para analizar su fenotipo por citometría de flujo espectral (ver apartado 6.8) y  $9 \times 10^5$  para valorar la respuesta inmune específica de células T mediante *Fluorospot* (como se describe en el apartado 6.6). El restante de células (de  $4 \times 10^6$  a  $10^7$ ) se utilizó para hacer un cultivo con el fin de analizar funcionalmente los Linfocitos B. Para ello las células se ajustaron a  $10^6$ /ml en medio IMDM Gibco™ al 10% FBS y 100  $\mu$ l/ml de estreptomicina (ThermoFisher, Massachusetts, EE.UU.). Se añadieron como estímulos 2,5 $\mu$ g/ml de R848 (Invivogen, California, EE.UU.) y 1000 IU/ml de IL2 (Novartis Internacional, Basilea, Suiza). Se sembraron 2ml de la suspensión celular por pocillo en placas de 24 pocillos y se dejó un pocillo sin estimulación como control negativo.

Después de diez días de cultivo de estimulación, los sobrenadantes se recogieron y se mantuvieron a -20 °C hasta su análisis posterior de anticuerpos contra el SARS-CoV-2 usando el kit QuantiVac (descrito en el apartado 6.4) y de producción de citocinas (descrito en el apartado 6.11). Las células se contaron nuevamente usando azul tripán y se recogieron  $15 \times 10^4$  células para realizar la citometría de flujo espectral postcultivo. Las células sobrantes se sometieron a una selección negativa de Linfocitos B mediante separación magnética con EasySep™ HLA B cell enrichment kit y EasySep™ magnet (STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Canadá) y se contaron nuevamente comprobando su viabilidad. De acuerdo al marcaje con CD19-Spark NIR 685PerCP/Cy (Biolegend®, California, EE.UU.) la pureza fue superior al 95%. Estos Linfocitos B aislados se dividieron en  $3 \times 10^5$  para analizar la respuesta B específica contra el SARS-CoV-2 por *Elispot* (ver apartado 6.9) y las células restantes (de  $4 \times 10^5$  a  $6 \times 10^5$ ) se utilizaron para obtener ARN para el análisis del transcriptoma (ver apartado 6.10) (Fig. 16).

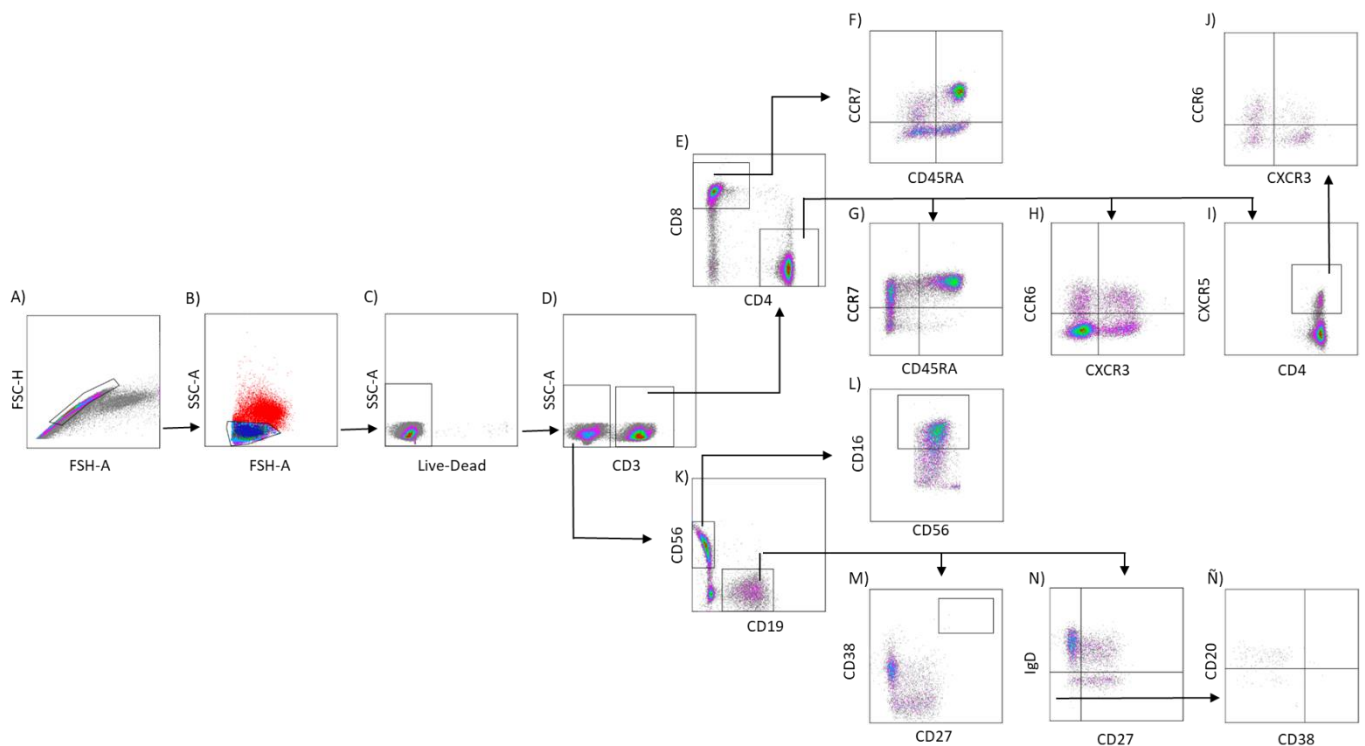


**Fig. 16.** Esquema de la evaluación *ex vivo*. a) Extracción sanguínea; b) Análisis citométrico precultivo; c) Fluorospot de respuesta celular T; d) Cultivo con IL2+R848; e) Análisis citométrico postcultivo; f) ELISA detección anticuerpos anti-S del SARS-CoV-2 en sobrenadante; g) Extracción ARN y análisis transcriptoma; h) Análisis citoquinas en sobrenadante; i) Elisot B frente a SARS-CoV-2.

### **6.8 Citometría de flujo espectral y marcaje intracitoplasmático**

Se empleó citometría espectral para analizar el fenotipo linfocitario antes y después del cultivo de PBMC con IL-2 y R848 en los pacientes con IDCv, y para analizar la producción de IFN $\gamma$  en la paciente con déficit de CD8 $\alpha$ .

Las células se marcaron con un panel de anticuerpos de 16 colores (ver Anexo II) basado en el panel OMIP-69 (194) adaptado al objetivo de analizar las poblaciones linfocitarias T, B y NK. La estrategia de selección de poblaciones celulares se describe en la Fig. 17.



**Fig. 17.** Estrategia de gateo. Ejemplo en un control sano. Las imágenes se corresponden con: A) Identificación de singletes; B) Identificación de linfocitos; C) Identificación de células vivas; D) Identificación de LT; E) Identificación de LT CD8+ y CD4+; F) Compartimentos de memoria de los LT CD8+: CCR7+/CD45RA+ (naïve), CCR7+/CD45RA- (Memoria Central), CCR7-/CD45RA- (Memoria Efectora), CCR7-/CD45RA+ (TEMRA); G) Compartimentos de memoria de los LT CD4+: CCR7+/CD45RA+ (naïve), CCR7+/CD45RA- (Memoria Central), CCR7-/CD45RA- (Memoria Efectora), CCR7-/CD45RA+ (TEMRA); H) Compartimentos TH: CCR6-/CXCR3+ (TH1), CCR6-/CXCR3- (TH2), CCR6+/CXCR3- (TH17); CCR6+/CXCR3+ (TH1-17); I) Identificación de los cTFH; J) Compartimentos cTFH: CCR6-/CXCR3+ (cTFH1), CCR6-/CXCR3- (cTFH2), CCR6+/CXCR3- (cTFH17); K) Separación de los linfocitos B vs NK; L) Expresión de CD16 en NK; M) Identificación de los plasmablastos (CD27+CD38+; N) Compartimentos de memoria de los LB: IgD+CD27- (naïve), IgD+CD27+ (zona marginal), IgD-CD27+ cambio de clase e IgD-CD27-; Ñ) Expresión de CD20 y CD38 en la población B IgD-CD27-. cTFH: Linfocito T Helper circulante; TEMRA: células T terminalmente diferenciadas con expresión de CD45RA+TH: Linfocito T Helper.

Con respecto al análisis de producción de IFN $\gamma$  en la paciente con déficit de CD8 $\alpha$ , se procesó la muestra inmediatamente después de su recogida y se procedió a realizar una estimulación por exposición a antígenos de SARS-CoV-2 en las condiciones referidas en el apartado 6.6. A continuación, las células se permeabilizaron con el Inside Stain Kit (Miltenyi®, Colonia, Alemania)

siguiendo las instrucciones del proveedor, y se realizó un marcaje intracitoplásmico con bloqueo del aparato de Golgi con Brefeldina A 1:100. Con respecto al marcaje, se eligió la combinación CD3-PECy7; CD4-FITC; CD56-V450; e IFN $\gamma$ -PE. Para analizar los resultados las células se adquirieron utilizando un citómetro de flujo espectral Cytex® Aurora (Cytex, California, EE.UU.). El análisis poblacional se realizó con el software Kaluza.

## **6.9 Determinación de Linfocitos B específicos frente a RBD mediante**

### **EliSpot B**

A los 10 días del cultivo, siguiendo la estructura descrita en el apartado 6.7, se aislaron los Linfocitos B y se sembraron directamente en placas FluoroSpot™ de captura de IgG (MabTech). Siguiendo las instrucciones del fabricante, se emplearon  $2 \times 10^5$  células por pocillo en aquellos pocillos que fueron diseñados para detectar *spots* de IgG específicas frente a RBD y  $5 \times 10^4$  células tanto en los pocillos empleados para detectar IgG total como en los empleados como control negativo. Posteriormente se incubaron durante 16 a 18 h a 37 °C. Tras lavar repetidamente con PBS se añadió RBD-WASP diluido en PBS-BSA 0,1% (concentración final 4%) a los pocillos experimentales, y PBS-BSA 0,1% en los otros pocillos. Tras una incubación de dos horas a temperatura ambiente, se lavó nuevamente con PBS y se añadió:

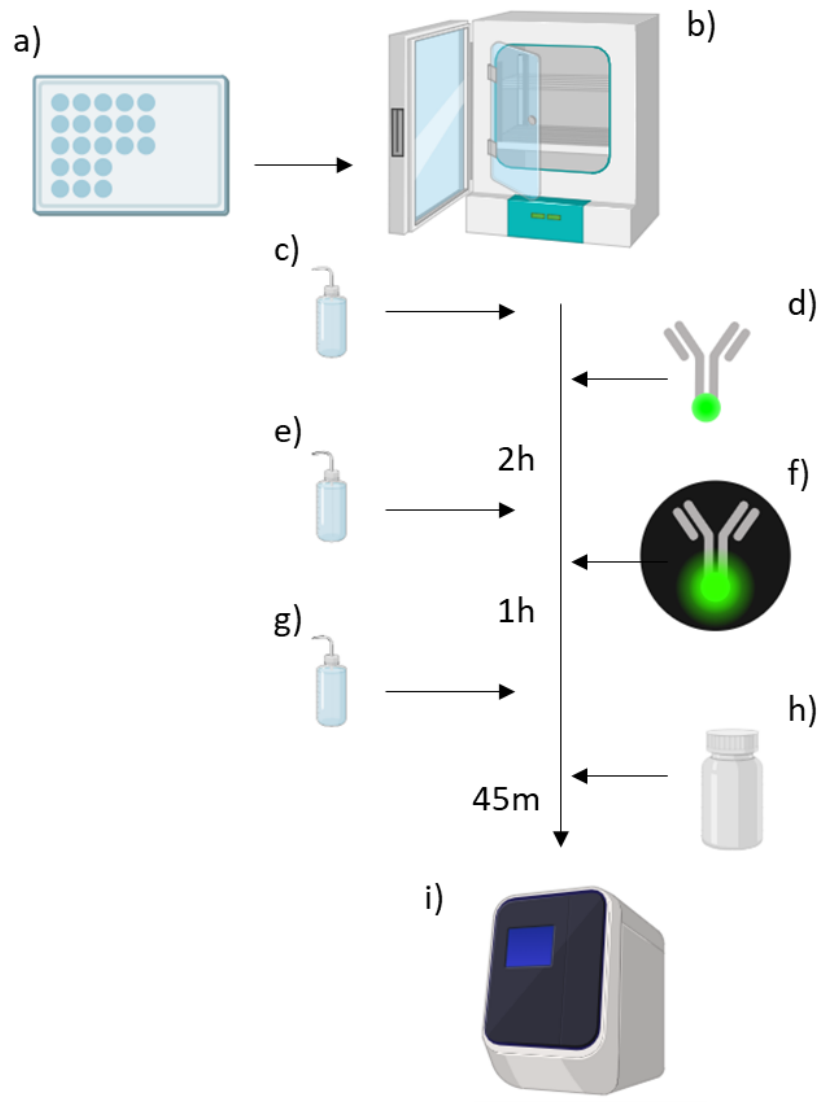
-IgG anti-WASP-640 diluido en PBS-BSA 0,1% (concentración final 0,5%) en los pocillos experimentales.

-MT78/145-550 diluido en PBS-BSA 0,1% (concentración final 0,2%) en los pocillos de IgG total.

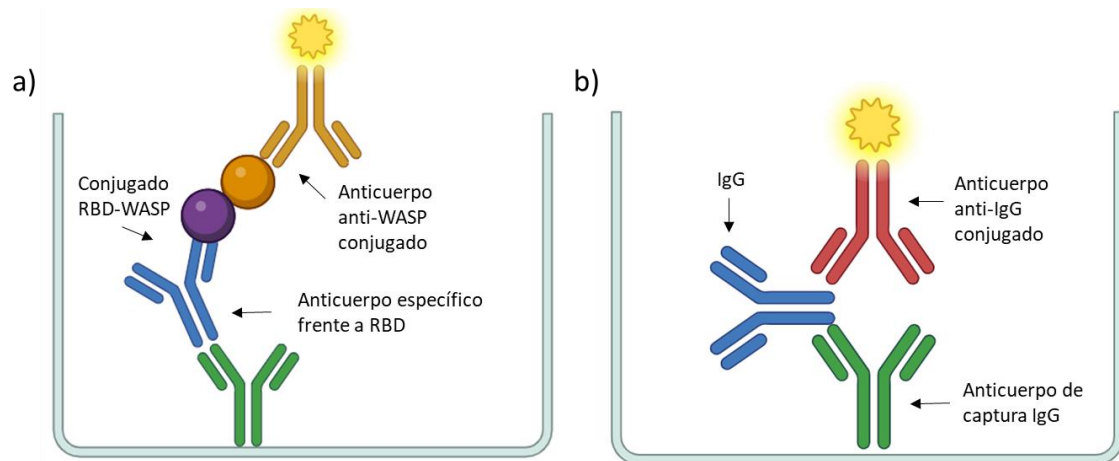
-PBS-BSA 0,1% a los pocillos de control negativo.

Se volvió a incubar durante una hora, se repitió el lavado con PBS y se añadió potenciador de Fluorospot durante 15 minutos. Después de retirar el potenciador, la placa se secó durante 45 minutos para finalizar contando los *spots* mediante el lector IRIS™ FluoroSpot (MabTech) (Fig. 18 y Fig. 19).

Para cuantificar las respuestas mediadas por linfocitos B específicos, se restaron los *spots* de su control negativo a los *spots* de los pocillos de las muestras. Los resultados se expresaron como SFU productoras de IgG específicas frente a RBD por  $10^6$  células. Se consideraron positivos aquellos valores tres veces superiores a la media de los pocillos de control negativo, estableciéndose el punto de corte en 5 SFU/ $10^6$  PBMCs. El punto de corte para IgG total se estableció en 100 SFU/ $10^6$  PBMCs de acuerdo con las instrucciones del proveedor.



**Fig. 18.** Esquema realización Fluorospot y Elispot. a) Cultivo de las células aisladas junto con los antígenos en la placa de fluorospot, en la placa de elispot no se añadieron reactivos adicionales; b) Incubación 16-18h; c) Lavado; d) Anticuerpos de detección; e) Lavado; f) Fluoróforos combinados con anticuerpos; g) Lavado; h) Adición del enhancer; i) Lectura.



**Fig. 19.** Representación de dos pocillos en la técnica de Elispot B. a) Pocillo para la detección de anticuerpo específico frente a RBD; b) Pocillo para la detección de IgG total.

## **6.10 Análisis del transcriptoma de Linfocitos B**

En los linfocitos B aislados tras los 10 días de cultivo (ver apartado 6.7) se analizó el transcriptoma por secuenciación *RNA-seq3'*. Se incluyeron cuatro controles y cinco pacientes: P8, P12, P13, P15 y P21. Se incluyeron dos muestras de P21 obtenidas en dos ocasiones distintas y separadas en el tiempo para valorar la reproducibilidad del ensayo.

El ARN se extrajo de los linfocitos B aislados utilizando el kit RNeasy® Plus Micro (Qiagen, Hilden, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Este ARN se midió utilizando NanoDrop (ThermoFisher, Massachusetts, EE.UU.) y se mantuvo a -80°C hasta su uso posterior. Antes del análisis de *RNA-seq3'*, se comprobó la concentración de ARN mediante su determinación por Qubit (ThermoFisher, Massachusetts, EE.UU.) y su integridad mediante Bionalyzer (Agilent, California, EE.UU.). En conjunto se obtuvo entre 110 y 480 ng de ARN, con una calidad suficiente para realizar la técnica de *RNA-seq3'* (RQS/RIN entre 5,5 y 8,3). Para obtener la biblioteca se decidió usar 100ng de ARN de cada muestra.

Las muestras de ARN se procesaron en las instalaciones del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, donde se procedió a convertir en bibliotecas de secuenciación de ADNc con el kit de preparación de biblioteca QuantSeq 3' mRNA-Seq V2 (FWD, Cat. No. 191) de Illumina (Lexogen, Viena, Austria). La generación de bibliotecas se inicia mediante transcripción inversa con cebado oligodT, seguida de una síntesis de segunda cadena cebada aleatoriamente. Se utilizó un módulo de síntesis de segunda hebra UMI, en el que se utilizan cebadores aleatorios que presentan una etiqueta de identificador molecular único de 6 nucleótidos para minimizar las ambigüedades en la identificación del producto de secuenciación. Las bibliotecas se

completaron mediante PCR y se secuenciaron en un secuenciador Illumina NextSeq 550 siguiendo los protocolos del fabricante.

Las imágenes generadas por el secuenciador se analizaron asignando bases nucleicas a picos de cromatograma por ciclo (o basecalling) y asignando la puntuación de la calidad con el software de análisis primario integrado Real Time Analysis (RTA v2) (Illumina, California, EE.UU.). La conversión de archivos binarios BCL producidos al formato FASTQ se realiza posteriormente con bcl2fastq2 desde Local Run Manager (Illumina, California, EE.UU.).

En los archivos FASTQ, las lecturas se recortaron primero con bbdup de BBTools (Bushnell B., BBDMap, <https://sourceforge.net/projects/bbmap/>) para eliminar secuencias de adaptadores y colas de poliA. Luego, las lecturas recortadas se alinearon con el genoma GRCh38/hg38 con STAR v 2.5 (195). El recuento de lectura se realizó con HTSeq (196). El análisis de expresión génica diferencial se realizó con DESeq2 (197). Dicha expresión fue comparada con la base de datos existente en la plataforma GSEA versión 4.3.2 (UC San Diego, California, EE.UU.), la cual utiliza conjuntos de genes predefinidos según el área de interés de la base de datos de firmas moleculares (MSigDB v5.0) (198). Para este estudio, se utilizó el grupo “C7 collection: immunologic signature gene sets” junto con la lista de genes con un log2FoldChange>1.2 para determinar los genes con expresión diferenciada relevantes desde el punto de vista inmunológico. El análisis de las vías involucradas por la expresión diferencial de los genes se realizó con la plataforma Ingenuity Pathway Analysis. Con esta plataforma se puede realizar un análisis de detección de moléculas reguladoras de rutas que explican la expresión de otras moléculas (“Upstream analysis”). El análisis conjuga la información tanto la expresión diferenciada observada en una muestra junto con una base de datos propia (“Ingenuity Knowledge Base”).

### **6.11 Análisis de citoquinas en el sobrenadante**

Tras descongelar los sobrenadantes recogidos al final del cultivo de estimulación (ver apartado 6.7), se empleó el kit MILLIPLEX® Human Cytokine/Chemokine/Growth Factor Panel A 38 Plex Premixed Magnetic Bead Panel - Immunology Multiplex Assay (Millipore Merck, Massachusetts, EE.UU.) para cuantificar las siguientes citoquinas: IL-1 $\alpha$ , IL2; IL4; IL6; IL10; IL17- $\alpha$ ; IL21; IL12/23; APRIL; BAFF; BTLA; IFN- $\alpha$ ; IFN- $\gamma$ ; TRAIL; TNF- $\alpha$  y VEGF-  $\alpha$ . Se realizó la lectura con Luminex 200™ System (ThermoFisher, Massachusetts, EE.UU.).

### **6.12 Análisis estadístico**

Las variables cualitativas se expresaron como frecuencias absolutas y relativas. Las variables categóricas se compararon mediante  $\chi^2$  o el test exacto de Fisher. Los datos cuantitativos se informaron como la mediana con rango intercuartílico. Para comparar las variables continuas se utilizó la t de Student o el test de U de Mann-Whitney según correspondiera. Las medidas repetidas se compararon con el test de rangos con signos de Wilcoxon o el test de McNemar, según correspondiera. El análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) y R versión 3.6.1 con el paquete CA.

### **6.13 Aprobación ética**

Los individuos se reclutaron siguiendo las directrices de la Declaración de Helsinki. Todos los pacientes reclutados se trataron de manera anónima tras su inclusión en bases de datos. Previamente se recogieron los datos clínicos y analíticos necesarios para el estudio. En el estudio no se llevaron a cabo intervenciones diagnósticas o terapéuticas con implicaciones o riesgo para los pacientes. El estudio recibió la aprobación del Comité Ético para la Investigación Clínica del Hospital Universitario 12 de Octubre (Referencia 20/167).

El modelo de consentimiento informado para cada uno de los individuos que participaron como controles sanos en el estudio fue aprobado por el Comité Ético.

Los fondos requeridos para la elaboración de este estudio provienen de los proyectos “CÍVICO: Aspectos clínicos, inmunoviroológicos y epidemiológicos de la infección por SARS-CoV-2 (COVID-19) en diferentes grupos poblacionales en un área del sur de Madrid” (Expediente COV20/0082) y “STOP Coronavirus. Factores clínicos, inmunológicos, genómicos, virológicos y bioéticos” (Expediente COV20/00181).



## **7.- Resultados**

### **7.1 Descripción de los pacientes sometidos a estudio**

#### **7.1.1 Pacientes con IDCV**

Un total de 22 pacientes con IDCV fueron incluidos como cohorte de estudio y mantuvieron seguimiento clínico y analítico durante 2 años. Los estudios realizados con cada paciente aparecen recogidos en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Análisis realizado a cada paciente.

Paciente	Análisis de respuesta tras 1ª y 2ª dosis de vacuna	Anticuerpos previos a cuarta dosis	Evaluación Linfocitos B <i>ex vivo</i> *	Confirmación de la citometría con análisis a los 6 días de cultivo	Análisis transcriptoma
P1	X	X	X	X	
P2	X	X	X		
P3	X	X	X		
P4	X	X	X		
P5	X	X	X		
P6	X	X	X		
P7	X	X	X		
P8	X	X	X		X
P9	X	X	X		
P10	X	X	X		
P11	X	X	X		
P12	X	X	X	X	X
P13	X	X	X		X
P14	X	X	X		
P15	X	X	X		X
P16	X	X	X		
P17	X	X			
P18	X	X			
P19		X	X		
P20		X	X		
P21		X	X	X	X
P22		X	X		

\*Se sometieron a determinación de anticuerpos específicos frente a S y específicos frente a N mediante ELISA, a la determinación de la inmunidad celular de los Linfocitos T específica frente a S1 mediante FluoroSpot, a la estimulación *ex vivo* de Linfocitos B, a la citometría de flujo espectral y a la determinación de Linfocitos B específicos frente a RBD mediante EliSpot B. Los procedimientos están descritos en los apartados 6.4, 6.6, 6.7, 6.8 y 6.9.

La información agrupada de los datos clínicos, analíticos y terapéuticos de los 22 pacientes aparece recogida en la **Tabla 3**.

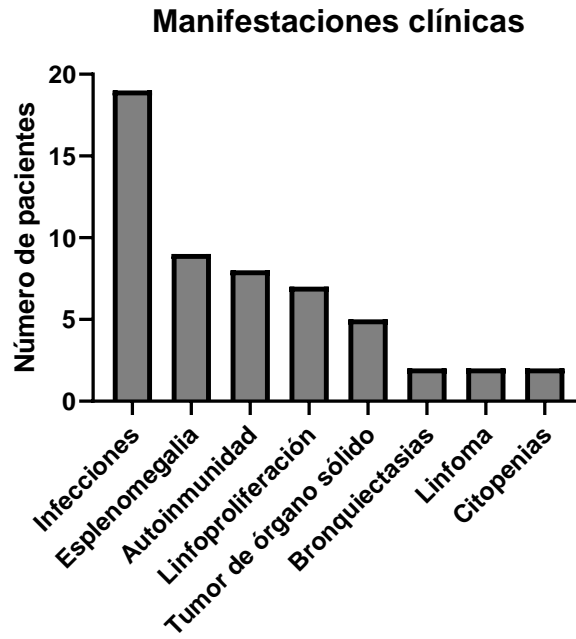
**Tabla 3.** Perfil de los pacientes incluidos en el estudio.

Categoría	Número de pacientes
Pacientes estudiados	22
<b>Sexo</b>	
Hombres	8
Mujeres	14
<b>Edad</b>	
Hasta 30	2
30-45	8
45-65	9
65 o más	3
<b>Grupo clínico</b>	
Sólo infecciones	7
Infecciones + autoinmunidad/linfoproliferación	15
<b>Perfil humoral</b>	
Bajas IgG e IgA	5
Baja IgG y alterada IgM	6
Bajas IgG e IgA y alterada IgM	11
<b>Perfil celular</b>	
Disminución del compartimento B de memoria (IgD+CD27+ y/o IgD-CD27+)	13
Aumento de linfocitos B CD21low	11
Aumento de linfocitos B transicionales	3
Descenso de población B IgD+CD27- (naïve)	4
Aumento LT efectores (CCR7-CD45RA-)	10
<b>Respuesta a vacunación</b>	
Respondieron frente antígenos polisacáridos	5
Respondieron frente antígenos proteicos	5
<b>Genética</b>	
Perfil genético asociado a IDCV*	4

\*Pacientes con variante posiblemente patogénica o patogénica según la última clasificación de EII (199).

La distribución hombre:mujer es de 8:14, suponiendo esto el 36,4% y el 73,6%, respectivamente. La edad media es de 44.27 años (rango de edad entre 24 y 74 años).

Clínicamente es una muestra variada. Siguiendo la clasificación de los pacientes según si presentaban infecciones exclusivamente o si entre sus síntomas presentaban fenómenos de autoinmunidad o linfoproliferación propuesta por Cunningham-Rundles (88), se pudo dividir la muestra en dos grupos: pertenecían al grupo de sólo infecciones si en su historia clínica sólo habían presentado clínica infecciosa; y se incluyeron al grupo autoinmunidad/linfoproliferación si presentaron algún síntoma de los siguientes: esplenomegalia (si el diámetro del bazo supera los 11cm en una determinación por prueba de imagen sin otra causa que lo explique), autoinmunidad (si ha sido diagnosticado de enfermedades autoinmunes como hipotiroidismo autoinmune, lupus eritematoso sistémico, síndrome antifosfolípídico, etc.), linfoproliferación (si se detectan adenopatías de forma continuada tanto en la exploración física como en pruebas de imagen y que no se pueden explicar por procesos infecciosos, oncológicos u otra causa primaria), tumores sólidos (diagnosticados), bronquiectasias (detectadas en pruebas de imagen en al menos dos ocasiones y habiéndose descartado cualquier otra causa intercurrente), linfomas (tanto de linfocitos B como de linfocitos T) y citopenias (tanto anemias como trombopenias mantenidas en el tiempo y sin otra causa que las justifique). Hubo tres pacientes que no mostraron clínica infecciosa y que se incluyeron en el grupo autoinmunidad/linfoproliferación. La Fig. 20 muestra el número de pacientes afectado por cada entidad patológica descrita previamente. Los síntomas no son excluyentes, es decir, un paciente puede presentar varias entidades a la vez.



**Fig. 20.** Representación del número de pacientes de la cohorte con cada entidad clínica.

La **Tabla 4** recoge los datos de cada historial clínico, analítico y terapéutico.

**Tabla 4.** Descripción de la cohorte de pacientes con IDCV y resultados de respuesta tras vacunación.

Paciente	Sexo	Edad	Antecedentes	Perfil IDCV	Ig al diagnóstico (mg/dL)	Perfil celular al diagnóstico	Respuesta a vacunación con polisacárido/proteína	IgT	Inmunosupresores/oncoterapia (fecha de última dosis)	Vacuna	Respuesta Anti-SARS-COV-2 (Humoral/Celular)
P1	M	49	Autoinmunidad. Tumor sólido.	A/L	IgG: 597 (baja) IgA: 84 IgM: 32 (baja)	-LB: 230 células/ $\mu$ l. $\downarrow$ N; $\downarrow$ SC; $\uparrow$ CD211 -LT: 937 células/ $\mu$ l. $\uparrow$ CD8+ ME	No/No	IGIV	Resección quirúrgica (2020)	BNT162b2	Sí/Sí
P2	M	66	ITR. Tumor sólido	A/L	IgG: 562 (baja) IgA: 49 (baja) IgM: 90	-LB: 192 células/ $\mu$ l. $\uparrow$ CD211 -LT: 876 células/ $\mu$ l. $\uparrow$ CD8+ ME	No/No	IGSC	Resección quirúrgica (2016)	BNT162b2	Sí/Sí
P3	M	60	ITR. Infecciones por Giardia. Autoinmunidad. Esplenectomizada	A/L	IgG: 326 (baja) IgA: < 6.6 (baja) IgM: 120	-LB: 1171 células/ $\mu$ l. $\downarrow$ ZM; $\downarrow$ SC; $\uparrow$ CD211 -LT: 2049 células/ $\mu$ l. $\uparrow$ CD8+ ME	No/No	IGSC	No	BNT162b2	Sí/Sí

P4	M	24	ITR. Bronquiectasias. Linfoma de Hodgkin. Tumor sólido.	A/L	IgG: 260 (baja) IgA: 31 (baja) IgM: 160	-LB: 18 células/μl. ↑CD21l; ↓IH  -LT:1478 células/μl. ↑ CD4+ y CD8+ ME; ↓ CD4+ y CD8+ N	No/Sí	IGIV	Bleomicina (2017) Etopósido (2017) Doxorubicina (2017) Ciclofosfamida (2017) Vincristina (2017) Procarbacin (2017) Corticoides (2017)	BNT162b2	Sí/No
P5	H	43	ITR. Autoinmunidad. Esplenomegalia. Linfadenopatías. GLILD. Linfoma MALT.	A/L	IgG: 426 (baja) IgA: 44 (baja) IgM: 23 (baja)	-LB: 64 células/μl. ↑CD21l  -LT: 1450 células/μl. ↑ CD8+ y CD4+ ME	No/No	IGSC	Corticoides (2020) Rituximab (2020)	BNT162b2	No/Sí
P6	H	72	ITR. Esplenomegalia. Linfadenopatías.	A/L	IgG: 534 (baja) IgA: < 6.6 (baja) IgM: 32 (baja)	-LB: 146 células/μl  -LT: 927 células/μl. ↓CD4+.	No/No	IGIV	No	BNT162b2	Sí/Sí
P7	M	61	Parálisis de Bell. Infecciones del tejido blando de repetición. Autoinmunidad. Hepato- esplenomegalia. Citopenias.	A/L	IgG: 379 (baja) IgA: 56 (baja) IgM: 9 (baja).	-LB: 85 células/μl. ↑CD21l  -LT: 776 células/μl. ↓CD4+. Ausencia de respuesta a test de quantiferón CMV.	Sí/No	IGIV	No	BNT162b2	No/No
P8	M	35	ITR	Inf	IgG: 521 (baja) IgA: 94 IgM: 13 (baja)	-LB: 82 células/μl. ↓SC  -LT: 743 células/μl	Sí/No	IGIV	No	BNT162b2	Sí/Sí

P9	H	47	ITR	Inf	IgG: 371 (baja) IgA: 43 (baja) IgM: 121	-LB: 22 células/ $\mu$ l  -LT: 104 células/ $\mu$ l	No/No	IGIV	No	BNT162b2	Sí/Sí
P10	H	32	ITR. Herpes Zóster. Esplenomegalia.	Inf	IgG: 491 (baja) IgA: < 6.6 (baja) IgM: 25 (baja)	-LB: 211 células/ $\mu$ l. $\downarrow$ N; $\downarrow$ SC; $\uparrow$ T.  -LT: 1736 células/ $\mu$ l. $\uparrow$ CD8+ ME.	No/No	IGSC	No	BNT162b2	Sí/Sí
P11	M	74	ITR, puntualmente asociada a sepsis.	Inf	IgG: 515 (baja) IgA: 133 IgM: 26 (baja)	-LB: 249 células/ $\mu$ l. $\downarrow$ N; $\downarrow$ SC.  -LT: 1868 células/ $\mu$ l.	No/No	IGIV	Corticoides (2021)	mRNA-1273	Sí/Sí
P12	M	38	ITR. Hepato- esplenomegalia. Linfadenopatías. Bronquiectasias.	A/L	IgG: 408 (baja) IgA: 99 IgM: 15 (baja)	-LB: 208 células/ $\mu$ l. $\downarrow$ ZM; $\downarrow$ SC; $\uparrow$ CD21; $\uparrow$ T. -LT: 828 células/ $\mu$ l. $\uparrow$ CD8+ ME.	No/Sí	IGIV	No	mRNA-1273	Sí/Sí
P13	M	46	Autoinmunidad. Tumor sólido	A/L	IgG: 445 (baja) IgA: 18 (baja) IgM: 27 (baja)	-LB: 343 células/ $\mu$ l. Ausencia de plasmablastos  -LT: 948 células/ $\mu$ l.	No/No	IGIV	Resección quirúrgica (2019) Corticoides (2022)	mRNA-1273	Sí/No
P14	H	58	ITR.	Inf	IgG: 595 (baja) IgA: 125 IgM: 31 (baja)	-LB: 224 células/ $\mu$ l. $\downarrow$ SC.  -LT: 1287 células/ $\mu$ l. $\uparrow$ CD8+ ME	Sí/Sí	IGIV	No	mRNA-1273	Sí/Sí

P15	M	62	ITR.	Inf	IgG: 345 (baja) IgA: 115 IgM: 8 (baja)	-LB: 37 células/μl. -LT: 575 células/μl. ↑CD8+ ME.	No/Sí	IGIV	No	mRNA-1273	Sí/Sí
P16	H	62	ITR. Esplenomegalia. Citopenias.	A/L	IgG: 667 (baja) IgA: < 6.6 (baja) IgM: 15 (baja)	-LB: 63 células/μl. ↓N; ↓SC -LT: 696 cells/μl	Sí/Sí	IGSC	No	ChADox1	Sí/Sí
P17	M	47	Infecciones de repetición: ITU, C. Jejuni, infecciones fúngicas. Otitis. Autoinmunidad	A/L	IgG: 448 (baja) IgA: <6.6 (baja) IgM: 25 (baja)	-LB: 20 células/μl. ↓IH. -LT: 1427 células/μl. ↓TH1; ↑TH17.	No/No	No	Azatioprina (2011) Leflunomida (2011) Etarnecept (2013) Rituximab (2018) Corticoides (2022) Sulfasalazina (2022)	BNT162b2	No/Sí
P18	M	24*	Autoinmunidad. Linfadenopatías	A/L	IgG: 149 (baja) IgA: <6.6 (baja) IgM: 360 (alta)	-LB: 170 células/μl. ↓SC; ↑CD21; ↑T. -LT 1001 células/μl. ↓CD4+; ↑CD8+ ME.	No/No	IVIG	Rituximab (2010) Corticoides (2020)	mRNA-1273	Sí/Sí
P19	M	36	ITR. Autoinmunidad. Esplenomegalia. Linfadenopatías.	A/L	IgG: 124 (baja) IgA:<6.6 (baja) IgM: 3 (baja)	-LB: 132 células/μl. ↓ZM; ↓SC; ↑CD21 -LT: 1124 células/μl. ↑ CD4+ y CD8+ ME	Sí/No	IGIV	Metrotrexato (2019) Corticoides (2022)	mRNA-1273	Sí/Sí**

P20	M	34	ITR. Autoinmunidad. Esplenomegalia. Linfadenopatías. Tumor sólido.	A/L	IgG: 91 (low) IgA: < 6.6 (low) IgM: 80	-LB: 376 cells/μl. -LT: 1024 cells/μl.	No/No	IGIV	Rituximab (2022) Corticoides (2023)	mRNA-1273	Sí/Sí**
P21	H	35	ITR. Linfadenopatías.	A/L	IgG: 380 (baja) IgA: 30 (baja) IgM: <18 (baja)	-LB: 436 células/μl. ↓SC; ↑CD21; ausencia de plasmablastos. -LT: 758 cells/μl.	No/No	IGIV	No	BNT162b2	Sí/Sí**
P22	H	31	ITR	Inf	IgG: 388 (baja) IgA: <6.6 (baja) IgM: 26 (baja)	-LB: 46 células/μl. ↓SC; ↑CD21. -LT: 1249 células/μl.	No/No	SCIG	No	BNT162b2	Sí/Sí**

Rangos de normalidad: IgG 700-1600 mg/dl; IgA 70-400 mg/dl; IgM 40-230; LB 100–500 células/μl; LT 850–2250 células/μl. A/L autoinmune/linfoproliferativo (grupo); CD21: LB CD21low; Inf: Sólo infecciones (grupo); H: Hombre; M: Mujer; GLILD: Enfermedad pulmonar intersticial linfogranulomatosa; HE: heterocigosidad; Ig: Inmunoglobulina; IgT: Tratamiento de reemplazo con inmunoglobulinas; IGIV: Inmunoglobulina intravenosa; IGSC: Inmunoglobulina subcutánea SCIG; IH: Isohemaglutininas; ITR: Infecciones del tracto respiratorio; ITU: Infecciones del tracto urinario; T: LB transicionales; MALT: Tejido linfoide asociado a mucosa; ME: Memoria efectora; N: Naïve; NA: no evaluado; SC: Cambio de clase; ZM: Zona Marginal. \*Edad en el momento del estudio, actualmente fallecida. \*\*Resultados no incluidos en el análisis agrupado de respuesta a la vacunación ya que dicho análisis se publicó antes de que se incluyeran estos pacientes en la cohorte.

Respecto al perfil genético de los pacientes, ninguno presentó variantes genéticas descritas como patológicas. La mayoría de las variantes encontradas son VOUS con algunas excepciones, las cuales se corresponden a variantes que en la literatura aparecen como posiblemente asociadas a la IDCV (55,199). A continuación, se detallan las variantes encontradas en cada paciente:

- P1:
  - AICDA: este gen codifica para la citidina desaminasa AID, con actividad sobre ADN muy específica y activa en Linfocitos B de centro germinal, donde participa en la hipermutación somática y la recombinación de genes para el cambio de clase de inmunoglobulinas. En él se encontró el cambio c.384\_385delGC en heterocigosis, localizado en el dominio APOBEC, muy cercano al bucle de reconocimiento de la proteína.
  - MAP3K14: codifica para la proteína quinasa serina/treonina activada por mitógenos, del mismo nombre. Se une a TRAF2 y estimula la actividad de NF-kappaB. Se encontró en este gen la variante c.655\_656insC en heterocigosis, en la secuencia que es necesaria para su localización nuclear.
  - DCLRE1C: en el gen que codifica para la proteína del mismo nombre, que participa en la recombinación de V(D)J y la reparación del ADN, se encontró el cambio c.2053\_2054insA en heterocigosis en el extremo C-terminal.
  - ATM: gen que codifica para la proteína *Ataxia Telangiectasia Mutated*, quinasa reguladora del ciclo celular a través de la regulación de multitud de proteínas como las supresoras de tumores p53 y BRCA1, y de la respuesta celular al daño del ADN y mantenimiento de la estabilidad del genoma. Se encontró la variante c.5948A>G en heterocigosis, localizada al inicio de la molécula. Se ha descrito cómo la disminución de la expresión de la proteína ATM perjudica el reclutamiento de otros factores de reparación, retrasa la reparación del daño y promueve la apoptosis en poblaciones linfocitarias(200).
  - C3: codifica para la convertasa C3, punto central de activación del complemento tanto para la vía clásica como en la alternativa. Después de la activación, se escinde en C3b, que puede unirse covalentemente a través de su tioéster reactivo a los carbohidratos de la superficie celular o a los agregados inmunes; y en la anafilatoxina C3a, la cual es una mediadora del proceso inflamatorio local. Se identificó la variante c.1898A>G en heterocigosis localizada en el

dominio LNK, zona de dimerización de los péptidos alfa y beta que componen la proteína C3.

- ITGB2: codifica para la cadena beta de integrina, que se combina con múltiples cadenas alfa diferentes para formar distintos heterodímeros de integrina. Se localizó la variante c.1062A>T en heterocigosis en el dominio Von Willebrand  $\alpha$ .
- GATA2: factor de transcripción implicado en el mantenimiento de las células madre con funciones clave en el desarrollo hematopoyético. En un tramo del gen que precede al dominio de dedos de zinc 1 (región de interacción con el ADN) se encontró la variante c.481C>G en heterocigosis.
- AP3B1: gen que codifica para una proteína que desempeña un papel relevante en la biogénesis de orgánulos asociados a melanosomas, gránulos densos de plaquetas y lisosomas. Se encontró la variante c.2915A>G en heterocigosis, localizada en una región anterior al apéndice de adaptación B2, necesario para la conexión de la proteína con otras moléculas como la clatrina.
- IL17RC: c.1133A>G en heterocigosis. Forma parte del dominio extracelular. Es el receptor de IL17 y la vía TGF-Beta. La ruta de señalización de la IL17 tiene una gran importancia en la generación de la respuesta inflamatoria, estimulando la producción de defensinas, citoquinas como CXCL1 o CXCL2 y factores de proliferación leucocitaria como el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF).
- TLR3: es un miembro de la familia de receptores tipo Toll que juega un papel fundamental en el reconocimiento de ARN viral de doble cadena y la activación de la inmunidad innata (mediada por ejemplo por activación de NF-kappaB y la producción de interferones tipo I). Se encontró la variante c.1295A>G en heterocigosis, localizada en un dominio rico en leucinas que forma parte de la porción extramembrana de TLR3.
- RLTPR: este gen codifica un miembro de la familia de proteínas CARMIL, que interactúa con la proteína de protección heterodimérica y la regula negativamente, promoviendo la migración celular. Se identificó el cambio c.1846A>G en heterocigosis en un dominio rico en leucinas.
- NCF1: esta oxidasa es una enzima multicomponente que se activa para producir anión superóxido. El cambio c.295G>A identificado en heterocigosis se localiza en el dominio Phox, importante para la señalización y el tráfico vesicular.
- DOCK8: forma parte de la familia de factores de intercambio de nucleótidos de guanina, con funciones de mantenimiento del citoesqueleto, y por tanto de las

capacidades de movimiento y migración de células T y NK. Se identificó el cambio c.1966C>G en heterocigosis en su dominio C2 capaz de interactuar con el fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato.

- RTEL1: helicasa que funciona en la estabilidad, protección y elongación de los telómeros. Se encontró el cambio c.1625G> en heterocigosis en un dominio rico en nucleótido trifosfato hidrolasas.
- TCF3: su papel consiste en favorecer la transcripción uniéndose a secuencias reguladoras de Box E en genes diana, desempeñando un papel fundamental en la linfopoyesis y el desarrollo de los linfocitos B y T. Se encontró el cambio c.1577C>G en heterocigosis localizado previamente al dominio de unión al ADN.
- TNFRSF13B: El producto proteico de este gen desempeña un papel crucial en la inmunidad humoral cuando interactúa con un ligando de TNF. Induce la activación de los factores de transcripción NFAT, AP1 y NF-kappa-B al interactuar con el modulador del calcio y el ligando de ciclofilina. Se encontró la variante c.198C>A en heterocigosis, muy cercana al extremo N-terminal y que provoca un *STOP* que afecta a la mayoría de la proteína. Esta mutación tan determinante en el producto proteico y con posible patrón de herencia autosómico recesivo se consideró por tanto como posiblemente patogénica.
- P2:
  - C3: la variante c.3124C>T se encontró en un dominio alfa-macroglobulina del factor C3 del complemento, que media en la unión covalente de la alfa-macroglobulina (molécula anticoagulante) a la proteinasa.
  - CR2: en este receptor de complemento que también funciona como receptor del virus de Epstein-Barr se encontró la variante c.1152C>T en heterocigosis, en un dominio de regulación del complemento.
  - FERMT3: codifica para una proteína que participa en la activación de integrinas y, por lo tanto, tienen un papel en la adhesión, migración, diferenciación y proliferación celular. La proteína codificada por este gen tiene un papel clave en la regulación de la hemostasia y la trombosis. El cambio c.268C>T, encontrado en heterocigosis, se localiza en el extremo N-terminal, se encuentra en un regulador de los receptores de adhesión de integrinas heterodiméricas que promueve la activación de las integrinas.
  - PRF1: gen codificante de perforina, proteína de estructura similar a C9, que forma poros en la membrana de células diana que permiten la penetración de granzimas y su posterior citólisis. El cambio es c.1257G>A en heterocigosis se

ubica en el dominio C2, implicado en la unión de fosfolípidos dependientes de calcio y en procesos de localización en membranas.

- RBCK1: la proteína codificada por este gen tiene la capacidad de unión a ubiquitinas, lo que la permite intervenir en la señalización del TCR, del TNF $\alpha$ , en el metabolismo de proteínas y la regulación de la actividad del factor de transcripción de unión al ADN. El cambio c.998C>T en heterocigosis se encuentra en una posición posterior al dedo de zinc y anterior al dominio ubiquitín ligasa-1. Permite varias funciones a través de la señalización mediante TNF, incluida la actividad de unión a proteínas y a ubiquitina,
- P3: No presentaba variantes.
- P4:
  - LRBA: gen cuyo producto se asocia con la proteína quinasa A y puede participar en la conducción de vesículas intracelulares hacia complejos receptores activados, lo que ayuda en la secreción y/o el depósito en la membrana de moléculas efectoras inmunitarias. El defecto se halla en c.4599C>T en heterocigosis, localizado en el dominio transmembrana. Su expresión es inducida en Linfocitos B y los macrófagos tras exposición a lipopolisacáridos bacterianos.
  - NLRP12: la proteína generada funciona como un factor atenuante de la inflamación al suprimir las respuestas inflamatorias en los monocitos activados. La variante es c.2079A>G en heterocigosis. Localizado posteriormente al dominio NACHT (dominio NTPasa) y previo a los dominios ricos en leucina.
  - NOD2: este gen codifica para una molécula que desempeña un papel en la respuesta inmune a los lipopolisacáridos bacterianos intracelulares al reconocer el dipéptido muramilo derivado de ellos y activar la proteína NF-K $\beta$ . La variante c.2753C>A está en heterocigosis. Localizado posteriormente al dominio NACHT y previo a los dominios ricos en leucina.
  - CARD11: la proteína generada interactúa con BCL10, una proteína conocida por funcionar como un regulador positivo de la apoptosis celular y la activación de NF-kappaB. Cuando se expresa en células, esta proteína activa NF-kappaB e induce la fosforilación de BCL10. La variante es c.1528G>A en heterocigosis. Está incluida en el dominio inhibidor de la molécula. Al presentar una variante en su dominio inhibitorio y poder ser el patrón de herencia autosómico recesivo, se consideró esta variante como posiblemente patogénica.

- P5:
  - TICAM1: la proteína que se produce es una adaptadora que contiene un dominio de homología del receptor Toll/IL1 o TIR, el cual es un dominio de señalización intracelular que media las interacciones proteína-proteína entre los receptores tipo Toll y los componentes de transducción de señales. Esta proteína participa en la inmunidad innata contra patógenos invasores interactuando específicamente con TLR3, pero no con otros. El cambio es c.680C>T en heterocigosis. Se localiza en la región desorganizada previa al motivo de unión con TRAF6.
  - NCF1: la modificación es c.1050C>G en heterocigosis. La variante se encuentra en el extremo C-terminal, en un dominio desorganizado.
- P6:
  - DNMT3: su producto es uno de varios modificadores epigenéticos identificados como mutados recurrentemente en la leucemia mieloide aguda. La variante es c.1996+9C>T en heterocigosis. Se encuentra en una región desordenada rica en prolina.
  - ISG15: su producto es una proteína similar a la ubiquitina que se conjuga con proteínas diana intracelulares tras la activación por interferón alfa e interferón beta. El cambio es c.400C>A en heterocigosis. Localizada en el dominio Ubiquitina 2.
  - RAG2: la proteína generada está involucrada en la activación de la recombinación de las secuencias V-D-J de las inmunoglobulinas a través de la señalización mediante RAF/MAP. El cambio es c.1158C>A en heterocigosis. Se encuentra en la región bisagra, en un dominio con función autoinhibitoria.
- P7:
  - DOCK8: en el gen codificante de esta proteína involucrada en la citoquinesis de linfocitos. Se encontró el cambio c.4283A>G en heterocigosis, previa al dominio de acoplamiento.
  - LRBA: el cambio es c.4599C>T en heterocigosis, incluido en el dominio transmembrana.
  - PMS2: genera una proteína con función de reparación de errores del ADN, la cual elimina pequeñas inserciones y deleciones que pueden ocurrir durante la replicación del ADN y la recombinación homóloga. El cambio es c.1004A>G en heterocigosis. Localizada en una región relevante para la reparación del ADN.

- STX11: la proteína generada puede regular el transporte de proteínas entre los endosomas tardíos y la red trans-Golgi. Relacionado con la linfocitosis hemofagocítica familiar. La variante es c.799G>A en heterocigosis. Afecta al último nucleótido del dominio SNARE, implicado en la focalización y fusión de vesículas de transporte intracelular.
- TAPBP: su producto es una glicoproteína transmembrana que media la interacción entre las moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad recién ensambladas y el transportador asociado con el procesamiento de antígenos o TAP, que es necesario para el transporte de péptidos antigénicos a través de la membrana del retículo endoplásmico. La variante es c.\*1550CT>T en heterocigosis. Afecta al dominio *immunoglobulina-like*.
- TMC8: genera una proteína que se localiza en el retículo endoplásmico y con posible función como canales transmembrana. La variante es c.664C>T en heterocigosis. Es un dominio transmembrana.
- NCF2: la proteína generada actúa de manera análoga a NCF1. La variante es c.714-38GA>AG en heterocigosis. Previo al dominio SH3, lugar relevante para la actividad con otras proteínas.
- PIK3CD: molécula que produce a la fosfoinositida 3-quinasa, que fosforila los lípidos de inositol y participan en la respuesta inmune. El cambio esc.1242+2G>A en heterocigosis. Región intrónica relacionada con el dominio C2, con función de localización en membrana.
- STIM1: genera una proteína transmembrana que media el flujo de calcio tras el agotamiento de las reservas intracelulares de calcio mediante la activación de canales. El cambio es c.970-6C>T en heterocigosis. Región intrónica previa a la región SOAR/CAR (región asociada a la activación de la proteína).
- P8:
  - AIRE: factor transcripcional que se expresa en la médula tímica, involucrado en la eliminación de células T autorreactivas que podrían favorecer fenómenos autoinmunes (síndrome APECED y APS tipo I). El cambio c.595G>A en heterocigosis se localizó en el dominio PHD1, relevante por su capacidad para interaccionar con la histona H3.
- P9: no se dispuso de muestra para este estudio.

- P10:
  - BLNK: la proteína generada es un conector citoplásmico que desempeña un papel fundamental en el desarrollo de los Linfocitos B. Esta proteína une la activación de la quinasa asociada al BCR con sus vías de señalización posteriores. Las mutaciones en este gen causan hipoglobulinemia y ausencia de Linfocitos B, dándose un bloqueo en la transición de pro a pre-Linfocitos B. La variante es c.352G>A en heterocigosis, localizada en una región rica en prolina dentro del *core* proteico.
  - CIITA: genera una proteína nuclear que actúa como un regulador positivo de la transcripción de genes del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II. Las mutaciones en este gen se han asociado con el síndrome de linfocitos desnudos tipo II, mayor susceptibilidad a la artritis reumatoide y esclerosis múltiple. El cambio es c.1113G>T en heterocigosis, localizado antes de la región NACHT.
  - RAG1: la proteína generada actúa de manera análoga a RAG2. El cambio es c.1185C>G en heterocigosis, localizado en una región de unión al ATP.
  - TAPBP: La variante es c.\*1550CT>T en heterocigosis. Afecta al dominio *immunoglobulina-like*.
  - TRNT1: genera una enzima que pertenece a la familia de la ARNt nucleotidiltransferasa/poli(A) polimerasa. Esta enzima esencial funciona catalizando la adición del triplete de nucleótidos CCA al extremo 3' de las moléculas de ARNt. El cambio es c.624T>A en heterocigosis. Se encuentra en un motivo asociado a la unión de la polimerasa A.
  - FADD: produce una molécula adaptadora que interactúa con varios receptores de la superficie celular y media en las señales apoptóticas. Las enfermedades asociadas incluyen inmunodeficiencia con encefalopatía, hiposplenía funcional, disfunción hepática y displasia otodental. Entre sus vías relacionadas se encuentran la vía TNFR1 y la dimerización de procaspasa-8. La variante es c.-50AGG>A en heterocigosis. Afecta a una región intrónica previa al inicio de la proteína.
  - PIK3CD: el cambio es c.1242+269G>A en heterocigosis. Región intrónica posterior al dominio RBD y anterior al dominio C2.
  - STIM1: la alteración es c.970-6C>T en heterocigosis. Región intrónica previa a la región SOAR/CAR.

- P11:
  - ATM. el cambio es c.2323T>G en heterocigosis. Está inmersa en el dominio HEAT
  - FADD. el cambio se localiza en c.62C>T en heterocigosis. Localizado en la región efector de muerte.
  - IRF7: produce un regulador transcripcional clave de las respuestas inmunitarias dependientes del interferón tipo I. Desempeña un papel fundamental en la respuesta inmunitaria innata contra los virus de ADN y ARN. El cambio es c.395-8TCT>T en heterocigosis. Situado en la región intrónica previa al dominio IAD1.
  - SMARCAL1: la proteína producida tiene actividad de helicasa y ATPasa y se cree que regulan la transcripción de ciertos genes alterando la estructura de la cromatina. La variante está en c.1196C>T en heterocigosis. Localizado posterior al dominio HARP2, región de unión al ADN.
- P12:
  - RTEL1: la alteración es c.3181+95G>C en heterocigosis. Región intrónica posterior a una zona desordenada
- P13:
  - CD19: la proteína producida forma un complejo con varias proteínas de membrana, incluyendo CD21 y CD81. Este complejo reduce el umbral para la activación de los Linfocitos B iniciada por antígeno, activando la vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa y la posterior liberación de reservas intracelulares de iones de calcio. La variante es c.381G>A en heterocigosis. Incluida en el dominio C2 *inmunoglobulina-like* extracelular. Miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas humanas.
  - TCN2: genera un miembro de la familia de proteínas transportadoras de vitamina B12. Se une a la cobalamina y media en el transporte de cobalamina al interior de las células. La variante es c.1229C>G en heterocigosis. Próximo al extremo C terminal en el dominio *transcobalamina-like*.
  - NLRP12: la variante es c.752A>G en heterocigosis. Localizado en el dominio NACHT.
  - PI3KR1: codifica la fosfatidilinositol 3-quinasa, que desempeña un papel importante en las acciones metabólicas de la insulina y en el desarrollo de la respuesta inmunitaria gracias a sus interacciones con otras moléculas como AKT o mTOR. La variante es c.889G>A en heterocigosis. Se encuentra en un dominio de activación Rho-GTPasa.

- CTSC: produce un miembro de la familia de la peptidasa. Parece ser un coordinador central para la activación de muchas serina-proteinasas en las células del sistema inmunológico. La alteración es c.401G>A en heterocigosis. Se encuentra en el límite entre el dominio de exclusión y el inicio del propéptido.
- P14:
  - IL21R: genera el receptor de IL21. La unión del ligando de este receptor por parte de IL21 conduce a la activación de múltiples moléculas de señalización posteriores, incluidas JAK1, JAK3, STAT1 y STAT3. La variante es c.-15-18A>G en heterocigosis. Ubicado en la región intrónica previa al inicio de la proteína.
  - PRKCD: codifica un miembro de la familia de quinasas C de proteínas serina/treonina. Es a la vez un supresor de tumores y un regulador positivo de la progresión del ciclo celular. El cambio es c.97A>C en heterocigosis. Se encuentra en el dominio C2 del extremo N-terminal.
  - STAT2: genera una proteína que, en respuesta al interferón, forma un complejo con STAT1 y la proteína p48, actuando como un transactivador sin la capacidad de unirse al ADN directamente. El cambio se localiza en c.759C>T en heterocigosis. Localizado en una región de interacción con IRF9.
  - CARMIL2: produce una de las proteínas CARMIL. La proteína codificada interactúa con la proteína de protección heterodimérica y la regula negativamente, promoviendo la migración celular. Se ha observado una expresión reducida de este gen en pacientes humanos con psoriasis. La variante es c.2581A>G en heterocigosis. Se halla en un dominio rico en histidina y aspartato.
- P15:
  - GFI1: la proteína producida funciona como parte de un complejo junto con otros cofactores para controlar las modificaciones de las histonas que conducen al silenciamiento de los promotores del gen diana. La variante es c.925-6\_925-5dupCT en heterocigosis. Se encuentra en el dominio C2H2 tipo 6. Actúa en diversos contextos del desarrollo, incluida la hematopoyesis y la oncogénesis.
  - ITPR3: la proteína generada interviene en la generación de inositol 1,4,5-trifosfato, un segundo mensajero que media la liberación de calcio intracelular. La alteración es c.5418T>C en heterocigosis. Se encuentra cerca del extremo C-terminal en una región desordenada.

- NLRP12: el cambio es c.779C>T en heterocigosis. Localizado en el dominio NACHT.
- P16:
  - G6PC3: codifica para una proteína que cataliza la hidrólisis de glucosa-6-fosfato a glucosa y fosfato en el último paso de las vías gluconeogénica y glucogenolítica. La alteración es c.566G>A en heterocigosis. Está en el dominio fosfatasa del ácido fosfatídico tipo 2.
  - IL17RC: el cambio es c.1539C>T en heterocigosis. Forma parte del dominio extracelular.
  - JAK3: codifica para una proteína miembro de la familia JAK, tirosinas quinasas implicadas en la transducción de señales intracelulares mediada por receptores de citoquinas. Entre sus vías relacionadas se encuentran las vías de señalización de IL-9 y la señalización de la familia de interleucina-2. El cambio se encuentra en c.1632G>T en heterocigosis. Ubicado en el dominio proteín-quinasa.
  - LYST: codifica para una proteína que regula el tráfico de proteínas intracelulares en los endosomas y puede estar involucrado en la pigmentación. La variante es c.748A>G en heterocigosis. Localizada en el dominio *armadillo*.
  - RFXANK: genera una proteína que une al motivo Box X de ciertos promotores del gen MHC de clase II y activa su transcripción. La variante es c.469C>G en heterocigosis. Se halla en la región con repeticiones de ankirina.
- P17:
  - IL6ST: codifica para una molécula con implicación en la señalización de IL6 e IL27. La variante es c.1464T>A en heterocigosis. Incluida en la región extracelular.
  - SPINK5: la proteína producida tiene actividad en la morfogénesis de la piel y el cabello, así como en la protección antiinflamatoria y antimicrobiana de los epitelios mucosos. Su defecto se asocia al síndrome de Netherton y la dermatitis exfoliativa. Variante en c.882+45G>GT en heterocigosis. Sección intrónica cercana al dominio inhibidor de serina proteasa.
- P18:
  - IGHM: codifica para las moléculas de reconocimiento de antígenos de los Linfocitos B. El cambio es c.1037C>T en heterocigosis. Localizada en el dominio CH4 extracelular.
  - POLE: la molécula generada participa en la replicación del ADN cromosómico, teniendo un papel relevante durante la síntesis de las cadenas de ADN. La

variante es c.4169G>A en heterocigosis. Situada entre el dominio de unión a la polimerasa B y el dominio de unión desconocida.

- ATM: presenta dos variantes, que son c.4060C>A y c.5039C>T en heterocigosis compuesta. La primera variante se encuentra antes de la región de interacción con ABL1 (una tirosín quinasa) y la segunda se encuentra anterior al dominio FAT. Al ser dos variantes en posición trans (según se confirmó posteriormente mediante técnica Sanger), se consideraron estas mutaciones patogénicas.
- CD247: genera una molécula que es parte del complejo TCR-CD3. Las señales mediadas por TCR se transmiten a través de la membrana celular por fosforilación de los motivos de activación basados en tirosina. Estos motivos se fosforilan por las proteínas tirosina quinasa LCK y FYN, lo que da como resultado la activación de vías de señalización posteriores. Variante en c.58+5G>T en heterocigosis. Región intrónica localizada antes del dominio ITAM.
- STAT3: la proteína codificada media la expresión de una variedad de genes en respuesta a estímulos celulares como citoquinas y factores de crecimiento y, por lo tanto, desempeña un papel clave en muchos procesos celulares, como el crecimiento celular y la apoptosis. Cambio localizado en c.1381G>C en heterocigosis. Se localiza en la región de unión al ADN.
- DOCK8: alteración en c.3889A>G en heterocigosis. Su posición es previa a la región de acoplamiento
- AIRE: el cambio es c.595G>A en heterocigosis. Se localiza en el dominio SAND, de importancia para el control de la transcripción.
- TTC7A: codifica una proteína con funciones diversas en el control del ciclo celular, el transporte de proteínas, el recambio de fosfato y el tráfico o secreción de proteínas, y pueden actuar como acompañantes o proteínas de andamiaje. Las mutaciones en este gen alteran el desarrollo intestinal y pueden provocar una enfermedad inflamatoria intestinal de aparición temprana y atresia intestinal. La variante es c.1287+10A>T en heterocigosis. Región intrónica posterior a la región de repetición TPR3.
- CTSC: codifica un coordinador central para la activación de serina proteinasas en las células del sistema inmunológico. Una porción del propéptido actúa como chaperona intramolecular para el plegamiento y la estabilización de la enzima madura. Variante en c.173-20C>T en heterocigosis. Localizada a nivel extracelular.

- P19:
  - TNFRSF13B: la alteración es c.260T>A en heterocigosis. Se encuentra en el dominio rico en cisteínas número dos de la molécula.
  - LPIN2: la proteína generada interviene en el metabolismo de los triglicéridos humanos. c.991G>T en heterocigosis. Se posiciona posterior al motivo de localización nuclear.
  - TYK2: genera una proteína miembro de la familia JAK que se asocia con el dominio citoplasmático de los receptores de citocinas y envía señales mediante la fosforilación de subunidades. También es un componente de las vías de señalización del interferón tipo I y tipo III. Alteración en c.859G>A en heterocigosis. Hallado en el dominio de localización en membrana.
  - LIG1: la proteína codificada funciona en la replicación, recombinación y proceso de reparación por escisión del ADN. El cambio es c.1567G>A en heterocigosis. Se encuentra anterior a la región de adenilación. Miembro de la familia de proteínas ADN ligasa dependiente de ATP.
  - AID: variante c.332C>T en heterocigosis. Localizada en el dominio APOBEC, muy cercano al bucle de reconocimiento de la proteína.
  - EXTL3: produce una glicosiltransferasa. La variante es c.1627G>A en heterocigosis. Se encuentra posterior al dominio *exostosín*.
  - TERT: el producto es una ribonucleoproteína polimerasa que mantiene los extremos de los telómeros mediante la adición de la repetición TTAGGG. Desempeña un papel en la senescencia celular, ya que normalmente está reprimido en las células somáticas posnatales, lo que resulta en un acortamiento progresivo de los telómeros. La desregulación de la expresión de la telomerasa en las células somáticas puede estar implicada en la oncogénesis. Su alteración se asocia a la disqueratosis congénita e insuficiencia de la médula ósea. Alteración en c.2555A>G en heterocigosis. Posicionado en el dominio de transcriptasa reversa.
- P20:
  - IL12RB1: la proteína producida presenta entre sus vías la señalización Akt y la señalización de la familia Interleucina-12. Variante en c.1137C>G en heterocigosis. Afecta a un dominio de unión a la membrana.
  - ADA2: genera una adenosina desaminasa que regula los niveles de adenosina molécula relevante para la señalización. Importantes implicaciones en el

metabolismo proteico y el sistema inmunitario innato. El cambio es c.272A>G en heterocigosis. Se localiza en el dominio de dimerización de la proteína.

- VPS45: la proteína desempeña un papel importante en la segregación de moléculas intracelulares en distintos orgánulos, en concreto, interviniendo en el transporte de vesículas a las vacuolas. Su defecto puede provocar neutropenia. El cambio es c.650C>T en heterocigosis. Se encuentra entre el segundo y tercer dominio que componen molécula.
- IL6ST: la variante se encuentra en c.1841-5\_1841-4delTT en heterocigosis. Localizado en la región intrónica posterior al motivo *Box-1*.
- SPINK5: Cambio en c.1964G>A en heterocigosis. Está situado en un dominio kazal 2.
- PMS2: alteración en c.943C>T en heterocigosis. Es una mutación sin sentido que provoca un *STOP* al inicio de la proteína, en un punto anterior a la región endonucleasa y las de interacción con otras moléculas, siendo su clasificación la de variante patogénica.
- TNFRSF13B: la variante es c.310T>C en heterocigosis. Se encuentra en el dominio rico en cisteínas número dos de la molécula, una mutación ya descrita en pacientes con inmunodeficiencias humorales(201).
- P21:
  - IL10RA: la proteína para la que codifica participa en funciones antiinflamatorias mediadas por IL10, limitando la alteración excesiva del tejido causada por la inflamación. Variante en c.1023C>A en heterocigosis. Afecta a la región intracitoplasmática, posterior al *Box* de unión de JAK1.
  - DOCK2: genera una molécula que participa en la remodelación del citoesqueleto de actina, necesario para la migración de linfocitos en respuesta a la señalización de quimiocinas. Alteración en c.3456C>G en heterocigosis. Se encuentra antes del dominio DHR-2, zona relevante para la citoquinesis.
  - NCF2: alteración en c.513A>G en heterocigosis. Localizado entre los dominios de tetratricopéptido 3 y 4, alejado de la región de interacción con otras proteínas
  - RAG2: la variante es c.22G>A en heterocigosis. Se encuentra al inicio de la proteína, en su *core*, alejado de los dominios funcionales.
  - CD40: codifica un miembro de la superfamilia de receptores de TNF. La interacción de este receptor y su ligando es necesaria para el cambio de clase de los linfocitos maduros. El cambio es c.-38G>C en heterocigosis. Situado en la región intrónica previa al inicio de las regiones exónicas.

- AIRE: el cambio está en c.717C>T en heterocigosis. Se encuentra en el dominio de unión al ADN.
- C3: modificación en c.1898A>G en heterocigosis. Localizado en el dominio LNK, zona de dimerización.
- P22:
  - ITPR3: se encuentra la variante c.859-12G>A en heterocigosis. Región intrónica entre dos dominios extracelulares que forman parte del canal del calcio.
  - IRAK4: su producto es una serina/treonina-proteína quinasa que desempeña un papel fundamental en el inicio de la respuesta inmune innata contra patógenos extraños. Variante en c.797A>G en heterocigosis. Afecta al dominio proteína quinasa.
  - OAS1: la molécula generada tiene un papel clave en la respuesta antiviral celular innata y se ha implicado en otros procesos celulares como el crecimiento celular y la apoptosis. La variante está en c.875C>T en heterocigosis. Está en una región posterior a un punto de interacción con el ADN.
  - NOD2: se encuentra el cambio c.2474A>G en heterocigosis. Afecta a un dominio rico en leucinas necesario para su activación.

### 7.1.2 Paciente con deficiencia de CD8 $\alpha$

La paciente con déficit de CD8 $\alpha$ , actualmente tiene 33 años y presenta antecedentes de bronquiolitis, neumonía y otitis recurrentes desde el primer mes de vida. Desarrolló asma y atelectasia a los 4 años y mostraba retraso del crecimiento a los 7 años. En la evaluación inicial en el año 2008 (18 años) presentó niveles normales de inmunoglobulinas y serología positiva para CMV, EBV y rubéola. Aunque tenía un recuento de linfocitos normal, tenía ausencia absoluta de células T CD8+ y un aumento de células T doble negativas (TCR $\alpha\beta$ +CD4-CD8-). Mostró una distribución normal de linfocitos B naïve y de memoria.

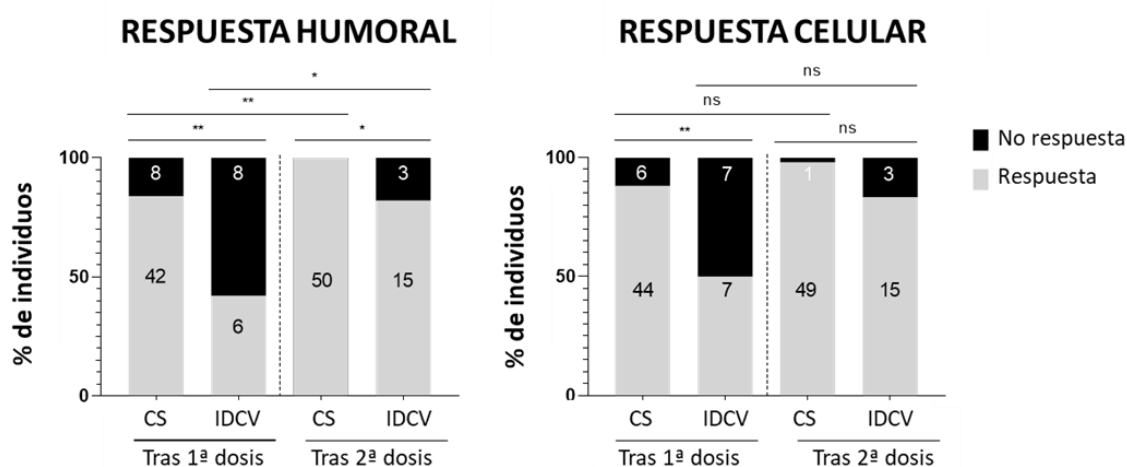
*In vitro*, células T doble negativas mostraban capacidad citotóxica, aunque subóptima. La secuenciación de los exones 1 y 2 del gen CD8A reveló la presencia de una mutación homocigótica p.Gly111Ser y la paciente fue diagnosticada con inmunodeficiencia por déficit de CD8, convirtiéndose en el segundo caso reportado a nivel mundial con deficiencia de CD8 $\alpha$  (202).

## **7.2 Respuesta humoral y celular de los pacientes con IDCV a la vacunación frente a SARS-CoV-2. Producción de anticuerpos neutralizantes**

Para valorar si la vacunación contra el SARS-CoV-2 es efectiva en pacientes con IDCV, 17 pacientes recibieron las vacunas de ARNm (11 recibieron BNT162b2 y 6 ARNm-1273) y un paciente recibió la vacuna de vector viral ChAdOx1 (Tabla 4). No se registraron eventos adversos graves después de la vacunación. Las muestras previas a la vacunación y posteriores a la segunda dosis estaban disponibles en los 18 pacientes. La muestra tras la primera dosis se obtuvo en 14 de los 18 pacientes. En concordancia con la ausencia de contacto con el virus previamente a la inmunización, todos los pacientes estudiados mostraron respuestas inmunitarias humorales y celulares negativas contra el SARS-CoV-2 antes de la vacunación medido como la ausencia de respuesta frente a S1 en la muestra previa a la vacunación.

Después de la primera dosis, el 42 % de los sujetos con IDCV mostraron una producción positiva de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 en comparación con el 84 % de los controles sanos ( $p = 0,005$ ). Después de la segunda dosis, el 83% de los pacientes con IDCV y el 100% de los controles sanos se convirtieron en positivos para IgG anti-S1 ( $p = 0,016$ ). A pesar del aumento en la tasa de respuesta de anticuerpos observada después de la segunda dosis en pacientes con IDCV (42% tras primera vs 83% tras segunda dosis,  $p = 0,027$ ), el porcentaje de pacientes con respuesta positiva para anticuerpos contra el SARS-CoV-2 después de la vacunación completa se mantuvo significativamente más bajo que el de controles sanos (Fig. 21 izquierda). Tres pacientes (P5, P7 y P17) no produjeron anticuerpos específicos después de la vacunación completa.

Para evaluar específicamente la calidad de la respuesta humoral a la vacunación, se analizó la capacidad de neutralización de los sueros positivos para anticuerpos anti-S1. Después de la segunda dosis de vacunación, de entre los 15 pacientes que produjeron anticuerpos anti-S1, nueve mostraron capacidad de neutralización. Tres pacientes con anticuerpos anti-S1 positivos no neutralizantes después de la primera dosis (P2, P12 y P13), desarrollaron capacidad neutralizante después de la segunda dosis. Seis pacientes con anticuerpos anti-S1 (P3, P4, P9, P15, P16 y P18) no pudieron desarrollar anticuerpos neutralizantes después de completar la vacunación. En resumen, la cohorte de 18 pacientes con IDCV incluidos en el estudio vacunal, después de la vacunación completa, el 83% desarrolló anticuerpos anti-S1, mientras que solo se registraron anticuerpos neutralizantes en el 50% de ellos. El porcentaje de pacientes con IDCV que generan anticuerpos neutralizantes es menor que el porcentaje de individuos sanos que los generan de acuerdo a lo descrito en la literatura (203).



**Fig. 21.** Tasa de respuesta inmune en pacientes con IDCV tras la vacunación frente al SARS-CoV-2. a) Tasa de respuesta humoral específica frente a S1. b) Tasa de respuesta celular específica frente a S1. CS: controles sanos; IDCV: inmunodeficiencia común variable. Ns, no significativo; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ .

Para evaluar un posible sesgo de confusión de la terapia sustitutiva con inmunoglobulinas y/o infecciones asintomáticas previas en la medición de anticuerpos anti-S1, analizamos la presencia de anticuerpos anti-N (nucleocápside) en los 15 sueros positivos anti-S1 obtenidos después de la vacunación completa. Entre ellas, sólo una muestra, perteneciente al paciente P6, resultó positiva para anticuerpos anti-N. P6 no refirió síntomas previos de COVID-19 ni resultados positivos de pruebas anti-SARS-CoV-2. Sin embargo, a pesar de ser negativo para anticuerpos anti-S1 en la muestra previa a la vacunación, los anticuerpos anti-N estaban presentes.

En cuanto a la respuesta celular a las vacunas COVID-19, el 50% de los pacientes con IDCV tuvieron respuesta celular positiva después de la primera dosis, y tras la segunda dosis esta tasa aumentó hasta el 83% ( $p = 0,062$ ) (Fig. 21 derecha). La tasa de respuesta celular fue menor en pacientes con IDCV en comparación con los controles sanos, tanto después de la primera dosis (50% vs 88% respectivamente,  $p = 0,005$ ) como después de la vacunación completa (83% vs 98% respectivamente,  $p = 0,054$ ). Tres pacientes (P4, P7 y P13) no lograron desarrollar una respuesta inmune celular específica después de la vacunación completa.

La mayoría de los pacientes (P13/18, 72%) desarrollaron una respuesta humoral y celular frente al virus. Hubo dos pacientes con respuesta celular pero no humoral (P5 y P17), dos pacientes con solo respuesta humoral (P4 y P13) y un único paciente sin respuesta ni humoral no celular (P7).

Los pacientes que carecían exclusivamente de respuesta humoral (P5 y P17) tenían un recuento bajo de linfocitos B CD19+ (< 100 células/ $\mu$ l) después de iniciar rituximab en 2019 y 2018, respectivamente. P5 recibió rituximab como parte del tratamiento de un linfoma asociado a la mucosa gástrica desarrollado cinco años después del diagnóstico de IDCV y debido a la presencia de una enfermedad pulmonar intersticial linfocítica granulomatosa. P17 recibió rituximab debido a un cuadro de artritis reumatoide superpuesto con otro cuadro de lupus eritematoso sistémico que apareció dos años después del diagnóstico de IDCV. Tanto P5 como P17 compartían algunas características clínicas como infecciones del tracto respiratorio y autoinmunidad.

Los dos pacientes con anticuerpos positivos, pero sin respuesta celular a las vacunas (P4 y P13), tenían antecedentes oncológicos previos. P4 presentó hipogammaglobulinemia (IgG e IgA) con infecciones del tracto respiratorio y bronquiectasias desde los 10 años. En 2017, a los 19 años, desarrolló un linfoma de Hodgkin (estadio IVB), el cual fue tratado con bleomicina, etopósido, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, procarbazona y prednisona con remisión completa. El recuento de linfocitos ha sido normal durante los últimos cuatro años excepto por una leve linfopenia de Linfocitos B (60 células/ $\mu$ l). P13 fue diagnosticada de IDCV y síndrome antifosfolípido en 2017 junto con un microcarcinoma papilar de tiroides, el cual se extirpó dos años después. En el momento de la vacunación estaba siendo tratada con corticoides.

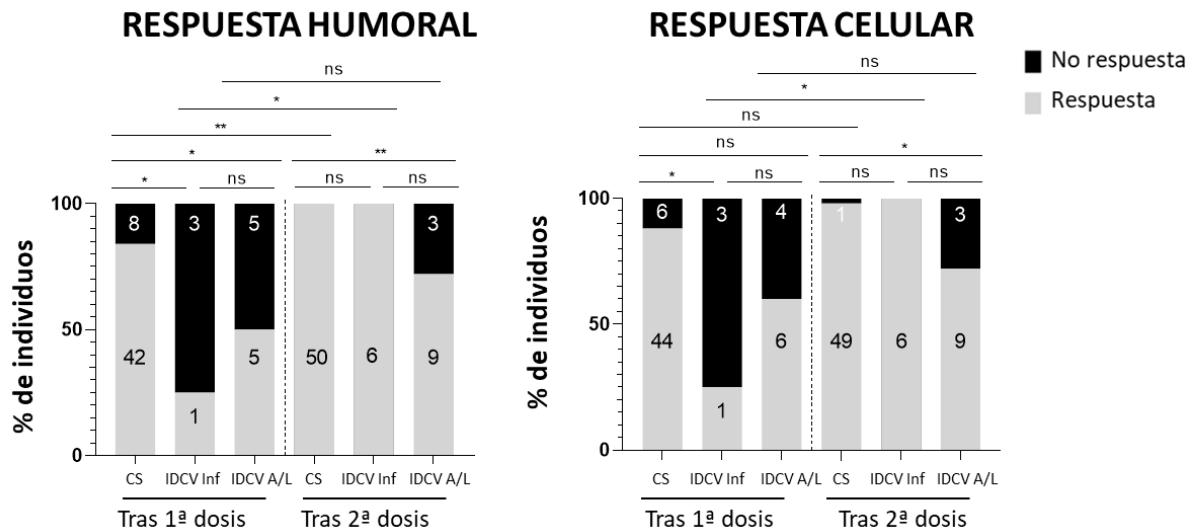
P7 fue la única paciente que no logró producir respuestas humorales ni celulares tras recibir las dos dosis vacunales. Era una mujer de 59 años con diabetes mellitus tipo 2 como único antecedente relevante cuyo diagnóstico de IDCV se produjo tras detectar una hipogammaglobulinemia moderada (IgG 379 mg/dl, IgA 56 mg/dl, IgM 9 mg/dl). Esta paciente careció de respuesta de anticuerpos específica después de la vacunación con toxoide tetánico y *Salmonella typhi* y no respondió a CMV-Quantiferon a pesar de tener una serología positiva. Presentó deterioro celular (linfopenia CD4 de 122 células/ $\mu$ l) y manifestaciones inflamatorias (hepatoesplenomegalia y linfocitos B CD21<sup>low</sup> elevados), por lo que había estado bajo terapia sustitutiva con inmunoglobulinas durante tres años hasta el momento del estudio. Esta paciente no había recibido terapia anti-Linfocitos B.

Con respecto a la edad, el sexo, las comorbilidades o la vacuna administrada no se encontraron diferencias en la respuesta a la vacunación. La terapia sustitutiva no afectó a la respuesta frente a la vacunación, al menos según el esquema propuesto para este ensayo de nuestros pacientes con IDCV, ni tampoco la vía de administración de inmunoglobulinas (intravenosa o subcutánea).

### **7.3 Respuesta humoral y celular de los distintos subgrupos clínicos de pacientes con IDCV a la vacunación frente a SARS-CoV-2**

Se clasificó a los pacientes según su perfil clínico, es decir, según si presentaban infecciones exclusivamente o si entre sus síntomas presentaban fenómenos de autoinmunidad o linfoproliferación, siguiendo así la clasificación propuesta por Cunningham-Rundles (88). Se contaba con 6 pacientes con sólo infecciones y 12 con otros fenómenos. Se procedió a analizar la respuesta a la vacunación en ambos perfiles. Los pacientes con enfermedades infecciosas tuvieron tanto una tasa de producción de anticuerpos más baja que los controles sanos después de la primera dosis (25% vs 84%,  $p = 0,024$ ) como una tasa de respuesta celular más baja (25% vs 88%,  $p = 0,012$ ) (Fig. 22 izda. y dcha. respectivamente). Sin embargo, los seis pacientes de este subgrupo aumentaron la producción de anticuerpos y células T específicos del SARS-CoV-2 después de la segunda dosis, lo que significó que tuvieron una tasa de respuesta similar a los controles sanos después de la vacunación completa (100 % frente a 100 %,  $p = 1$ , para anticuerpos; y 100% vs 98%,  $p = 1$ , para respuesta celular).

Este resultado fue distinto en el subgrupo de pacientes con IDCV con manifestaciones autoinmunes/linfoproliferativas. En este grupo, las tasas de respuesta humoral y celular fueron menores que en controles sanos después de la primera dosis (50% vs 84%,  $p = 0,031$ , y 60% vs 88%,  $p = 0,052$ , respectivamente) (Fig. 22 a) y b)). Esta disminución de la tasa de respuesta también se observó después de la segunda dosis, tanto a nivel de producción anticuerpos (75% vs 100%,  $p = 0,006$ ) como a nivel celular (75% vs 98%,  $p = 0,021$ ). La administración de la segunda dosis de vacuna aumentó significativamente la tasa de respuesta humoral y celular en pacientes con enfermedades infecciosas ( $p = 0,033$  y  $p = 0,033$ , respectivamente); y aunque también tuvo un efecto progresivo en la tasa de pacientes con manifestaciones autoinmunes/linfoproliferativas respondedores, la diferencia con respecto a la respuesta tras la primera dosis no alcanzó la significación ( $p = 0,372$  y  $p = 0,651$  para respuestas humoral y celular respectivamente).



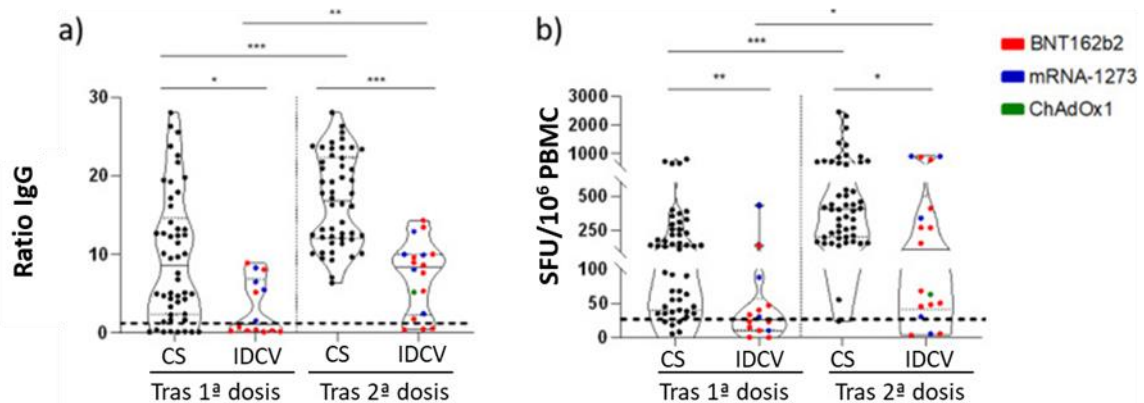
**Fig. 22.** Tasa de respuesta inmune en pacientes con IDCV por subtipos tras la vacunación frente al SARS-CoV-2. a) Tasa de respuesta humoral específica frente a S1 en subgrupos clínicos de IDCV; b) Tasa de respuesta celular específica frente a S1 en subgrupos clínicos de IDCV. CS: controles sanos; IDCV Inf: IDCV con sólo infecciones; IDCV A/L: IDCV con autoinmunidad/linfoproliferación. Ns, no significativo; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ .

#### **7.4 Magnitud de la respuesta inmunológica a la vacunación**

La potencia de las respuestas humorales y celulares fue significativamente menor en los pacientes con IDCV en comparación con los controles sanos. La administración de la segunda dosis incrementó significativamente la magnitud de la respuesta humoral en IDCV ( $p = 0,002$ ); sin embargo, estos niveles de anticuerpos fueron considerablemente más bajos que en controles sanos, tanto después de la primera dosis (ratio de 1,2 frente a 8,6 respectivamente,  $p = 0,014$ ) como después de la segunda dosis (mediana de 8,4 en pacientes frente a 18,3 en controles,  $p = 0,0001$ ) (Fig. 23 a). De manera similar, la segunda dosis de vacuna aumentó la magnitud de la respuesta celular en IDCV, pasando de una mediana de 27 SFU/ $10^6$  PBMC tras la primera dosis a 113 SFU/ $10^6$  PBMC tras la segunda dosis ( $p = 0,018$ ). De nuevo, los niveles de células T específicas fueron más bajos que en controles sanos, tanto después de la primera dosis (mediana de 27 vs 136 SFU/ $10^6$  PBMC respectivamente,  $p = 0,001$ ) como después de la segunda dosis (mediana de 113 vs 408 SFU/ $10^6$  PBMC respectivamente,  $p = 0,010$ ) (Fig. 23 b).

## RESPUESTA HUMORAL

## RESPUESTA CELULAR

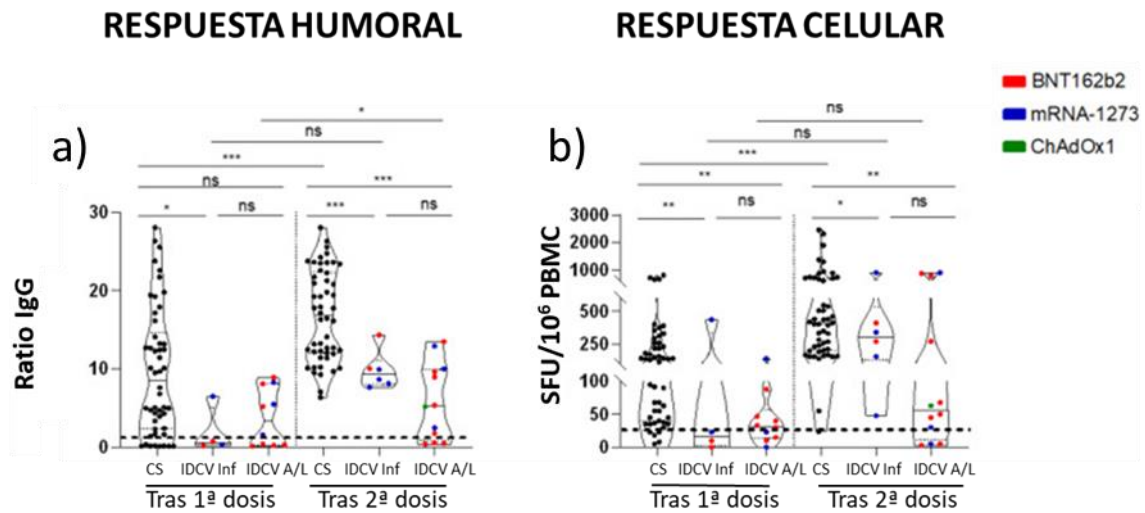


**Fig. 23.** Potencia de la respuesta inmune en pacientes con IDCV tras la vacunación frente al SARS-CoV-2. Ratio= Cociente de las DO de la muestra vs las del calibrador. a) Anticuerpos anti-S1; b) Linfocitos T anti-S1 productores de IFN-γ. Las líneas punteadas representan el límite de positividad: Ratio  $\geq 1,1$  de DO para anticuerpos anti-S1 y  $> 25$  SFU/10<sup>6</sup> PBMC para los SFU de linfocitos T productores de IFN-γ específicas de S1. CS: controles sanos; IDCV: inmunodeficiencia común variable. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001.

El análisis de la potencia de la respuesta a la vacunación por subgrupos de pacientes con IDCV mostró un aumento en los niveles de anticuerpos después de la segunda dosis tanto en pacientes que sólo tenían infecciones (de 0,5 a 9,3; p = 0,125), como en los pacientes con manifestaciones autoinmunes/linfoproliferativas (de 3,4 a 5,3; p = 0,018) (Fig.24 a). Sin embargo, la respuesta de anticuerpos en ambos subgrupos de pacientes fue significativamente más débil que en controles sanos después de las dos dosis de vacunación (16,8 de los controles vs 9,1 de los pacientes con infecciones y 5,3 de los pacientes con manifestaciones autoinmunes/linfoproliferativas, p = 0,0001 y p = 0,0001). Tras la segunda dosis de vacunación no había significancia estadística en la magnitud de la respuesta humoral entre el subgrupo de IDCV de pacientes con sólo enfermedades infecciosas cuando se comparaban con los pacientes con manifestaciones autoinmunes/linfoproliferativas (9,3 vs 5,3 respectivamente, p = 0,151).

El análisis de la respuesta celular mostró un aumento de células T específicas después de la segunda dosis, en pacientes con enfermedades infecciosas (de una mediana de 17 tras primera dosis a 306 SFU/10<sup>6</sup> PBMC tras segunda, p = 0,125) y en pacientes con enfermedades autoinmunes/linfoproliferativas (se pasó de una mediana de 32 a 57 SFU/10<sup>6</sup> PBMC, p = 0,084) (Fig. 24b). Tras recibir las dos dosis de vacunación, la magnitud de la respuesta celular tanto en el subgrupo de pacientes con enfermedades infecciosas únicamente como en pacientes con enfermedades autoinmunes/linfoproliferativas fue significativamente más débil que en

controles sanos ( $p = 0,046$  y  $p = 0,008$  respectivamente). La magnitud de la respuesta celular fue superior tras la segunda dosis de vacunación en pacientes con infecciones vs pacientes con manifestaciones autoinmunes/linfoproliferativas, aunque las diferencias no alcanzaron la significación (306 vs 57 SFU/ $10^6$  PBMC, respectivamente,  $p = 0,157$ ).



**Fig. 24.** Potencia de la respuesta inmune en pacientes con IDCV según el subgrupo clínico tras la vacunación frente al SARS-CoV-2. a) anticuerpos anti-S1 según los subgrupos de IDCV; b) Linfocitos T anti-S1 productores de IFN- $\gamma$  según los subgrupos de IDCV. Las líneas punteadas representan el límite de positividad: Ratio  $\geq 1,1$  de DO para anticuerpos anti-S1 y  $> 25$  SFU/ $10^6$  PBMC para los SFU de linfocitos T productores de IFN- $\gamma$  específicas de S1. CS: controles sanos; IDCV Inf: IDCV con sólo infecciones; IDCV A/L: IDCV con autoinmunidad/linfoproliferación. Ns: no significativo; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

## **7.5 Seguimiento de los pacientes tras vacunación**

Todos los pacientes con IDCV que se estudiaron tras recibir las dos dosis de vacunación se han continuado evaluando durante dos años y medio. Varios han presentado cuadros compatibles con COVID-19 leve (P1, P4, P9, P11, P13, P15, P16 y P17), pero solo han presentado confirmación de la infección por SARS-CoV-2 mediante test de antígenos o PCR los pacientes P1, P4, P9, P13, P16 y P17. Los pacientes P11 y P15 desarrollaron un cuadro compatible con COVID-19 pero no tuvieron confirmación de la enfermedad. El manejo de estos pacientes consistió principalmente en aislamiento domiciliario.

P9 (el cual produjo anticuerpos anti-S1 y respuesta celular tras la vacunación, pero no capacidad de neutralización) experimentó síntomas relacionados con la COVID-19 seis días después de una posible exposición y 68 días después de completar el esquema de vacunación. El cuadro consistió en mialgias intensas y debilidad, sin fiebre ni disnea. Fue evaluado en urgencias, presentando un

95% de saturación basal de oxígeno con frecuencia respiratoria y cardíaca adecuadas. La RT-PCR fue positiva para SARS-CoV-2 en una muestra de mucosa nasal obtenida mediante un hisopo y se recomendó diez días de cuarentena en casa, sin tratamiento. Los síntomas duraron cinco días e incluyeron tos, ageusia y anosmia. A pesar de sus antecedentes de obesidad, tabaquismo e hipertrigliceridemia, el cuadro no se complicó y la COVID-19 no produjo secuelas.

P7 también padeció COVID-19 después de la vacunación, pero su curso clínico fue diferente. Esta paciente hasta la fecha había presentado infecciones de repetición, sobre todo de tejidos blandos, y hepato-esplenomegalia (longitud máxima del diámetro esplénico de 16,5 cm). En el estudio vacunal fue la única paciente que no desarrolló ningún tipo de respuesta, humoral o celular, tras completar las dos dosis de vacunación. Cinco meses después de la segunda dosis de vacunación comenzó un cuadro de tos seca, odinofagia, congestión nasal, artromialgias, disnea de esfuerzo, dolor torácico y fiebre (máximo de 38,9°C). En la radiografía se detectó una neumonía inicialmente unilateral derecha con patrón en vidrio deslustrado que pasaría a ser bilateral a los cinco días. La PCR confirmó que el agente patógeno era el SARS-CoV-2. Ingresó en planta, donde recibió ventilación de soporte, corticoterapia y profilaxis antibiótica. Se dio de alta tras 22 días de ingreso sin secuelas posteriores.

El resto de pacientes no presentó ningún test con positividad frente a SARS-CoV-2 ni clínica infecciosa compatible.

P20 presentó en 2022 un incremento de su esplenomegalia (llegó a presentar un bazo de 25cm de diámetro). Debido a esto, recibió una dosis de rituximab y ciclos ocasionales de corticoides (los cuales se interrumpieron, respectivamente, a los ocho y cuatro meses de este estudio) para terminar sometándose a una resección esplénica, posterior a la realización de todos los estudios recogidos en el presente trabajo. Por último, P15 padeció un adenocarcinoma pulmonar a inicios de 2022 que requirió de cirugía y quimioterapia.

## **7.6 Respuesta humoral y celular de los pacientes con IDCV tras la vacunación de recuerdo**

La “Estrategia de vigilancia y control frente a COVID-19 tras la fase aguda de la pandemia” del Ministerio de Sanidad(204) propuso que las poblaciones vulnerables, entre las que se encontraban los pacientes con inmunodeficiencias, debían seguir una pauta vacunal concreta. Durante el otoño de 2021, los pacientes con IDCV recibieron su tercera dosis de la vacuna. Durante la primavera de 2022 (aproximadamente siete meses después), dicha estrategia planteó añadir una cuarta dosis vacunal. Para analizar qué respuesta mantenían estos pacientes tras

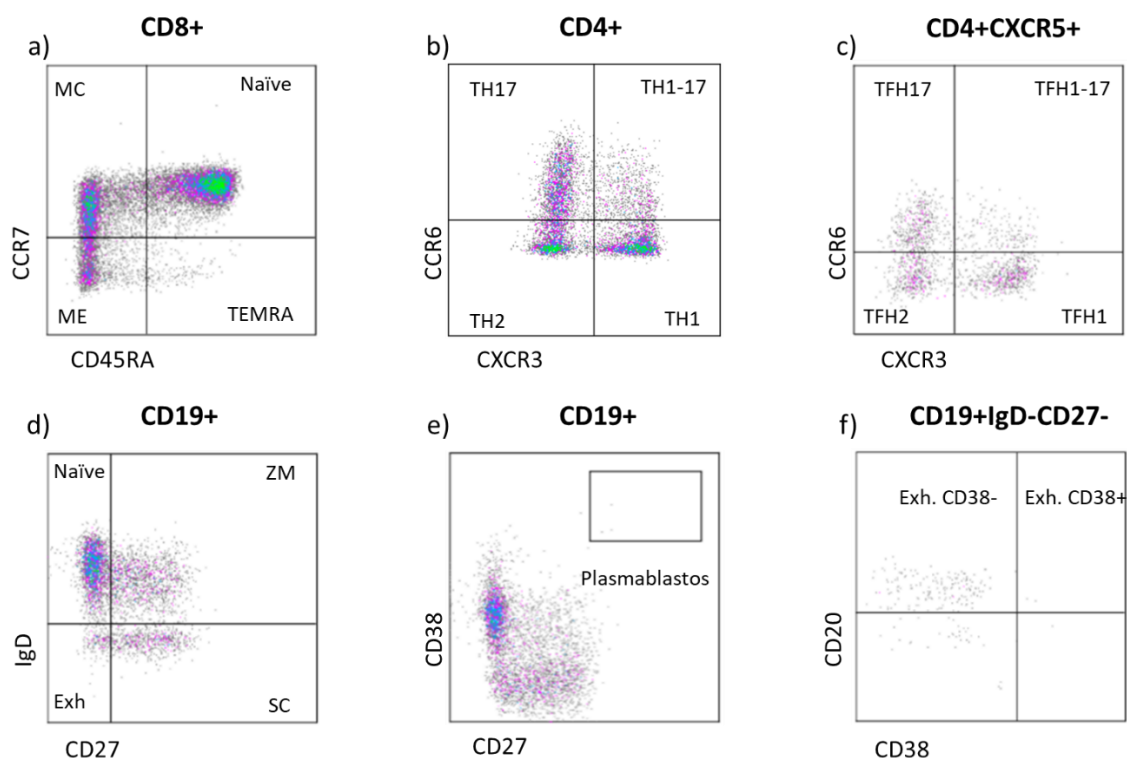
haber recibido tres dosis de la vacuna y antes de recibir la cuarta, se analizaron sus anticuerpos de forma semicuantitativa según se recoge en el apartado 6.4. Esta determinación fue realizada entre uno y ocho días antes de la cuarta dosis de vacunación. La determinación serológica mostró que todos los pacientes habían desarrollado anticuerpos anti-S del SARS-CoV-2 tras haber recibido tres dosis de la vacuna.

La determinación de fluorospot se repitió aproximadamente diez meses después de la 4ª dosis en 20 pacientes reclutados en esta ocasión con el objetivo de valorar la respuesta celular en este momento. Todos los pacientes mostraron una respuesta celular adecuada frente al SARS-CoV-2 con la excepción de P7. Además, pudimos encontrar que la respuesta celular media en la cohorte IDCV fue menor que en controles sanos, si bien, esto no resultó estadísticamente significativo (datos no mostrados).

## **7.7 Caracterización del fenotipo y función de linfocitos B**

### **7.7.1 Fenotipo linfocitario**

La citometría de flujo detectó cambios significativos tanto entre pacientes y controles como entre las citometrías precultivo y postcultivo. Se detectaron cambios significativos en los compartimentos T CD8+ de memoria, los compartimentos TH, los compartimentos TFH, los compartimentos B de memoria y en los porcentajes de plasmablastos. Además, dados los cambios significativos en el compartimento B de memoria, se analizó la expresión de CD20 y CD38 en la población IgD-CD27-. La figura 25 representa la identificación de estos compartimentos celulares en la citometría de flujo.



**Fig. 25.** Esquema de las poblaciones de interés. a) Compartimentos de memoria de los LT CD8+; b) Compartimentos TH de los LT CD4+; c) Compartimentos TFH de los linfocitos T CD4+; d) Compartimentos de memoria de los LB; e) Proporción de plasmablastos de los LB; f) Compartimentos de los LB IgD-CD27-. Exh: Exhaustas; MC: Memoria Central; ME: Memoria Efectora; SC: Switch Class o Cambio de Clase; TEMRA: células T terminalmente diferenciadas con expresión de CD45RA+; ZM: Zona Marginal.

#### 7.7.1.1 Poblaciones celulares T

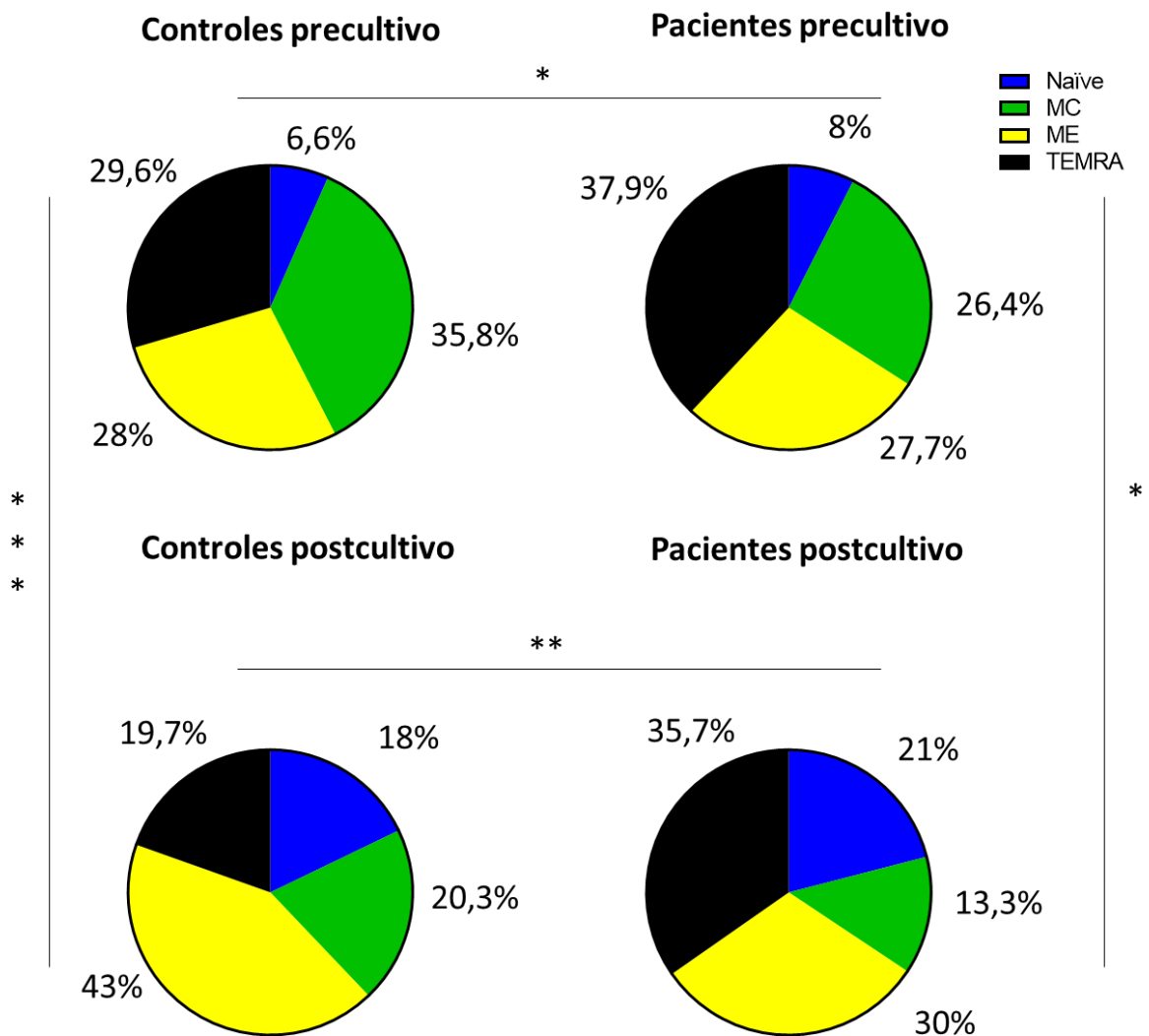
A nivel precultivo se compararon las poblaciones T de los controles sanos frente a la de los pacientes. Se halló que los compartimentos de los linfocitos T CD8+ de memoria presentaban una distribución similar con la excepción del compartimento de memoria central, que estaba ligeramente disminuido en los pacientes (35,8% vs 26,4%,  $p < 0,031$ ).

Después del cultivo y con respecto a lo observado en el precultivo, los controles sanos mostraron una expansión de todas las líneas estudiadas. Los cambios significativos en la distribución fueron un aumento del porcentaje de compartimentos CD8+ naïve (CD45RA+CCR7+; 6,6% vs 18%,  $p < 0,001$ ) y de memoria efectora (CD45RA-CCR7-; 28% vs 43%,  $p < 0,001$ ) a costa de la disminución proporcional de los compartimentos memoria central (CD45RA+CCR7-, 35,8% vs 20,3%,  $p < 0,001$ ) y TEMRA (CD45RA+CCR7-; 29,6% vs 19,7%,  $p < 0,002$ ).

En los pacientes se observó una expansión de los grupos celulares mencionados de forma similar a la de los controles sanos, pero tras el cultivo, en los pacientes se detectó mucha mayor tasa de

muerte celular. El único cambio significativo fue la disminución de T CD8+ de memoria central (26,4% en el precultivo vs 13,3% en el postcultivo,  $p < 0,02$ ) a costa de una elevación de CD8+ naïve que no llega a ser significativa.

En el postcultivo, con respecto a controles sanos, los pacientes presentaban un menor porcentaje de los compartimentos CD8+ memoria central (20,3% vs 13,3%,  $p < 0,005$ ) y memoria efectora (43% vs 30%,  $p < 0,003$ ) con un mayor porcentaje de TEMRA (19,7% vs 35,7%,  $p < 0,002$ ) (Fig. 26).



**Fig. 26.** Población CD8+. Se comparan valores correspondientes a las proporciones de subgrupos celulares dentro de la población global de LT CD8+, expresados por el valor de su mediana. MC: Memoria central; ME: Memoria efectora. TEMRA: células T terminalmente diferenciadas con expresión de CD45RA. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$

Respecto a los linfocitos T CD4, en el precultivo no existían diferencias significativas en los compartimentos TH entre controles sanos y pacientes.

En los controles sanos, cuando se compara el precultivo con el postcultivo, se detecta un incremento del compartimento TH2 (CCR6-CXCR3-; 33,2 vs 64,1%,  $p<0,001$ ) con un descenso del compartimento TH1 (CCR6-CXCR3+; 32,4% vs 23,9%;  $p<0,036$ ) y del compartimento TH17 (CCR6+CXCR3-; 29,2% vs 6,7%;  $p<0,001$ ).

En los pacientes se pudo apreciar un comportamiento similar, con un incremento significativo del compartimento TH2 (30,4% vs 58,3%,  $p<0,001$ ) acompañado de un descenso de TH17 (26% vs 3,9%,  $p<0,001$ ) pero con ausencia de cambios en el compartimento TH1 (27,1% vs 27,6%, ns).

A nivel postcultivo tampoco se apreciaron diferencias en dichos compartimentos entre controles sanos y pacientes (Fig. 27).

La distribución de los linfocitos cTFH (CD4+CXCR5+) mostró el mismo comportamiento que la de los TH (datos no mostrados).

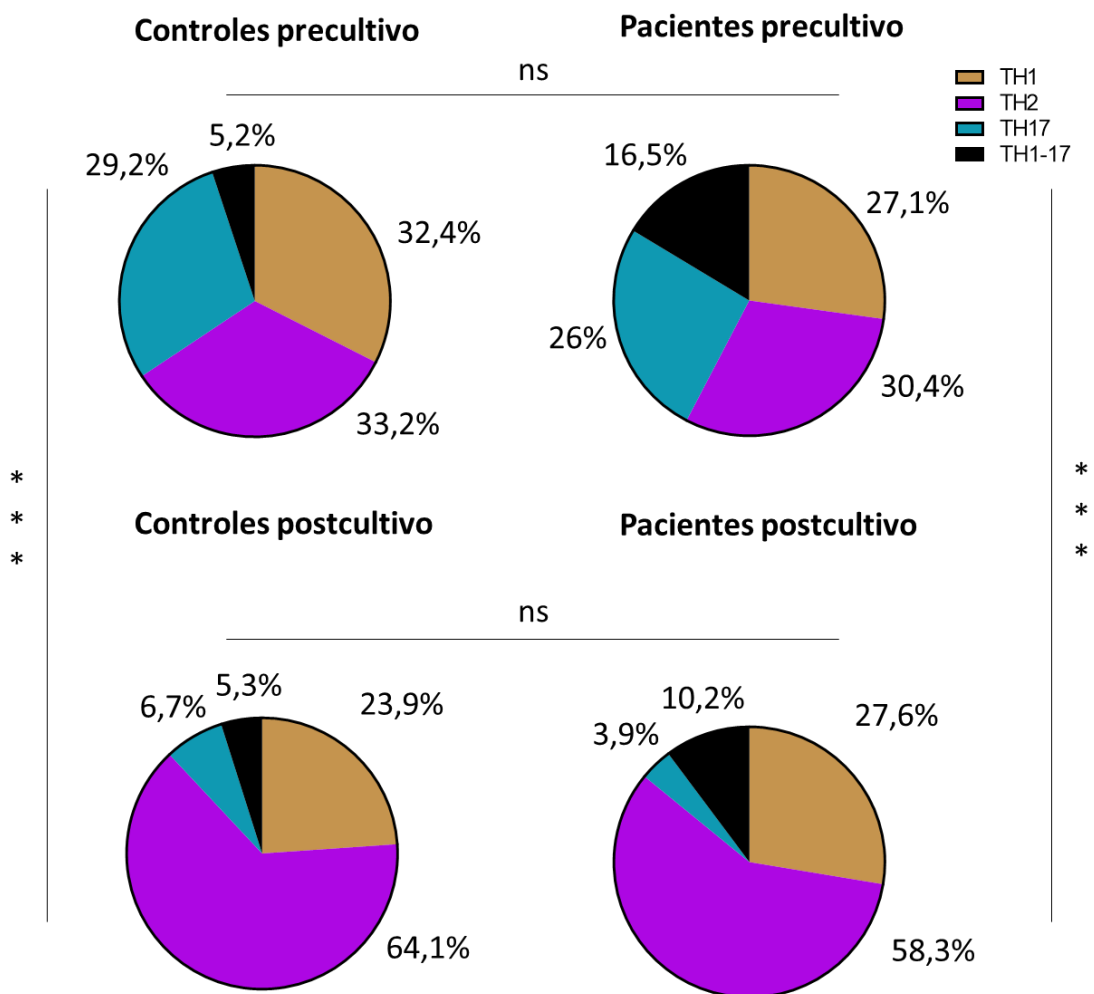


Fig. 27. Compartimentos TH. \*\*\*= $p<0,001$

La población de linfocitos NK no cambió significativamente con la estimulación, ni en los controles ni en los pacientes.

#### 7.7.1.2 Poblaciones celulares B

Con respecto a la población B, a nivel precultivo los pacientes presentaban una disminución significativa de LB zona marginal (IgD+CD27+; 10% vs 3,2%;  $p<0,001$ ) y un aumento de LB naïve con respecto a los controles sanos (IgD+CD27-; 72,8% vs 87,3%,  $p<0,001$ ).

Una vez realizado el cultivo, las poblaciones B se expandieron tanto en controles como en pacientes. En los controles hubo una disminución del porcentaje de LB naïve (72,8% vs 18,6%,  $p<0,001$ ) con un incremento de los porcentajes de LB cambio de clase (12% vs 45,8%,  $p<0,001$ ) y del compartimento IgD-CD27- (5,2% vs 26,3%).

En el caso de los pacientes, tras el cultivo los LB naïve también disminuyeron (87,3% vs 23,9%,  $p<0,001$ ) e incrementaron los LB cambio de clase (7% vs 16%,  $p<0,001$ ) y el compartimento IgD-CD27- (2,5% vs 58,4%,  $p<0,001$ ).

Adicionalmente, al comparar las poblaciones de LB entre controles y pacientes tras el cultivo, se observó una disminución significativa del compartimento LB zona marginal con respecto a los controles sanos (IgD+CD27+; 9,3% vs 1,7%,  $p<0,001$ ) y del compartimento cambio de clase (45,8% vs 16%,  $p<0,001$ ), así como un aumento del compartimento IgD-CD27- (26,3% vs 58,4%;  $p<0,001$ ) (Fig. 28).

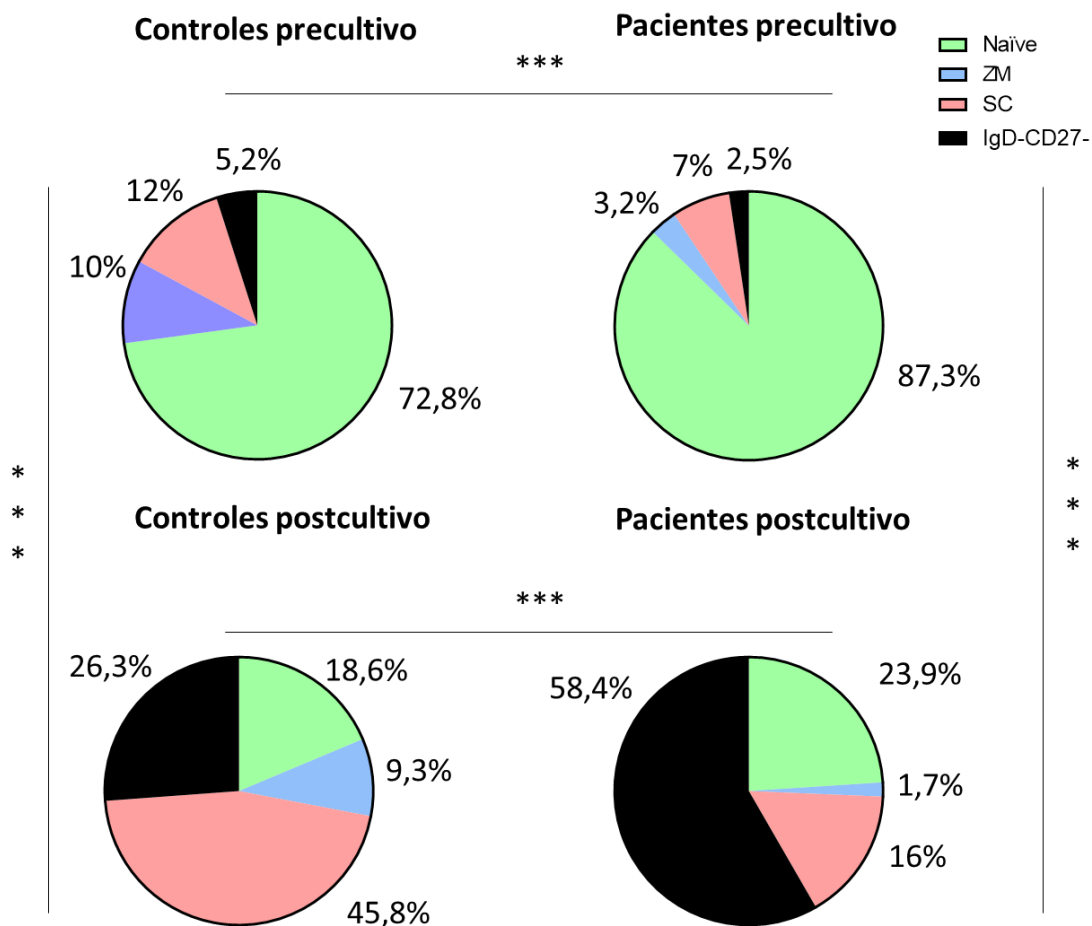


Fig. 28. Compartimentos B de memoria. ZM: Zona Marginal; SC: Cambio de clase. \*\*\*= $p < 0,001$

Sin embargo, en los pacientes se encontraron dos situaciones:

- En un grupo mayoritario (17 pacientes) que denominaremos G1, con respecto a los resultados precultivo, la proporción de B naïve disminuyó de manera proporcional al aumento de IgD-CD27-. Los compartimentos de zona marginal y cambio de clase eran similares. Presentaba, por lo tanto, diferencias significativas con las poblaciones postcultivo de los controles sanos a nivel de zona marginal (disminuido en los pacientes,  $p < 0,001$ ), cambio de clase (disminuido en los pacientes,  $p < 0,001$ ) y de IgD-CD27- (aumentado en los pacientes,  $p < 0,001$ ). No se observan en este grupo plasmablastos.
- En un grupo minoritario (3 pacientes), que denominaremos G2 la distribución de Linfocitos B fue similar a la distribución de controles sanos, sin diferencias significativas con este grupo.

Los plasmablastos (CD27+CD38++) tanto en los controles como en el grupo minoritario de pacientes aumentaron tras el cultivo de manera análoga a lo referido en la literatura. Sin

embargo, se pudo apreciar cómo en los pacientes del grupo mayoritario no había diferencias en la generación de plasmablastos con respecto a la citometría precultivo, siendo, por lo tanto, significativamente menor que la de los controles sanos (20,8% vs 2,1%,  $p < 0,001$ ) y del grupo minoritario (Fig. 29).

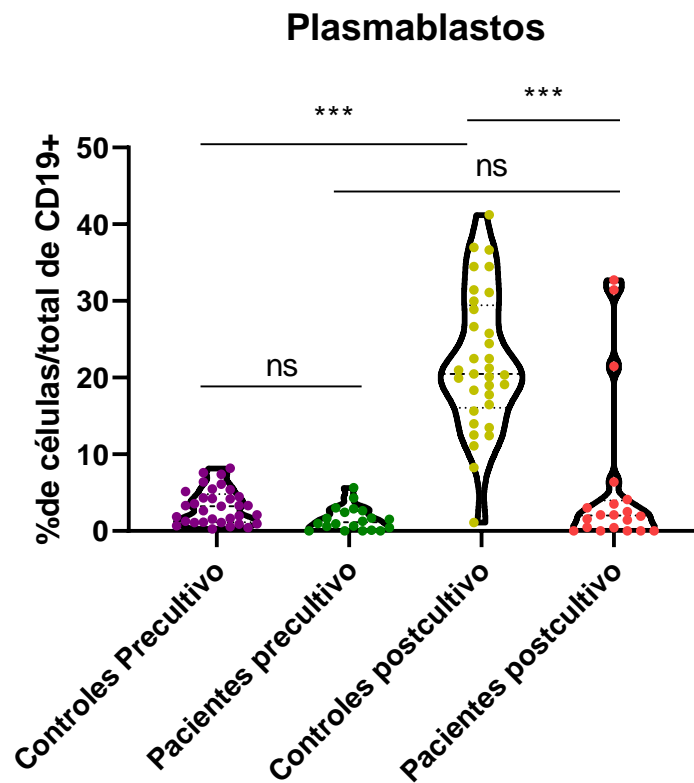
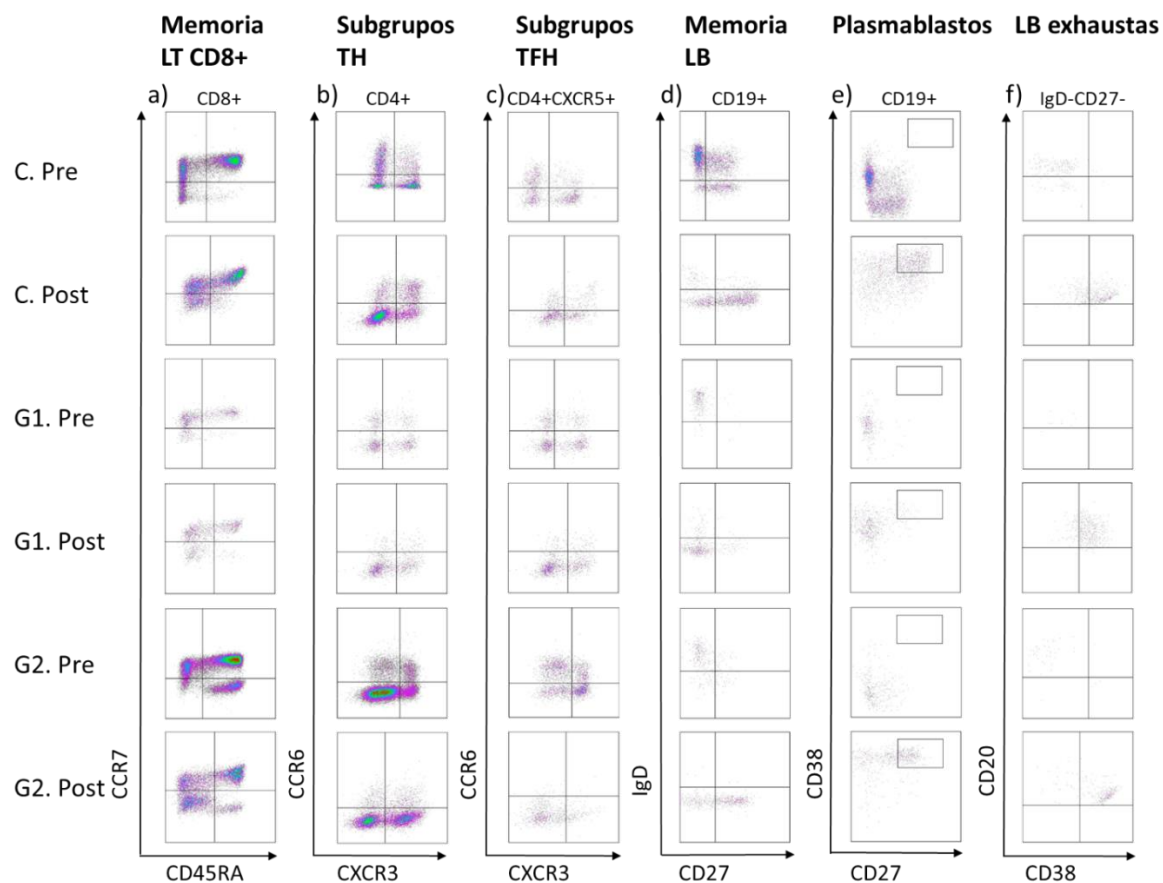


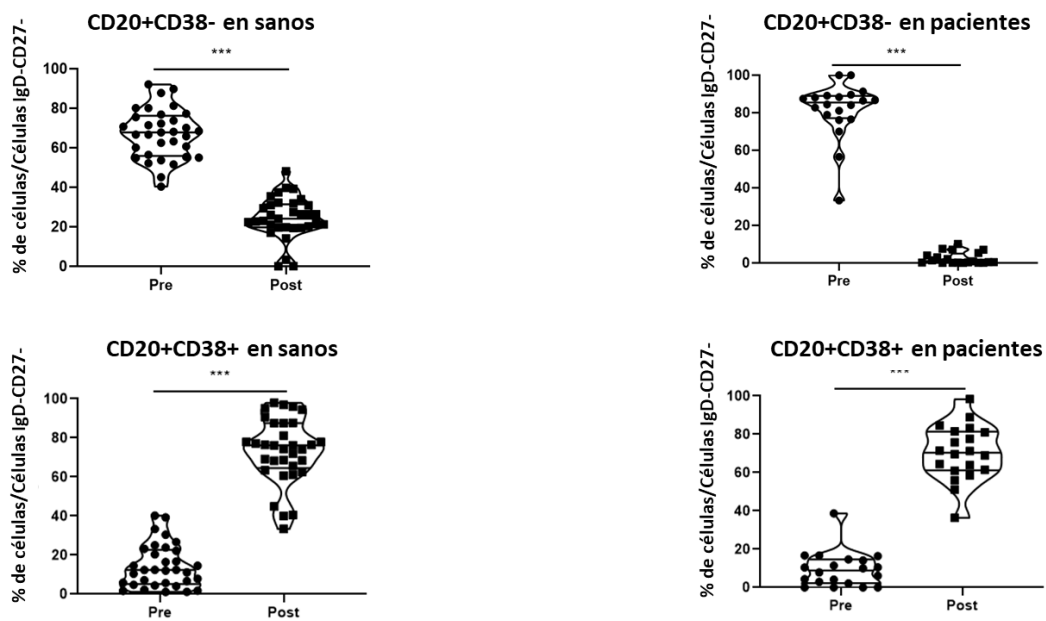
Fig. 29. Análisis citométrico de los plasmablastos. ns: no significativo; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

En resumen, tras el cultivo se modificaron varios compartimentos celulares y, atendiendo al perfil de los linfocitos B de memoria y generación de plasmablastos, se pudo clasificar a los pacientes dentro de dos grupos (Fig. 30).



**Fig. 30.** Ejemplo representativo de las poblaciones celulares relevantes en cada grupo descrito. a) Compartimentos de memoria de los LT CD8+; b) Compartimentos TH; c) Compartimentos cTFH; d) Compartimentos de memoria de los LB; e) Identificación de los plasmablastos; f) Expresión de CD20 y CD38 en la población B IgD-CD27-. C: Control; G1: Paciente del grupo 1; G2: Paciente del grupo 2; Pre: precultivo; Post: Postcultivo.

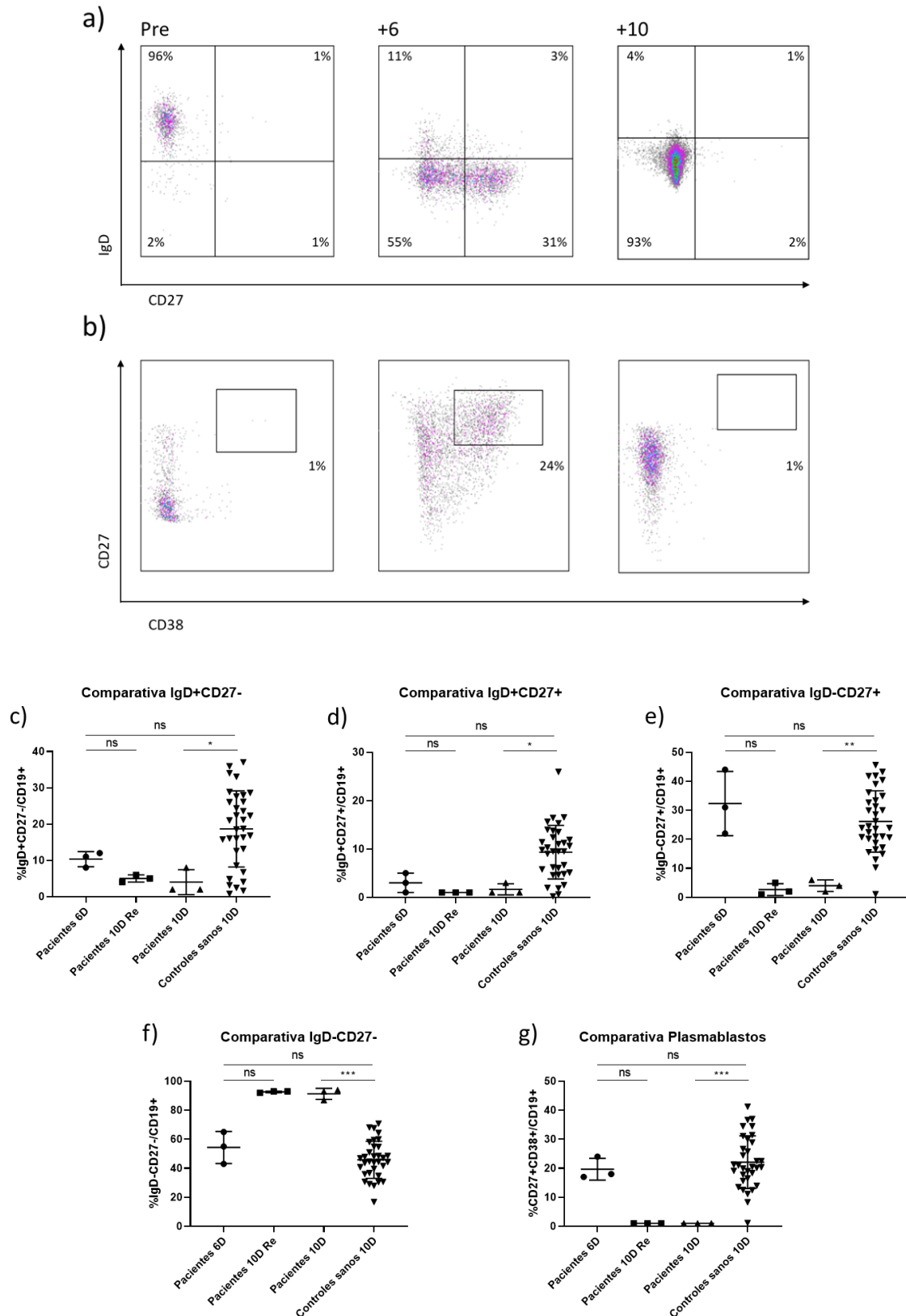
Además de los resultados del compartimento B de memoria, se exploró más a fondo el compartimento IgD-CD27-. En el momento precultivo, tanto en controles como en todos los pacientes, mostraron un fenotipo predominante CD20+CD38-, pero en el momento postcultivo el fenotipo predominante fue CD20+CD38+ (Fig. 31).



**Fig. 31.** Análisis citométrico de la población CD19+IgD-CD27-. CS: Control sano; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

### 7.7.1.3 Fenotipo tras seis días de cultivo

P1, P12 y P21 fueron reclutados nuevamente en 3-4 semanas después para comprobar si los resultados obtenidos eran consistentes. Además, se analizaron pocillos aleatorios el día seis de cultivo. Los resultados al final del cultivo fueron similares a su determinación anterior, pero al sexto día todos tenían Linfocitos B IgD-CD27+ y plasmablastos en proporción similar al compararlos con un control sano (los plasmablastos llegaron a alcanzar el 34% del compartimento B a día seis para ser en todos los casos menores del 5% a los diez días) (Fig. 32).



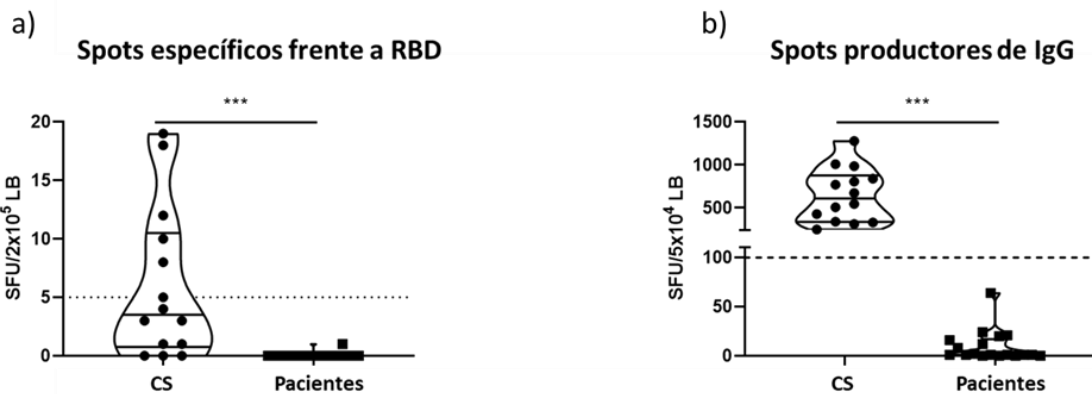
**Fig. 32.** Evolución de las poblaciones de LB. a) Visualización de los compartimentos de memoria en un paciente del grupo mayoritario (G1); b) Identificación de plasmablastos en un paciente (G1); c) Comparación de la población IgD+CD27- a los 6 días de cultivo en un paciente (G1), en ese mismo cultivo a los 10 días, en el cultivo previo a los 10

días y en los controles sanos; d) Comparación de la población IgD+CD27+ a los 6 días de cultivo en un paciente (G1), en ese mismo cultivo a los 10 días, en el cultivo previo a los 10 días y en los controles sanos; e) Comparación de la población IgD-CD27+ a los 6 días de cultivo en un paciente (G1), en ese mismo cultivo a los 10 días, en el cultivo previo a los 10 días y en los controles sanos; f) Comparación de la población IgD-CD27- a los 6 días de cultivo en un paciente (G1), en ese mismo cultivo a los 10 días, en el cultivo previo a los 10 días y en los controles sanos; g) Comparación de la población de plasmablastos a los 6 días de cultivo en un paciente (G1), en ese mismo cultivo a los 10 días, en el cultivo previo a los 10 días y en los controles sanos.

### 7.7.2 Producción de anticuerpos en el cultivo de estimulación

Al finalizar los diez días de cultivo de las PBMCs estimuladas se separaron los Linfocitos B para evaluar su capacidad de producción de anticuerpos específicos de RBD de SARS-CoV-2 por la técnica de Elispot B descrita en el apartado 6.9. Seis de los catorce controles sanos analizados dieron resultados positivos (superaron el punto de corte propuesto por el test comercial) y ocho quedaron por debajo. Ninguno de los pacientes superó el punto de corte (>35,2 BAU/ml).

Se comparó también entre controles y pacientes la producción de IgG total que se analiza en el test Elispot B. Ningún paciente consiguió alcanzar el punto de corte de producción de IgG total, mientras que todos los controles sanos lo superaron con creces. Entre los pacientes se observó que P9 y P14 mostraron más de 50 SFUs/10<sup>4</sup>LB, mientras que el resto no alcanzaban 20 SFUs (Fig. 33).

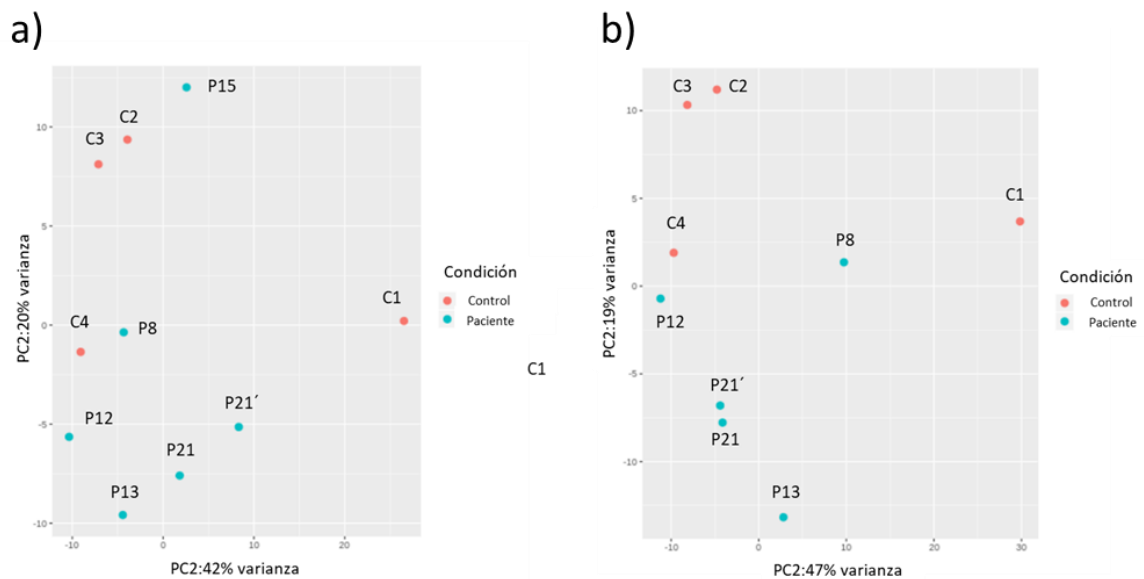


**Fig. 33.** Análisis del Elispot B postcultivo. a) Spots específicos frente a RBD; b) Spots productores de IgG. CS: Control sano; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

También se analizó la presencia de anticuerpos específicos frente a SARS-CoV-2 secretados en el sobrenadante al final de los cultivos. En los cultivos no estimulados, la IgG específica frente a S1 fue indetectable en controles y pacientes. En todos los controles sanos estimulados se detectó



realizados en dos momentos diferentes, se encuentran cercanas, lo que puede considerarse como prueba de control interno de calidad del análisis.

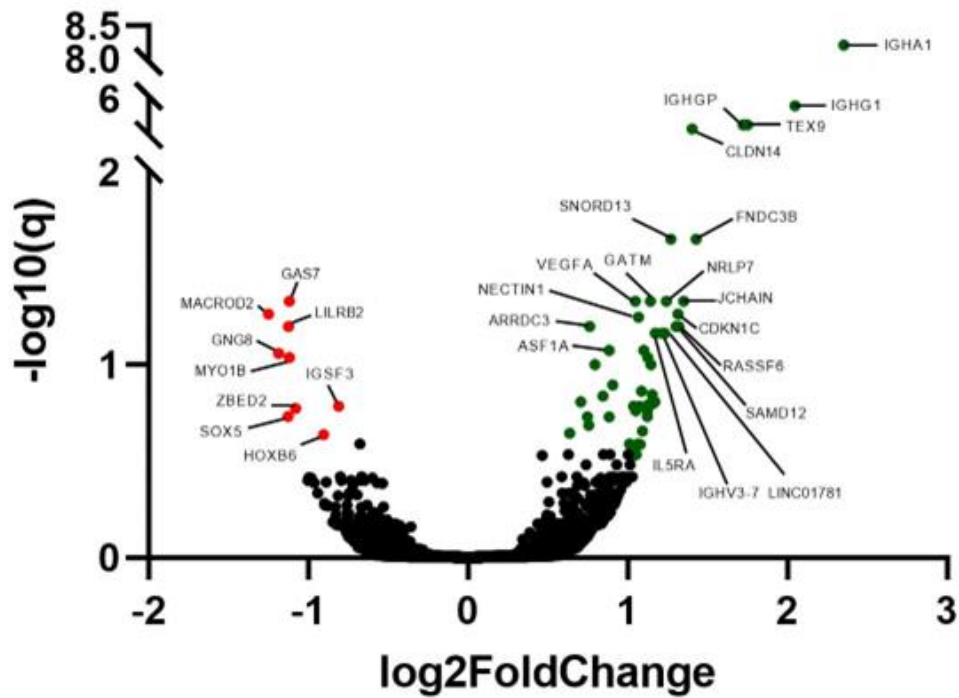


**Fig. 35.** Análisis de correspondencia. a) Análisis incluyendo a P15; b) Análisis excluyendo a P15.

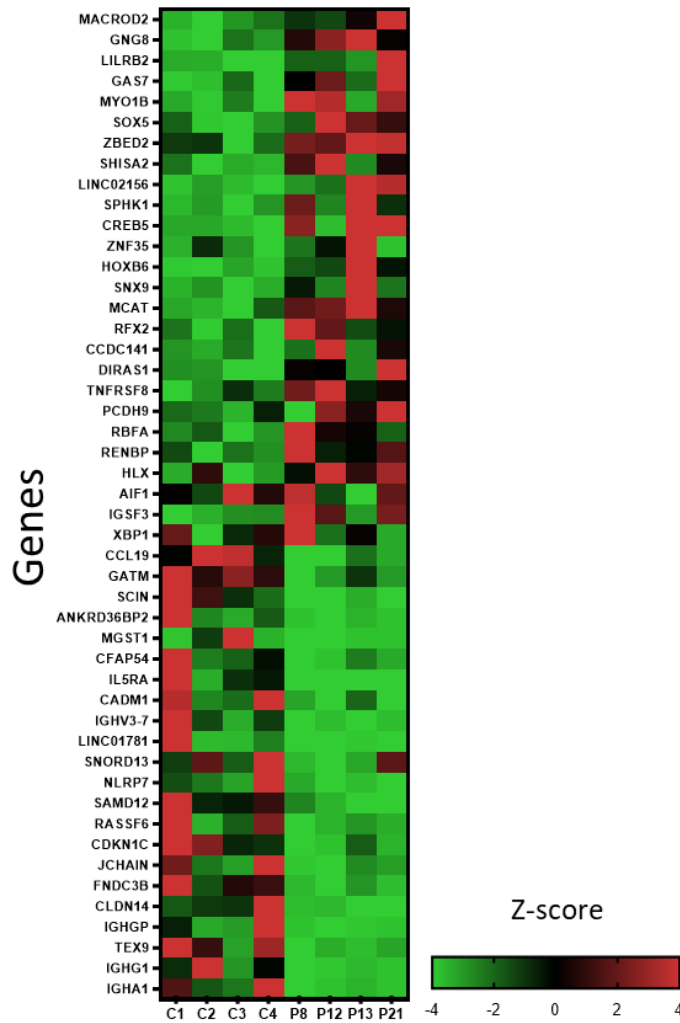
Al comparar los *FoldChange* de todos los transcritos junto con el valor p corregido por el *False Discovery Rate* (FDR), se pudieron detectar aquellos genes con una expresión más diferenciada entre controles y pacientes. Un total de 5134 genes presentaron una expresión diferenciada entre pacientes y controles, siendo determinada esa expresión diferenciada cuando superaba un *FoldChange* superior a 1,2. Además, 756 genes presentaban un valor  $p < 0,05$ , que tras ser ajustados por FDR fueron 53. Se puede observar la distribución de la expresión génica diferenciada en las Fig. 36 y 37.

En controles las moléculas con expresión más aumentada estaban asociadas a la producción de anticuerpos (IGHA1, el gen de la cadena pesada de IgA; IGHG1, el gen de la cadena pesada IgG1; JCHAIN, gen de la cadena de unión de IgA e IgM multiméricas; o IGHV3-7, gen de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas), así como moléculas de adhesión (CLDN14, gen de la claudina 14; FNDC3B, gen del dominio tipo III de la fibronectina; o CADM1, gen de la molécula de adhesión celular 1) y proinflamatorias (NLRP7, o dominio de pirina de la familia NLR 7 o CCL19). En los pacientes se expresaron más moléculas asociadas al procesamiento del ARN (MACROD2 o Mono-ADP Ribosilhidrolasa 2; ZBED2, o proteína que contiene el dominio BED con dedos de zinc 2; y ZNF35 o proteína dedo de zinc 35) e inhibitorias

de la respuesta inmunitaria (LILRB2 o receptor B2 similar a la inmunoglobulina de leucocitos; GAS7 o proteína de arresto específica 7; o SPHK1 o esfingosín quinasa 1).



**Fig 36.** Volcano plot con la distribución de los genes diferencialmente expresados en controles ( $\log_2(\text{FoldChange})$  positivo) vs los genes diferencialmente expresados en pacientes ( $\log_2(\text{FoldChange})$  negativo). En rojo y verde (según estén más expresados en pacientes o controles, respectivamente) los genes con un  $-\log_{10}(q)$  superior a 0,5.



**Fig 37.** Heatmap con los transcritos con mayor expresión diferenciada entre controles y pacientes. P8, P12, P13 y P21 corresponden al grupo mayoritario de sujetos (G1) con IDCV de acuerdo al fenotipo identificado por citometría de flujo.

Adicionalmente, con la información disponible en la literatura, se buscó la expresión diferencial de aquellos genes descritos como patogénicos en la IDCV. Se puede observar cómo en este ensayo hay algunos de esos genes que presentan una expresión reducida en los pacientes con IDCV, mientras que en otros la expresión está aumentada o sin cambios significativos. Algunos de estos están recogidos en la **Tabla 5**.

**Tabla 5.** Genes con expresión diferenciada en la cohorte corte de estudio respecto a los controles y relevantes en para la fisiopatología de la IDCV según la literatura (55,57,205–209).

<b>Genes con expresión aumentada en pacientes cuando se comparan con controles sanos</b>	AICDA, AKT1-S1, CCR7, CHD7, CTLA4, FASN, FOXO1, IFNGR1, KCNN4, LIG1, NCF2, PAX5, PIK3CD, STAT3, UNC13D.
<b>Genes con expresión similar en pacientes cuando se comparan con controles sanos</b>	ADAM, ATM, BCL2L1, CCR3, CCR4, CD40LG, CD81, CFHR5, DOCK8, DSG1, EPG5, FBN1, ICAM1, IKBKG, IKZF1, IL1A, IRF2BP2, LRBA, LRRC8A, APK8, MASP2, MEFV, NBP15, NFKB1, NFKB1, NFKB2, NLRP12, NLRP3, PI3KR1, PLCG1, PLCG2, PTPRC, RAG1, RAG2, RPS6KB2, SF3B1, STAT1, TCF3, TLR1, TNFRSF13B, TNSFR13B, TRAF3IP2, TUBB1, TYK2, ZBTB24.
<b>Genes con expresión reducida en pacientes cuando se comparan con controles sanos</b>	ADA2, DNMT3B, FOXO3, LAX1, MX1, PIK3CD-AS1, PRKCD.

Según el análisis realizado en el programa *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA), la expresión diferenciada de estos genes afectaba a varios procesos moleculares, destacando una mayor expresión en los pacientes de genes implicados en el metabolismo del ARN, la biosíntesis de ribonucleótidos pirimidínicos *de novo*, el metabolismo proteico y la localización de las proteínas, mientras que se encontraban disminuidos aquellos implicados en la regulación de la biosíntesis (destacando la de colesterol), la señalización del sistema inmunitario (destacando la de IL4 e IL13), la concentración de moléculas en el retículo endoplásmico y diversos mecanismos inmunológicos como la señalización del linfocito B o la degranulación (Fig. 38).



**Fig. 38.** Rutas moleculares afectadas por la expresión diferenciada entre controles y pacientes. A mayor intensidad de naranja o “positive value”, mayor expresión en controles. A mayor intensidad de azul o “negative value”, mayor expresión en pacientes.

La disparidad observada en las rutas afectadas implica que en los pacientes existe una menor transcripción de las moléculas necesarias para realizar una adecuada respuesta inmunitaria y de moléculas implicadas en el ciclo celular. Sin embargo, las moléculas que presentan mayor transcripción en los pacientes son las involucradas en mayor actividad transcripcional, por lo que podría implicar un estado de activación y de intento de producción de proteínas.

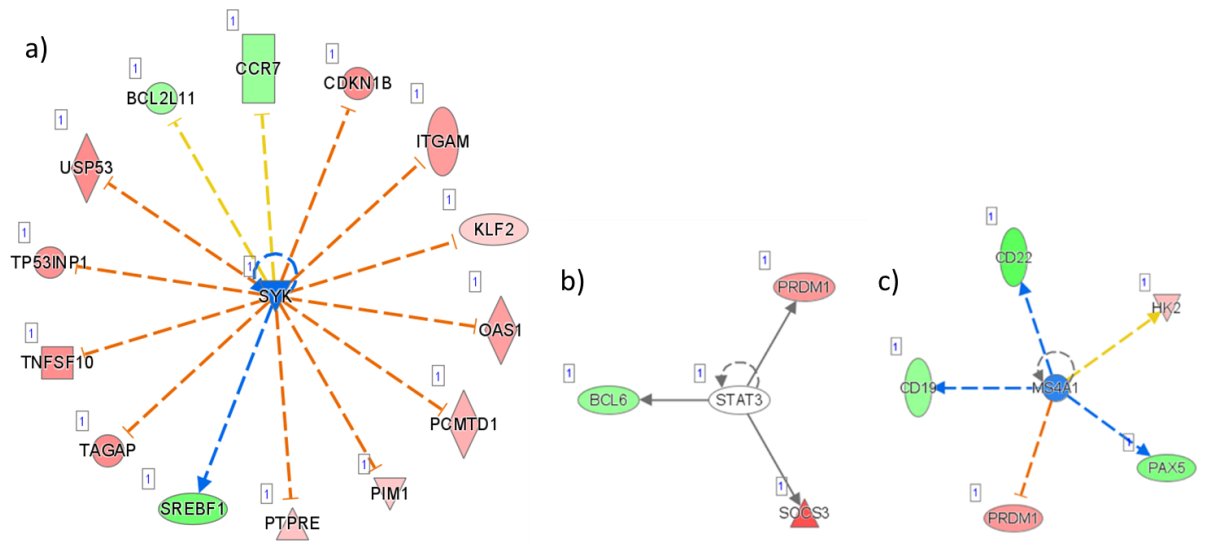
Las rutas más afectadas a nivel funcional según el programa IPA (Fig. 39) son:

- 1.-Muerte celular de células inmunitarias
- 2.-Citotoxicidad de las células inmunitarias
- 3.-Muerte celular leucocitaria
- 4.-Apoptosis leucocitaria

Categoría	Ruta afectada	Valor P	Activación (z-score)	Moléculas implicadas
Muerte celular y supervivencia, lesiones orgánicas	Muerte celular de células inmunitarias	2,82E-02	0,355	30
Muerte celular y supervivencia, compromiso celular	Citotoxicidad de linajes leucocitarios	3,3E-02	0,342	9
Muerte celular y supervivencia, lesiones orgánicas	Muerte celular leucocitaria	3,43E-02	0,615	29
Muerte celular y supervivencia, lesiones orgánicas	Apoptosis de leucocitos	3,69E-02	0,297	26

**Fig. 39.** Principales rutas funcionales afectadas por la expresión diferenciada entre pacientes y controles según el análisis de la plataforma Ingenuity. Adaptación.

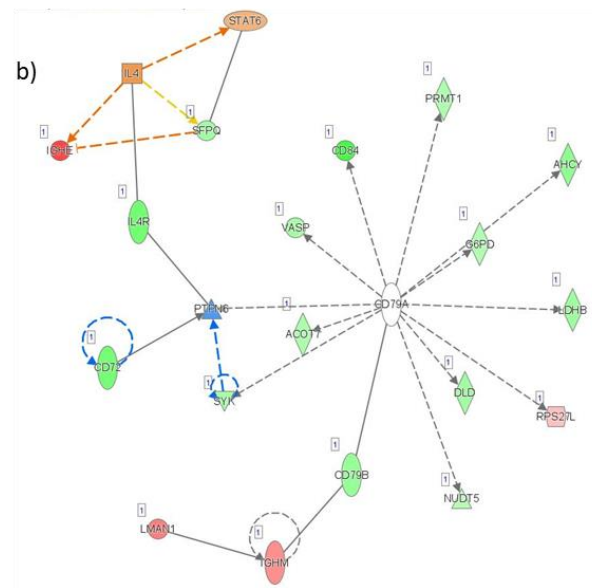
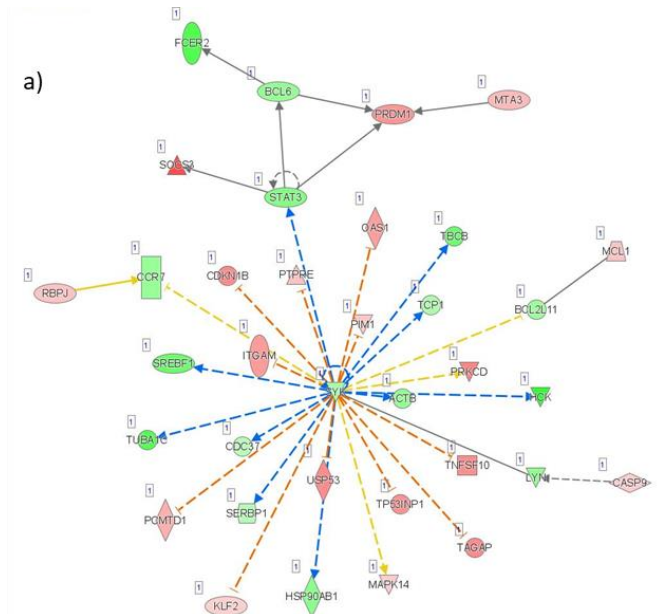
El “Upstream analysis” (ver apartado 6.10) detectó que las moléculas con mayor implicación reguladora en la expresión de otras rutas son STAT3, SYK y MS4A1 (nombre alternativo de CD20). Esta deducción se explica por la expresión diferenciada recogida en la Fig. 40.



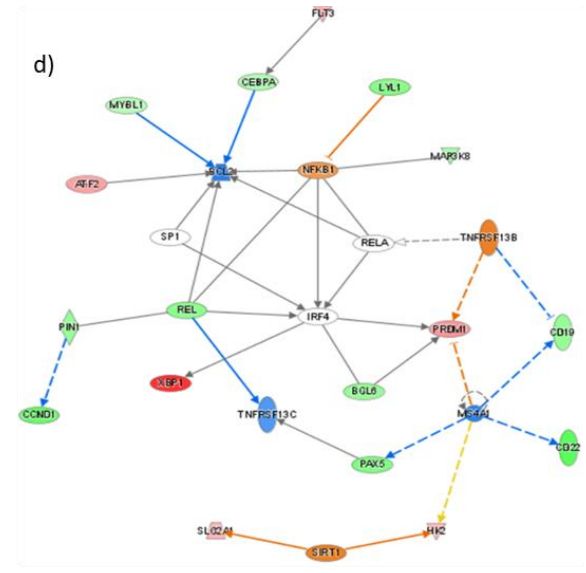
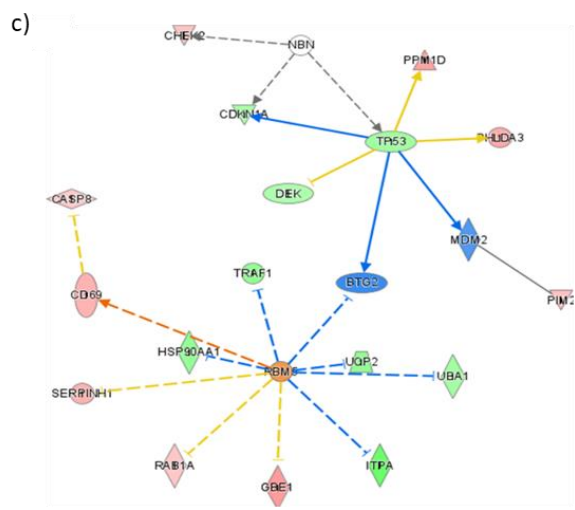
**Fig. 40.** Deducción de las moléculas reguladoras. a) Estimación que implica a SYK; b) Estimación que implica a STAT3; c) Estimación que implica a MS4A1. En verde se representarán las moléculas con mayor expresión en pacientes. En rojo las moléculas con mayor expresión en controles. En naranja las moléculas con predicción por parte del programa de activación. En azul las moléculas con predicción por parte del programa de inhibición. Si la línea es continua significa acción directa. Si la línea es discontinua, significa acción indirecta.

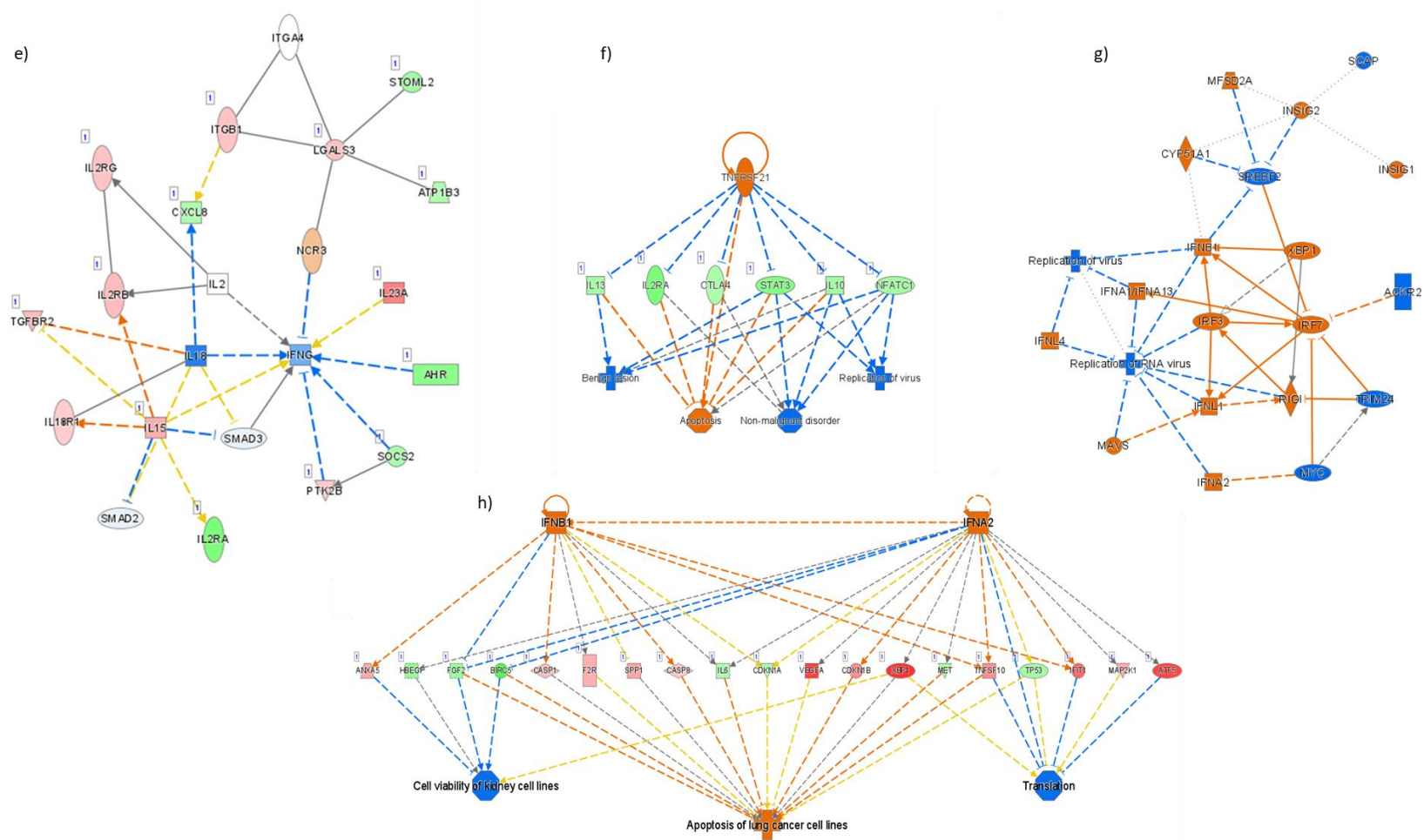
Las rutas que se reflejan como afectadas indican diferencias a varios niveles. Las dos rutas con mayor número de genes diferencialmente expresados involucran por un lado a SYK y CD79 (Fig. 41 a) y b)). Los pacientes presentan un aumento de la señalización generada por el complejo CD79-SYK (asociado a la señalización del BCR), el cual no se traduce en aumento de la producción de inmunoglobulinas, componente principal del propio BCR.

La tercera y cuarta rutas con mayor número de genes afectados implican a moléculas relevantes para el ciclo celular y supresión de tumores (Fig. 41 c) y d)). La quinta ruta involucra a moléculas relacionadas con la respuesta inflamatoria, tales como interleukinas y moléculas de adhesión (Fig. 41 e)). Además, existe también un cambio en la expresión de genes controladores del ciclo celular, tanto inhibidores de la apoptosis como BCL6, promotores de la diferenciación como PAX5, genes supresores de tumores como TP53 o protooncogenes como DEK o REL. También se observa disminución de la expresión de moléculas involucradas en las rutas de señalización de citoquinas, como IL15, IL18 o CXCL8; la expresión de TNFRSF21, lo que conlleva un aumento de las moléculas inhibitorias de la respuesta celular como CTLA4 o IL10 (Fig. 43 f)); o en la señalización de los interferones (Fig. 41 g) y h)).



- Mayor expresión en controles
- Mayor expresión en pacientes
- Mayor expresión predicha en controles
- Mayor expresión predicha en pacientes
- Conlleva mayor expresión
- Conlleva menor expresión
- Medición inconsistente con la información de la base de datos
- Efecto no predicho





**Fig. 41.** Rutas y genes relevantes con expresión diferenciada. a) b); c); d); e) Las cinco rutas con mayor número de genes diferencialmente expresados respectivamente; f) Expresión de TNFRSF21 y moléculas asociadas a la respuesta inmunitaria; g) y h) Expresión de moléculas involucradas en la señalización de los interferones. Si la línea es continua significa acción directa. Si la línea es discontinua, significa acción indirecta.

#### 7.7.4 Análisis de la producción de citoquinas postcultivo

El análisis de citoquinas se realizó con el sobrenadante del cultivo según está indicado en el punto 6.11.

Los resultados de los 20 pacientes incluidos en la evaluación *ex vivo* y de cuatro controles sanos se representan en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Concentración de citoquinas en el sobrenadante de controles y pacientes.

	Controles (pg/dL)	Pacientes (pg/dL)	Valor P
<b>APRIL</b>	159,1	71,9	*
BAFF	64,4	32,4	ns
<b>BTLA</b>	1,33	29	**
<b>IFN<math>\alpha</math></b>	7879,5	1173	*
IFN $\gamma$	8440	7360	ns
IL1a	6	8,5	ns
IL2	2,4	1,9	ns
IL4	115,5	81,2	ns
IL6	17,5	11	ns
IL10	0,8	1,15	ns
IL12	2,4	1,9	ns
IL17a	10,8	7,1	ns
IL21	129,5	74	ns
TNF $\alpha$	3133	3064,5	ns
TRAIL	2,1	6,3	ns
VEGF-A	1821	584	ns

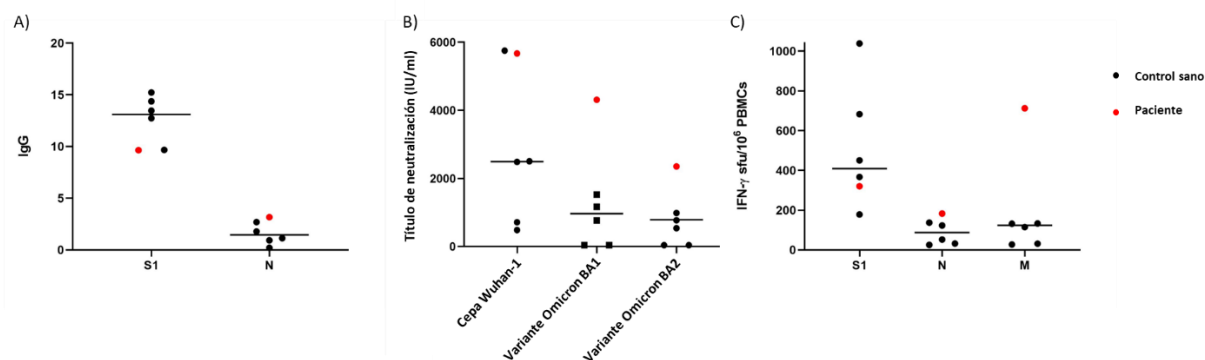
\*= p < 0,05; \*\* = p < 0,01

Se encontraron diferencias significativas entre controles y pacientes en la producción de APRIL, IFN $\alpha$  (mayor producción en controles) y BTLA (mayor producción en pacientes). Respecto a las interleucinas, se observa un predominio tanto en controles como en pacientes de IL4 e IL21, lo cual es concordante con el hallazgo descrito en el apartado 7.7.1.1 en el que se observa un predominio de TH2. Es también destacable la gran producción de interferones y de TNF $\alpha$ , lo cual es propio de un cultivo en el que se emplea agonistas de TLR7 y 8 y en el que se está estimulando a los linfocitos.

## 7.8 Resultados en la paciente con déficit de CD8 $\alpha$

Con respecto a la paciente afectada con déficit de CD8 $\alpha$ , no presentó síntomas compatibles con COVID-19 durante 2020. Sin embargo, en diciembre de 2021, antes de recibir la 3<sup>a</sup> dosis de la vacuna SARS-CoV-2, presentó mialgias, artralgias, odinofagia, disfonía, fiebre (máxima de 38,9°C) y tos. Una prueba de antígenos inicial fue negativa, pero tres días después del inicio de los síntomas la paciente desarrolló disnea y la prueba de PCR resultó positiva para infección por SARS-CoV-2. Durante los siguientes 11 días la paciente tuvo lo que se puede considerar un curso leve de la infección. La paciente se recuperó completamente dos semanas después del inicio de los síntomas. En estas circunstancias, se recogió una muestra de sangre 15 días después de la resolución de la enfermedad, a su vez anterior a la tercera dosis de vacunación, con la que se realizaron los estudios pertinentes.

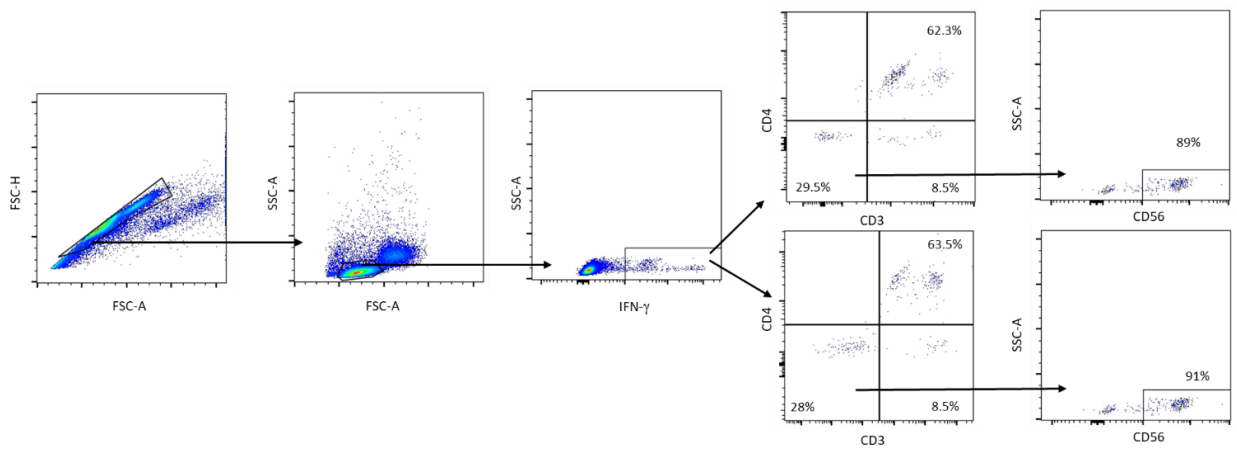
Tras la vacunación y la posterior infección por SARS-CoV-2, la paciente mostró producción de anticuerpos IgG específicos del SARS-CoV-2 contra las proteínas virales S1 y N, con alta capacidad de neutralización (Fig. 42). Además, cuando se realizó el test fluorospot se observaba una adecuada respuesta celular frente a S1, N y M (Fig. 43).



**Fig. 42.** Magnitud de la respuesta inmune adaptativa específica frente a SARS-CoV-2 de la paciente con déficit de CD8 $\alpha$  y de los controles después de la vacunación e infección por el SARS-CoV-2. A) Anticuerpos IgG frente a anti-S1 y N; B) Capacidad de neutralización frente a variantes del SARS-CoV-2: cepa Wuhan-1, variante Omicron BA1, variante Omicron BA2; C) Células T anti-S1, N y M productoras de IFN- $\gamma$ . Los datos se representan como unidades formadoras de spots (sfu) por millón de PBMC.

El marcaje intracitoplasmático de PBMC tras la exposición al antígeno SARS-CoV-2 muestra una producción de IFN- $\gamma$  se distribuida en CD3-CD56+ (25,75%), CD3+CD4+ (63,52%) y CD3+CD4- (8,48%) (Fig. 25). Esta distribución es similar a observada en controles sanos. Trascorridos nueve

meses, la paciente mantenía positivos tanto los anticuerpos anti-S1 y N anti-SARS-CoV-2 (incluyendo la capacidad neutralizante) como la respuesta celular (datos no mostrados).



**Fig. 43.** Análisis de la producción de IFN- $\gamma$  por linfocitos.



## 8.- Discusión

La cohorte de pacientes con IDCV muestra un perfil tanto clínico como analítico muy variable. Clínicamente, en los pacientes analizados para este trabajo se observan perfiles y manifestaciones (esplenomegalia, autoinmunidad, linfoproliferación) que se corresponden con las descritas en la literatura (25,73). Esta cohorte se asemeja así a otras cohortes de pacientes con IDCV, como la presentada por Ho (70) (nuestra cohorte vs Ho= pacientes con sólo infecciones: 31,8% vs 26%; manifestaciones autoinmunes: 31,8% vs 33,2%; esplenomegalia 36% vs 29% o linfomas 9% vs 7%) o la presentada por Chapel (210) (nuestra cohorte vs Chapel: pacientes con sólo infecciones: 31,8% vs 31,9%; esplenomegalia 36% vs 30% o linfomas 9% vs 3%). En el momento del estudio, los pacientes se encontraban en su situación basal ya que ninguno mostraba infecciones relevantes y sólo uno contaba con algún tipo de tratamiento inmunosupresor para controlar manifestaciones asociadas con desregulación. En estas circunstancias, la posibilidad de que los resultados se vean interferidos por la presencia de agentes patógenos o de tratamientos inmunomoduladores es baja. En veinte de los veintidós pacientes recibían tratamiento sustitutivo con inmunoglobulinas. La posibilidad de que el tratamiento con inmunoglobulinas pudiese alterar la medición de la respuesta inmunitaria hacía necesario encontrar el punto de menor influencia del tratamiento para llevar a cabo el estudio, sin perjudicar con ello la situación del paciente. Por ello, la detección de respuesta humoral frente a la vacunación con SARS-CoV-2 se llevó a cabo en el punto valle de este tratamiento (Fig. 13), cuando la cantidad de inmunoglobulinas exógenas circulantes es la menor posible. Además, se excluyó exposición previa al virus en los pacientes ya que ninguno presentó síntomas ni serologías frente a SARS-CoV-2 positivas. Estos factores permitieron asegurar que la respuesta detectada se debió exclusivamente a la vacunación.

En cuanto a la secuenciación para identificar defectos genéticos en estos pacientes, el porcentaje de sujetos con variantes asociadas previamente a IDCV fue de un 18%, semejante a lo referido en la literatura, un 22,72% (58).

El perfil genético de cada paciente podría ser relevante para saber tanto la patogenia de la enfermedad como el pronóstico asociado. Entre los resultados obtenidos del estudio genético existen múltiples variantes que pudieran tener relación con la IDVC y con el perfil clínico de cada paciente:

- P1: Este paciente presenta variantes en AICDA y DLREC, las cuales intervienen en la generación de inmunoglobulinas. Además, se le suman las variantes en ATM, GATA2, RTEL1 y TCFE, las cuales están involucradas en el ciclo celular (y, por tanto, en el

desarrollo del linfocito B), y en MAP3K14, IL17RC y TLR3, las cuales tienen relación con la función de NF-kappa, punto decisivo en la producción de citoquinas y otros productos relacionados con la respuesta inmunitaria. DOCK8 puede estar implicado en la activación de la célula. C3, ITGB2, RLTPR, NCF1 y AP3B1 no presentan una asociación etiopatogénica ligada a la IDCV, además de que en la IDCV no se han descrito fallos en las vías en las que están involucradas (complemento, adhesión, fagocitosis, etc.)

- P2: las variantes en FERMT3 y RBCK1 pueden estar asociadas a alteraciones en el ciclo celular, desde la señalización de TNF a la apoptosis. CR2 está asociado a lupus, pero la paciente no lo ha presentado. C3 y PRF1 no parecen guardar mucha relación con el perfil clínico de la paciente.
- P3 no presentaba variantes de significado incierto.
- P4: LRBA es un gen asociado a la IDCV. Sin embargo, la paciente lo presenta en heterocigosis. NLRP12 y NOD2 se han asociado a patologías autoinmunes, pero la paciente no presenta ese perfil clínico.
- P5: TICAM1 también interfiere en el funcionamiento de NF-kappa gracias a su papel de inductor de señales innatas.
- P6: DNMT3 y RAG2 intervienen en el procesamiento del ADN y las señales que producen. ISG5 está involucrada en la señalización del interferón, pudiendo estar asociada esta variante a la estimulación de la célula.
- P7: PMS2 y PIK3CD tienen relación con la reparación y proliferación celular, pudiendo tener asociación con la esplenomegalia. TAPBP interviene en la señalización del HLA I, por lo que podría entrañar un fallo en la activación de la célula. STX11 y STIM1 se asocian con el procesamiento de las vesículas y el metabolismo del calcio, no asociados actualmente a la IDCV. NCF2 tiene un papel similar a NCF1.
- P8: AIRE se asocia a patologías autoinmunes, algo que la paciente no presenta.
- P9 no ha sido estudiada.
- P10: BLNK y TRNT1 intervienen en el desarrollo del linfocito B, mientras que FADD lo hace en la apoptosis. Además, puede haber defectos en la señalización al estar afectados CIITA y TAPBP1. PIK3CD y STIM1 ya han sido comentados.
- P11: IRF7 interviene en la señalización de los interferones, por lo que podría involucrar un fallo de activación. SMARCA1 se asocia a defectos en transcripción de genes, pudiendo ser otro foco de problemas. ATM y FADD ya han sido comentados.
- P12: RTEL1 podría estar involucrado en el ciclo celular, con posible influencia en el desarrollo del linfocito B.

- P13: en esta ocasión, NLRP12 sí que puede tener algo de relación con la clínica, ya que la paciente presentaba autoinmunidad. No parece presentar problemas de expresión de CD19, por lo que la variante sería considerada no patológica. TCN2 y CTSC se han descrito en otras patologías no coincidentes con IDCV. La posibilidad de que la variante en el gen PIK3R1 fuese patogénica es una opción, pero en este caso se hablaría de un síndrome de PI3K-delta activada o APDS. Sin embargo, la paciente no presenta infecciones de repetición y su proceso oncológico no es un linfoma. Estas son manifestaciones cardinales del síndrome APDS, por lo que ante su ausencia y al no poder confirmar la patogenidad de la variante, el diagnóstico final seguiría siendo el de IDCV al cumplir sus criterios diagnósticos.
- P14: IL21R y STAT2 están asociadas a la activación del linfocito, por lo que su papel en la fisiopatología puede ser relevante. PRKCD puede actuar como desestabilizante del ciclo celular, pudiendo sembrar dudas sobre su implicación, pero CARMIL2 interviene en la migración, no siendo éste un defecto característico de la IDCV.
- P15: la variante en NLRP12 no parece tener repercusión en la clínica, ya que no presenta manifestaciones autoinmunes. La variante en ITPR3 puede provocar defectos en la movilización del calcio necesario para una correcta respuesta inmunitaria. GFI1 se ha asociado tanto a infecciones como a linfomas, pero no al adenocarcinoma pulmonar que desarrolló la paciente.
- P16: IL17RC, JAK3 y RFXANK intervienen en la activación del linfocito, mientras que LYST puede intervenir en la dinámica de los endosomas, algo no descrito en la IDCV como propio de la enfermedad. G6PC3 no tienen influencia directa sobre el papel de sistema inmunitario en la IDCV.
- P17: adicionalmente a las ya explicadas TCN2, ITGB2 y STX11, IL6ST interviene en la señalización de IL6, pudiendo estar afectada la señalización de dicha vía en estos pacientes. Un defecto en SPINK5 implica unas alteraciones epiteliales que no presenta la paciente.
- P18: la paciente presentaba variantes con posible asociación fisiopatológica con la IDCV, tales como IGHM (producción de anticuerpos), CD247, DOCK8 y CD247 (activación de la célula) o AIRE (la paciente presentaba lupus), pero no presentaba los dimorfismos descritos con las mutaciones en POLE, ni intestino corto asociado a TTC7A. CTS ya se ha descrito como posiblemente irrelevante
- P19: las variantes en TACI son las más frecuentes en pacientes con IDCV, aunque en esta paciente se presentan en heterocigosis. TYK2 puede implicar un defecto en la activación

de los linfocitos, mientras que *LIG1* y *TERT* pueden implicar fallos en la integridad del ADN. *AICDA* también puede implicar fallos a la hora de producir anticuerpos. La paciente no ha presentado osteomielitis ni defectos neurológicos, afectados con las mutaciones en *LPIN2* y *EXTL3*.

- P20: la paciente presenta autoinmunidad que encaja con aquellas mutaciones patológicas en *ADA2*, mientras que la señalización puede estar comprometida con las mutaciones en *IL12RB1* e *IL6ST*. *VPS45* se ha descrito en patologías distintas de la IDCV. *TNFRSF13B*, también conocido como *TACI*, es el gen afecto más prevalente en pacientes con IDCV(211), apareciendo en estudios muy variados de pacientes con IDCV(212–214).
- P21: *IL10RA* interviene en señales antiinflamatorias, por lo que su defecto se asociaría a manifestaciones autoinmunes que el paciente no presenta. *DOCK2* sí que podría estar implicado al estar involucrado en la activación linfocitaria. Si *CD40* estuviera afectada, se asociaría con un aumento de IgM que el paciente no presenta. *NCF2*, *RAG2*, *AIRE* y *C3* ya han sido descritos, teniendo poca relevancia al observar el perfil del paciente.
- P22: la movilización del calcio podría estar comprometida con la afectación de *ITPR3*, así como la señalización de la respuesta innata si está afectada *IRAK4* u *OAS1* (teniendo esta última además implicación en la apoptosis celular). *NOD2* se asocia a manifestaciones autoinmunes que no están presentes en el paciente.

Todos aquellos pacientes con manifestaciones del grupo A/L habían sido tratados previamente con resolución completa en la mayoría de los casos al menos un año antes y los tratamientos inmunosupresores se aplicaron en el intervalo entre el estudio de vacunación y el funcional, con un lapso de tiempo considerado suficiente como para no influir en el estudio funcional. La excepción fue P13, la cual estaba recibiendo corticoterapia en el momento de la vacunación.

En el ensayo de vacunación, en la mayoría de los pacientes con IDCV se muestra una respuesta humoral y celular específica del SARS-CoV-2 detectable. El desarrollo de estas respuestas fue no obstante más lenta que en los controles sanos, ya que los pacientes necesitaron la segunda dosis para alcanzar una tasa de respuesta cercana a la del 100% detectada en controles. Y a pesar de que la respuesta fue de menor potencia que en controles, el 83% de los pacientes con IDCV fue positivo para anticuerpos y células T específicos frente a S1 después de las dos dosis de vacunación. La tasa de respuesta registrada en este trabajo concuerda con los datos de Squire *et al.* (215), quienes demostraron que los seis sujetos con IDCV analizados por ellos desarrollaron anticuerpos anti-S1 específicos después de dos dosis de vacunas ARNm. De manera similar, un

segundo trabajo que estudió un espectro más amplio de inmunodeficiencias mostró que entre 12 sujetos con IDCV, 10 y 8 tuvieron respuesta humoral y celular, respectivamente, después de completar el esquema de vacunación con BNT162b2 (170). Además, no se observaron eventos adversos graves en esta cohorte.

Datos anteriores han demostrado que en pacientes con IDCV la tasa de respuesta humoral contra la vacuna de la gripe oscila entre un 0% y un 20% de los pacientes (160,166,169). La tasa de respuesta variaba del 5 al 20% después de vacunación con antígenos de polisacáridos (159) y del 0% al 20% después de dos dosis de vacuna conjugada contra el tétanos (en comparación con el 93% en la población general)(159,161,163). Las respuestas celulares tras vacunación se han explorado mucho menos, pero sí que existen publicaciones que muestran células T productoras de IFN- $\gamma$  disminuidas o normales contra el virus de la gripe en la IDCV después de la vacunación(160,216). En nuestra cohorte, la tasa de respuesta humoral al diagnóstico frente a las vacunas contra *Streptococcus pneumoniae* y toxoide tetánico es del 22%. Dichos resultados son similares a los reportados en la literatura (159,164,167).

Estos resultados sugieren que la inmunogenicidad observada de las vacunas COVID-19 supera a la de las vacunas tradicionales en pacientes con IDCV, y, por tanto, que esa mejor inmunogenicidad puede estar relacionada con la nueva tecnología basada en ARNm de la vacuna anti-SARS-CoV-2. Incluir la respuesta subóptima a la vacunación como criterio diagnóstico de IDCV es un criterio basado en las vacunas disponibles hasta el momento de la pandemia de COVID-19, y por tanto sin tener en cuenta a las vacunas de ARNm. Sería interesante profundizar en por qué las vacunas mRNA son más eficaces que otro tipo de vacunas en estos pacientes.

Además, encontramos una capacidad discordante para producir anticuerpos específicos del virus (83% de los pacientes vacunados) y anticuerpos neutralizantes del virus (50% de los pacientes vacunados), lo que sugiere que la vacunación puede ser subóptima en sujetos con IDCV en la cantidad de la respuesta humoral, la calidad o en ambas. Esto es también una diferencia con los controles sanos, ya que aquellos que producen anticuerpos frente a un antígeno incluyen anticuerpos neutralizantes generalmente. Es importante señalar que dos de los tres pacientes que no produjeron anticuerpos después de la vacunación completa habían estado recibiendo rituximab durante los dos años anteriores.

Tras completar la pauta de vacunación establecida, los pacientes con IDCV produjeron niveles de anticuerpos significativamente más bajos y respuestas celulares más débiles que los controles. Se ha sugerido que cierto grado de respuesta celular aislada podría proporcionar protección contra el SARS-CoV-2 (217). Este concepto podría estar relacionado con nuestra observación del

paciente P9, que contrajo COVID-19 después de la vacunación, pero se recuperó en su casa sin ningún tratamiento, a pesar de no haber producido anticuerpos neutralizantes y presentar factores de riesgo de gravedad. Sin embargo, P7, la única paciente que no desarrolló ningún tipo de respuesta inmunológica, fue la única paciente en padecer un COVID-19 grave después de la vacunación. La posible asociación entre generación de respuesta humoral/celular y protección frente a la COVID-19 requiere de más estudios para comprender si las respuestas observadas a la vacunación en pacientes con IDCV son lo suficientemente potentes como para proporcionar una protección adecuada. Al menos en los casos aquí presentados, la tendencia a tener una respuesta inmunitaria más ineficaz parece estar relacionada con peor protección frente a la enfermedad.

Con anterioridad a la obtención de nuestras muestras, se informó de una elevación de los niveles de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 en lotes de inmunoglobulinas comerciales(218). En nuestra corte de pacientes, al demostrar la ausencia de anticuerpos anti-N en los sueros tras la vacunación se descartó la posibilidad de que los anticuerpos anti-S1 detectados procedieran de la terapia sustitutiva y/o de una infección previa asintomática por SARS-CoV-2. Sólo un paciente que seroconvirtió anticuerpos anti-S1 después de la vacunación mostró también anticuerpos anti-N, los cuales ya estaban presentes en la muestra previa a la vacunación. Aún se desconoce si la presencia concomitante de anticuerpos anti-S1 y anti-N en este paciente pudo estar relacionada con una infección previa por SARS-CoV-2, una infección por otras especies de coronavirus o una transferencia de anticuerpos por las inmunoglobulinas sustitutivas.

Como se mencionó previamente, los pacientes con IDCV con manifestaciones autoinmunes/linfoproliferativas tienen el peor curso de la enfermedad (88). Las respuestas celulares y de anticuerpos discordantes o ausentes aparecieron asociadas con estas complicaciones en nuestra cohorte de IDCV, por lo que una posible hipótesis sería que aquellos pacientes con una respuesta más deficiente coinciden con aquellos pacientes de peor pronóstico. De manera similar, Rezaei y colaboradores informaron tasas significativamente mayores de esplenomegalia y autoinmunidad entre pacientes con IDCV que no produjeron anticuerpos específicos después de la vacunación con polisacáridos meningocócicos (219).

También es interesante que, según Rezaei, la magnitud de la respuesta celular también fue menor en pacientes con IDCV en comparación con los controles sanos, aunque no fue estadísticamente significativa. Para interpretar esto, es relevante decir que todos los pacientes con IDCV incluidos en este estudio recibieron cuatro dosis de anti-SARS-CoV-2 (con la excepción de P20, que sólo recibió una dosis) con fechas de administración similares y los controles sanos

tuvieron de dos a cuatro dosis, con fechas de administración diferentes. Las diferencias en el tiempo desde la última dosis y el número de dosis podrían explicar por qué la magnitud de la respuesta es similar entre controles y pacientes.

El ensayo *in vitro* de linfocitos B de los pacientes con IDCV se planteó para obtener mayor información sobre cómo era la respuesta de estas células cuando estas eran activadas, la distribución en las distintas subpoblaciones y sus capacidades funcionales, éstas últimas, en particular, en relación a la capacidad de generar una reacción inmunitaria anti-SARS-CoV-2. Gracias a que la vacunación fue efectiva, se pudo proceder a evaluar el tipo de respuesta que son capaces de generar los pacientes con IDCV.

Todos los pacientes incluidos en el ensayo mostraban una respuesta humoral adecuada en el momento previo a la 4ª dosis de vacunación, siendo este punto aproximadamente diez meses antes de la realización de los cultivos. Esta positividad mostraba que los pacientes habían desarrollado al menos una adecuada respuesta humoral que se mantenía hasta ocho meses después de la última dosis de vacunación, de forma similar a lo descrito en población sana (220,221).

El buen manejo clínico, y el cuidado por evitar sesgos asociados al tratamiento por hacer coincidir las extracciones en un momento de estabilidad de la enfermedad han podido influir en que parámetros como el número de linfocitos B naïve de pacientes que originariamente se detectasen disminuidos, o el número de CD8+ de memoria efectora originariamente elevados, en la citometría precultivo se mostrasen en rango de normalidad.

Antes de establecer los cultivos celulares se realizó un análisis de las poblaciones linfocitarias comparando pacientes con IDCV con controles. Los controles sanos tuvieron una distribución normal de las poblaciones linfocitarias según su rango de edad. La distribución celular de cada paciente fue similar a la de sus estudios anteriores con la excepción de las poblaciones B naïve en aquellos pacientes que en el estudio inicial estaban bajas. El que se haya normalizado tanto esta población como, en algunos casos, los linfocitos T CD8+ de memoria efectora, puede corresponder a la disminución de infecciones que han presentado estos pacientes desde el momento de su diagnóstico e inicio del tratamiento hasta la actualidad. Sin embargo, los pacientes seguían presentando una elevación de TEMRA a costa de una reducción de la memoria central. Esto podría ser atribuido al antecedente de infecciones de repetición(222,223).

En el compartimento B es donde más se aprecian las diferencias: varios pacientes presentaban un aumento de LB naïve así como una reducción de los compartimentos zona marginal y cambio

de clase, algo ya observado en el momento del diagnóstico de la enfermedad (ver apartado 4.2.3).

Después del cultivo, tanto los pacientes como los controles tuvieron un comportamiento similar al analizar las poblaciones CD8+: las poblaciones naïve y memoria efectora aumentaron después del cultivo y las poblaciones de memoria central y TEMRA disminuyeron. Este efecto puede explicarse por la activación de las células CD8+ mediada por la IL2 y R848 empleados como estímulos en el cultivo: las células CD8 naïve tienen una expresión relevante de CD122 (cadena  $\beta$  del receptor de IL2) (224), por lo que la administración de IL2 conduciría a la proliferación de estas células. Además, su señalización conllevaría un aumento de factores de transcripción como Blimp-1 que provocaría una diferenciación a células T efectoras (225–227). Las diferencias en la significación al comparar TEMRA CD8+ precultivo versus poscultivo en controles sanos y pacientes con IDCV podrían estar relacionadas con el fenotipo TEMRA previamente aumentado en los pacientes. Esto puede ser debido a que padecen infecciones más frecuentes que producen una polarización hacia TEMRA (228,229), y aunque los pacientes no han tenido recientemente infecciones de gravedad, tienen un historial relevante de infecciones graves y de repetición previo al tratamiento sustitutivo, tras el cual padecen infecciones semejantes a los controles sanos.

El objetivo principal de este experimento fue comprobar las diferencias entre los Linfocitos B en controles sanos y pacientes con IDCV cuando se activan. Existen diversas teorías sobre la implicación de las células T en el desarrollo de la enfermedad, pero el núcleo del estudio se basa en los problemas asociados a los Linfocitos B de los pacientes, por lo que intentamos una estimulación independiente de la activación de las células T: TLR7 puede activar los Linfocitos B independientemente de la activación de las células T (230) y TLR8 tiene actividad en los Linfocitos B (231), por lo que se espera que con esta combinación los Linfocitos B sean capaces ser activados sin involucrar a otras células.

El compartimento de memoria CD4+ no mostró cambios significativos después de la estimulación del cultivo, ni en los pacientes ni en controles sanos (datos no mostrados). Esta diferencia en comparación con el compartimento CD8+ puede estar relacionada con la falta de expresión de CD122 en células T CD4+ vírgenes (224). Sin embargo, la polarización de TH fue un efecto relevante del cultivo: la polarización hacia TH2 fue significativa en ambas cohortes, con una importante disminución en TH17 y TH1-17. La reducción de TH17 puede estar asociada tanto a la señalización de IL2 (227,232) como de TLR7 mediante la inducción de SOCS3 y SOCS5 (233). La señalización de TLR8 podría estar asociada con el aumento de TH1 (234,235), pero como

muestran los resultados, en este caso predominó la polarización hacia TH2. Este aumento de TH2 puede estar relacionado con el aumento de los Linfocitos B de memoria(236,237), las cuales se desarrollan gracias a la producción de citocinas cuya producción es realizada por de estas células (algo que se puede observar en el análisis de citoquinas). Se puede por tanto sospechar que la actividad de R848 podría dirigir la polarización de TH hacia el compartimiento TH1, pero el ambiente, claramente influenciado por la activación de los Linfocitos B, produjo una mayor tendencia hacia TH2. El mismo comportamiento se puede observar en la polarización de cTFH.

En controles sanos, se puede observar cómo tras el cultivo los LB naïve (IgD+CD27-) disminuyen a costa de un incremento del resto de compartimentos, sobre todo de los LB con cambio de clase (IgD-CD27+). Además, se generaron porcentajes elevados de plasmablastos (CD27+CD38+).

Sin embargo, la distribución de Linfocitos B en pacientes con IDCV mostró dos comportamientos:

- Un comportamiento mayoritario o G1 (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P21 y P22) en el que no se producen Linfocitos B con cambio de clase (IgD-CD27+), con un compartimento naïve disminuido debido a un aumento de LB IgD-/CD27-.
- Un comportamiento minoritario (P9, P19 y P20) con producción de Linfocitos B de memoria y plasmablastos de forma análoga a como lo hacen los controles sanos. En ellos se observa un adecuado número de Linfocitos B con cambio de clase (IgD-CD27+), con un compartimento naïve también disminuido, pero con mucha menor presencia de LB IgD-/CD27-

La relevancia de estos linfocitos B IgD-CD27- aún no está del todo clara, pero se ha planteado su relación con enfermedades autoinmunes como el lupus (238), artritis reumatoide (239) o miastenia gravis (240), así como en procesos oncológicos (241). Estas células podrían estar elevadas en algunos pacientes con IDCV (242,243). Después del cultivo, todas las IgD-CD27- mostraron un fenotipo CD38+, manteniendo la expresión de CD20+. Esto podría implicar que las células que aquí se agrupan no son las detectadas en el mismo compartimento a nivel precultivo. CD38 es un marcador de actividad inmunomoduladora y de procesos inflamatorios(244), y esto podría implicar que estas células fueran células activadas. Esto nos lleva a una pregunta importante: ¿Son estos linfocitos B IgD-CD27- células de memoria defectuosas presentes en pacientes con IDVC? Si es así, ¿por qué no se expresa CD27, un marcador de memoria y con un papel importante de la coestimulación de los Linfocitos B?

Para responder a esta pregunta deberíamos saber si se ha producido alguna actividad propia de los Linfocitos B, como es la producción de anticuerpos, y para ello el sobrenadante podría darnos

la respuesta a dicha pregunta. En la mayoría de los sobrenadantes se detectó anticuerpos anti-S. Además, es importante mencionar que cuando Karahan y su equipo midieron la producción de anticuerpos, procedieron a concentrarlos mediante centrifugación o mediante filtros. En este caso no hizo falta porque pudimos ver que con el sobrenadante no concentrado era suficiente para detectar anticuerpos. Esto podría implicar incluso que los sobrenadantes con anti-S SARS-CoV-2 negativo podrían ser positivos si se procediera a concentrarlo.

La presencia de anticuerpos IgG en el sobrenadante de los cultivos de pacientes con IDCV podría sugerir que los Linfocitos B de memoria podrían producir eficazmente anticuerpos específicos, y, por tanto, que este compartimento de Linfocitos B podría actuar de la misma forma que el de los controles sanos, aunque muestren un perfil citométrico diferente. Esto se descartó después de observar los resultados del Elispot B. Aquí podemos apreciar cómo algunos controles sanos mostraron SFU positivas contra antígenos del SARS-CoV-2 mientras que ningún paciente las presentaba y, sobre todo, que no hay control sano que presente insuficiente IgG total como para ser considerado negativo ni ningún paciente que muestre suficiente IgG total para ser considerado positivo. Esto podría implicar que en el momento del revelado del Elispot B (después de diez días de cultivo de IL-2+R848 y un día de siembra en placa) los Linfocitos B de los pacientes no eran capaces de secretar IgG, algo que no sucede con los controles sanos. Este evento sucedió incluso en aquellos pacientes con citometría espectral similar a la de los controles sanos.

Con esta información disponible, se planteó que la causa de la IgG presente en sobrenadante con ausencia de SFUs (tanto IgG específicas como totales) y CD19+IgD-CD27-CD38+CD20+ al final del cultivo está relacionada con un posible agotamiento del compartimento de memoria B de los pacientes. Hay referencias de que esta población de linfocitos B IgD-CD27- son células exhaustas (245,246). La teoría de que estamos ante una situación de agotamiento se puede fundamentar en que, como se puede apreciar en el transcriptoma los linfocitos B de los pacientes presentan unas señales de activación más expresadas, con especial implicación del BCR (mayor expresión de SYK, CD20) (247) junto con moléculas implicadas en la inhibición de la señal inflamatoria (LILRB2, CTLA4, IL10). Se puede observar cómo la sobreexpresión de SYK no desemboca en mayor expresión de moléculas como MAPK14, kinasa involucrada en la activación celular, contraintuitivamente menos expresada en pacientes que en controles (ver Fig. 43 a), lo que puede indicar predominancia de las señales inhibitorias. Por lo tanto, un posible mecanismo patológico en estos pacientes sería la distinta dinámica de respuesta entre las células de los pacientes y las de los controles para mantener la respuesta inmunitaria.

Esta idea queda reforzada por los resultados de la citometría del sexto día de cultivo, donde pudimos ver que había plasmablastos que al décimo día desaparecieron. Hay estudios que describen a estas células CD19+IgD-CD27- como células de memoria (241,248–250), por lo que la posibilidad de tener una población de Linfocitos B de memoria que no pueden mantener su coactivación debido a la pérdida de CD27(251,252) puede estar detrás de estos fenómenos. La posibilidad de que el origen del deterioro de la función de los Linfocitos B esté relacionado con la pérdida de coestimulación/agotamiento se correlaciona con lo hallado en el transcriptoma.

En cuanto al análisis del transcriptoma, se ha considerado más relevante valorar las moléculas con un *Foldchange* elevado dado que al ser una muestra con pocos individuos, un valor *p* no significativo puede hacer descartar variantes que se convertirían quizás en significativas si el número de participantes hubiera sido mayor y/o de presentar menor varianza (en el caso de fijarnos en el valor *p* ajustado por FDR). Por un lado, los resultados del transcriptoma corroboran lo encontrado en el Elispot B, ya que entre los genes menos expresados en pacientes se encontraron varios que son necesarios para la generación de inmunoglobulinas (IGHA1, IGHG1). Además, se observan fenómenos descritos en los pacientes con IDCV como alteración en la vía de los interferones (253,254) (Fig. 43); defectos en genes ya reportados como implicados en la IDCV (tabla 5) o disminución de las señales de diversos receptores de TNF $\alpha$  (Fig. 37), por lo que estos hallazgos son consistentes con lo descrito previamente. Los pacientes presentan además cambios en la expresión de moléculas que intervienen en el ciclo celular y en la propia supervivencia de la célula, lo que explica la mayor tasa de mortalidad celular apreciada al final del cultivo.

La producción de citocinas muestra concordancia con lo observado en la citometría: existe predominio de producción de IL4 e IL21, citocinas asociadas al linaje TH2(255,256). Además, existe una menor producción de citoquinas relacionadas con la estimulación celular, como es el caso de APRIL, un ligando de receptor TNF asociado a la supervivencia de plasmablastos(257) o IFN $\alpha$ , el cual ya se ha descrito como defectuoso en los casos de IDCV (254). A esto se le debe añadir una mayor producción de BTLA en los pacientes, lo que puede estar asociado a una mayor inhibición de la respuesta inmunitaria (258,259).

Como resumen de los resultados del ensayo funcional, existen varios datos que sugieren una adecuada validez interna de todo el ensayo, como la coincidencia de los resultados del Elispot, la citometría y el transcriptoma o los defectos referidos en la literatura con los resultados del transcriptoma. El conjunto de los resultados obtenidos permite postular como hipótesis que un posible mecanismo fisiopatológico de los pacientes con IDCV sea la precoz extenuación de los

linfocitos B, algo que explicaría su capacidad puntual de generar anticuerpos detectables, pero de manera limitada y no sostenida en el tiempo, ya que en un lapso de diez días los pacientes estudiados pierden esa capacidad de generación.

Con respecto a la respuesta a la vacunación frente a SARS-CoV-2 por parte de la paciente con déficit de CD8 $\alpha$ , se observó en ella un desarrollo de la respuesta inmune adaptativa similar a la de los controles sanos. La detección de reactividad contra las proteínas N y M significa una respuesta inmune humoral y celular a la infección natural por SARS-CoV-2 adecuada, dado que la vacunación administrada no incluía los antígenos N y M. Debido a la falta de una muestra de sangre previa a la infección, no se puede asegurar que la paciente haya desarrollado la respuesta frente a S1 gracias a la vacunación. Sin embargo, el desarrollo de respuestas humorales y celulares anti-S1 similares a las de los controles sugiere que la paciente desarrolló inmunidad al SARS-CoV-2 después de la vacunación, que probablemente fue reforzada por la infección.

En resumen, estos resultados muestran que la falta del correceptor CD8 no impide el desarrollo de la respuesta inmunitaria. De esta manera, los linfocitos que carecen de expresión de CD8 podrían aun así mantener la producción de IFN- $\gamma$  y ser capaces de hacer frente a infecciones virales, especialmente después de la vacunación. Esto podría explicar por qué la paciente sólo sufrió un COVID-19 leve, ya que, junto con los anticuerpos, las células T citotóxicas tienen un papel relevante en la eliminación de infecciones virales, incluyendo la mayoría de los virus respiratorios (260,261). La paciente y su familia han tenido un seguimiento más exhaustivo, en el que se insiste periódicamente en la necesidad de completar la vacunación y recibir dosis de refuerzo frente a patógenos relevantes. Comprender la respuesta inmune a la infección por SARS-CoV-2 y a las vacunas COVID-19 en el contexto de la deficiencia de CD8 ayuda a estimar el impacto de la infección natural y la vacunación en pacientes con esta inmunodeficiencia primaria. Estas nuevas vacunas adicionalmente han presentado una nueva posibilidad para ayudar a proteger mejor a estos pacientes frente a infecciones.

Entre las principales limitaciones de este estudio destaca el limitado número de pacientes analizados, algo relevante dada la alta variabilidad de fenotipos y de situaciones fisiopatológicas diferentes englobadas en la IDCV. No se puede por tanto inferir que los tipos de pacientes según el análisis citométrico sean también el mayoritario y minoritario en la población general. Sin embargo, estos datos arrojan algo más de luz a la fisiopatología de la IDCV, al mecanismo de la respuesta inmunitaria y remarca la oportunidad de seguir estudiando patologías parcialmente conocidas con las nuevas herramientas que se siguen diseñando, como lo han sido las vacunas ARNm.



## 9. Conclusions

Regarding the results, the conclusions can be divided according their implications in the vaccine study of CVID patients (1), the ex-vivo study (2) or the CD8 $\alpha$  deficient patient (3):

1A.- This cohort of patients with CVID is representative of the spectrum of the disease by presenting a proper variety of their analytical, clinical and genetic profiles.

1B.- Our CVID cohort showed a large list of VOUS and a small number of pathogenic alterations which can serve for future interpretation of these variations and their relevance in the clinical/analytical profile of CVID patients.

1C.- In patients with CVID, the two-dose schedule of the COVID-19 vaccine appears to be useful to develop specific antibodies and T cell response against SARS-CoV-2.

1D.- After vaccination, CVID subjects with autoimmune/lymphoproliferative manifestations may have a higher risk of SARS-CoV-2 infection due to the lower response in this particular population.

1E.- The lack of antibody response was associated with B lymphopenia, which occurred in our cohort in those patients undergoing B cell depletion therapy; and the absence of cellular response could be associated with previous oncological history and defects in the cellular immunity compartment.

1F.- CVID patients can maintain both humoral and cellular immunologic responses at least seven months after vaccination.

2A.- Stimulating PBMCs with IL2 and R848 *in vitro* produces a greater proportion of TEMRA CD8 $^{+}$  lymphocytes when compared with healthy controls and, similarly to healthy controls, an increase of TH2 and cTFH2.

2B.- Patients developed a greater proportion of IgD-CD27 $^{-}$  than healthy controls after culture, while healthy controls showed a greater proportion of switch class B cells and plasmablasts.

2C- The dynamics of anti-SARS-CoV-2 IgG production during the stimulation culture, together with the Elispot B and transcriptomic results, may suggest that the IgD-27- cell population in COVID patients could represent exhausted B cells.

2D.- After *in vitro* stimulation, the production of APRIL and IFN $\alpha$  were decreased in patients while production of BTLA was increased, which could be associated to restricted immune response in patients.

3A.- The lack of the CD8 co-receptor did not affect the recognition of SARS-CoV-2 viral antigens or the development of a detectable SARS-CoV-2-specific humoral and cellular immune response.

3B.- CD4-CD8- T cells in CD8 $\alpha$  deficit patients can keep activity against pathogens.



## 10.- Bibliografía

1. Bousfiha A, Jeddane L, Picard C, Al-Herz W, Ailal F, Chatila T, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Franco JL, Holland SM, Klein C, Morio T, Ochs HD, Oksenhendler E, Puck J, Torgerson TR, Casanova JL, Sullivan KE, Tangye SG. Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update of the IUIS Phenotypical Classification. *J Clin Immunol*. 2020 Jan;40(1):66-81. doi: 10.1007/s10875-020-00758-x. Epub 2020 Feb 11.
2. Chapel H. Classification of primary immunodeficiency diseases by the International Union of Immunological Societies (IUIS) Expert Committee on Primary Immunodeficiency 2011. *Clin Exp Immunol*. 2012 Apr;168(1):58-9.
3. Modell V, Orange JS, Quinn J, Modell F. Global report on primary immunodeficiencies: 2018 update from the Jeffrey Modell Centers Network on disease classification, regional trends, treatment modalities, and physician reported outcomes. *Immunol Res*. 2018 Jun;66(3):367-380.
4. Gerber, W.A. Focus on Chronic Variable Immunodeficiency for Primary Care Practitioners, the Gatekeepers to Optimal Health Outcomes for Primary Immunodeficiency Syndromes. *Curr Pediatr Rep* 7, 130–144 (2019). <https://doi.org/10.1007/s40124-019-00202-8>.
5. Suri D, Rawat A, Singh S. X-linked Agammaglobulinemia. *Indian J Pediatr*. 2016 Apr;83(4):331-7.
6. BRUTON OC. Agammaglobulinemia. *Pediatrics*. 1952 Jun;9(6):722-8.
7. Elsink K, Huibers MMH, Hollink IHIM, Simons A, Zonneveld-Huijssoon E, van der Veken LT, Leavis HL, Henriët SSV, van Deuren M, van de Veerdonk FL, Potjewijd J, Berghuis D, Dalm VASH, Vermont CL, van de Ven AAJM, Lambeck AJA, Abbott KM, van Hagen PM, de Bree GJ, Kuijpers TW, Frederix GWJ, van Gijn ME, van Montfrans JM; Genetics First for Primary Immunodeficiency Disorders Consortium. Implementation of Early Next-Generation Sequencing for Inborn Errors of Immunity: A Prospective Observational Cohort Study of Diagnostic Yield and Clinical Implications in Dutch Genome Diagnostic Centers. *Front Immunol*. 2021 Dec 21;12:780134.
8. Abolhassani H, Rezaei N, Mohammadinejad P, Mirminachi B, Hammarstrom L, Aghamohammadi A. Important differences in the diagnostic spectrum of primary immunodeficiency in adults versus children. *Expert Rev Clin Immunol*. 2015 Feb;11(2):289-302.
9. Peter HH. Adult-onset immunodeficiency--why is it important in rheumatology? *Arthritis Res Ther*. 2013 Jan 30;15(1):105.
10. Staels F, Collignon T, Betrains A, Gerbaux M, Willemsen M, Humblet-Baron S, Liston A, Vanderschueren S, Schrijvers R. Monogenic Adult-Onset Inborn Errors of Immunity. *Front Immunol*. 2021 Nov 17;12:753978. doi: 10.3389/fimmu.2021.753978.
11. Bousfiha A, Moundir A, Tangye SG, Picard C, Jeddane L, Al-Herz W, Rundles CC, Franco JL, Holland SM, Klein C, Morio T, Oksenhendler E, Puel A, Puck J, Seppänen MRJ, Somech R, Su HC, Sullivan KE, Torgerson TR, Meyts I. The 2022 Update of IUIS Phenotypical

Classification for Human Inborn Errors of Immunity. *J Clin Immunol*. 2022 Oct;42(7):1508-1520.

12. Yazdani R, Azizi G, Abolhassani H, Aghamohammadi A. Selective IgA Deficiency: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Phenotype, Diagnosis, Prognosis and Management. *Scand J Immunol*. 2017 Jan;85(1):3-12.
13. Yazdani R, Habibi S, Sharifi L, Azizi G, Abolhassani H, Olbrich P, Aghamohammadi A. Common Variable Immunodeficiency: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, Classification, and Management. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2020;30(1):14-34.
14. Fudenberg H, Good RA, Goodman HC, Hitzig W, Kunkel HG, Roitt IM, Rosen FS, Rowe DS, Seligmann M, Soothill JR. Primary immunodeficiencies. Report of a World Health Organization Committee. *Pediatrics*. 1971 May;47(5):927-46.
15. Weifenbach N, Schneckenburger AAC, Lötters S. Global Distribution of Common Variable Immunodeficiency (CVID) in the Light of the UNDP Human Development Index (HDI): A Preliminary Perspective of a Rare Disease. *J Immunol Res*. 2020 Sep 1;2020:8416124.
16. Bonilla FA, Barlan I, Chapel H, Costa-Carvalho BT, Cunningham-Rundles C, de la Morena MT, Espinosa-Rosales FJ, Hammarström L, Nonoyama S, Quinti I, Routes JM, Tang ML, Warnatz K. International Consensus Document (ICON): Common Variable Immunodeficiency Disorders. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2016 Jan-Feb;4(1):38-59.
17. Tseng CW, Lai KL, Chen DY, Lin CH, Chen HH. The Incidence and Prevalence of Common Variable Immunodeficiency Disease in Taiwan, A Population-Based Study. *PLoS One*. 2015 Oct 13;10(10):e0140473. doi: 10.1371/journal.pone.0140473.
18. Matamoros Florí N, Mila Llambi J, Español Boren T, Raga Borja S, Fontan Casariego G. Primary immunodeficiency syndrome in Spain: first report of the National Registry in Children and Adults. *J Clin Immunol*. 1997 Jul;17(4):333-9.
19. Westh L, Mogensen TH, Dalgaard LS, Bernth Jensen JM, Katzenstein T, Hansen AE, Larsen OD, Terpling S, Nielsen TL, Larsen CS. Identification and Characterization of a Nationwide Danish Adult Common Variable Immunodeficiency Cohort. *Scand J Immunol*. 2017 Jun;85(6):450-461.
20. Ludviksson BR, Sigurdardottir ST, Johannsson JH, Haraldsson A, Hardarson TO. Epidemiology of Primary Immunodeficiency in Iceland. *J Clin Immunol*. 2015 Jan;35(1):75-9.
21. Bryant A, Calver NC, Toubi E, Webster AD, Farrant J. Classification of patients with common variable immunodeficiency by B cell secretion of IgM and IgG in response to anti-IgM and interleukin-2. *Clin Immunol Immunopathol*. 1990 Aug;56(2):239-48.
22. Conley ME, Notarangelo LD, Etzioni A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies). *Clin Immunol*. 1999 Dec;93(3):190-7.
23. Warnatz K, Denz A, Dräger R, Braun M, Groth C, Wolff-Vorbeck G, Eibel H, Schlesier M, Peter HH. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+)IgM(-)IgD(-)) in

subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood*. 2002 Mar 1;99(5):1544-51.

24. Piqueras B, Lavenu-Bombled C, Galicier L, Bergeron-van der Cruyssen F, Mouthon L, Chevret S, Debré P, Schmitt C, Oksenhendler E. Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects. *J Clin Immunol*. 2003 Sep;23(5):385-400.
25. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, Vlkova M, Hernandez M, Detkova D, Bos PR, Poerksen G, von Bernuth H, Baumann U, Goldacker S, Gutenberger S, Schlesier M, Bergeron-van der Cruyssen F, Le Garff M, Debré P, Jacobs R, Jones J, Bateman E, Litzman J, van Hagen PM, Plebani A, Schmidt RE, Thon V, Quinti I, Espanol T, Webster AD, Chapel H, Vihinen M, Oksenhendler E, Peter HH, Warnatz K. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood*. 2008 Jan 1;111(1):77-85.
26. Carsetti R, Köhler G, Lamers MC. Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment. *J Exp Med*. 1995 Jun 1;181(6):2129-40.
27. Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E, Nussenzweig MC. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science*. 2003 Sep 5;301(5638):1374-7.
28. Warnatz K, Wehr C, Dräger R, Schmidt S, Eibel H, Schlesier M, Peter HH. Expansion of CD19(hi)CD21(lo/neg) B cells in common variable immunodeficiency (CVID) patients with autoimmune cytopenia. *Immunobiology*. 2002 Dec;206(5):502-13.
29. Unger S, Seidl M, van Schouwenburg P, Rakhmanov M, Bulashevskaya A, Frede N, Grimbacher B, Pfeiffer J, Schrenk K, Munoz L, Hanitsch L, Stumpf I, Kaiser F, Hausmann O, Kollert F, Goldacker S, van der Burg M, Keller B, Warnatz K. The TH1 phenotype of follicular helper T cells indicates an IFN- $\gamma$ -associated immune dysregulation in patients with CD21<sup>low</sup> common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2018 Feb;141(2):730-740.
30. Yong PF, Thaventhiran JE, Grimbacher B. «A rose is a rose is a rose,» but CVID is Not CVID common variable immune deficiency (CVID), what do we know in 2011? *Adv Immunol*. 2011;111:47-107.
31. Ameratunga R, Woon ST, Gillis D, Koopmans W, Steele R. New diagnostic criteria for common variable immune deficiency (CVID), which may assist with decisions to treat with intravenous or subcutaneous immunoglobulin. *Clin Exp Immunol*. 2013 Nov;174(2):203-11.
32. Seidel MG, Kindle G, Gathmann B, Quinti I, Buckland M, van Montfrans J, Scheible R, Rusch S, Gasteiger LM, Grimbacher B, Mahlaoui N, Ehl S; ESID Registry Working Party and collaborators. The European Society for Immunodeficiencies (ESID) Registry Working Definitions for the Clinical Diagnosis of Inborn Errors of Immunity. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2019 Jul-Aug;7(6):1763-1770.
33. Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsuiki N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S, Pan-Hammarström Q, van Zelm MC, Morio T, Imai K, Nonoyama S. Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin  $\kappa$ -deleting recombination excision circles. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 May;131(5):1437-40.e5.

34. Berbers RM, Drylewicz J, Ellerbroek PM, van Montfrans JM, Dalm VASH, van Hagen PM, Keller B, Warnatz K, van de Ven A, van Laar JM, Nierkens S, Leavis HL. Targeted Proteomics Reveals Inflammatory Pathways that Classify Immune Dysregulation in Common Variable Immunodeficiency. *J Clin Immunol*. 2021 Feb;41(2):362-373.
35. Guevara-Hoyer K, Jiménez-Huete A, Vasconcelos J, Neves E, Sánchez-Ramón S. Variable immunodeficiency score upfront analytical link (VISUAL), a proposal for combined prognostic score at diagnosis of common variable immunodeficiency. *Sci Rep*. 2021 Jun 9;11(1):12211.
36. Seidel MG, Tesch VK, Yang L, Hauck F, Horn AL, Smolle MA, Quehenberger F, Benesch M. The Immune Deficiency and Dysregulation Activity (IDDA2.1 'Kaleidoscope') Score and Other Clinical Measures in Inborn Errors of Immunity. *J Clin Immunol*. 2022 Apr;42(3):484-498.
37. Chapel H, Patel S. Defining B-cell defects and correlation with complications in patients with common variable immune deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2019 Sep;144(3):654-655.
38. Friman V, Quinti I, Davydov AN, Shugay M, Farroni C, Engström E, Pour Akaber S, Barresi S, Mohamed A, Pulvirenti F, Milito C, Granata G, Giorda E, Ahlström S, Karlsson J, Marasco E, Marcellini V, Bocci C, Cascioli S, Scarsella M, Phad G, Tilevik A, Tartaglia M, Bemark M, Chudakov DM, Carsetti R, Grimsholm O. Defective peripheral B cell selection in common variable immune deficiency patients with autoimmune manifestations. *Cell Rep*. 2023 May 30;42(5):112446.
39. van de Ven AA, Compeer EB, van Montfrans JM, Boes M. B-cell defects in common variable immunodeficiency: BCR signaling, protein clustering and hardwired gene mutations. *Crit Rev Immunol*. 2011;31(2):85-98.
40. Sharifi L, Mirshafiey A, Rezaei N, Azizi G, Magaji Hamid K, Amirzargar AA, Asgardoon MH, Aghamohammadi A. The role of toll-like receptors in B-cell development and immunopathogenesis of common variable immunodeficiency. *Expert Rev Clin Immunol*. 2016;12(2):195-207.
41. Wong GK, Huissoon AP. T-cell abnormalities in common variable immunodeficiency: the hidden defect. *J Clin Pathol*. 2016 Aug;69(8):672-6. doi: 10.1136/jclinpath-2015-203351. Epub 2016 May 6.
42. Berbers RM, van der Wal MM, van Montfrans JM, Ellerbroek PM, Dalm VASH, van Hagen PM, Leavis HL, van Wijk F. Chronically Activated T-cells Retain Their Inflammatory Properties in Common Variable Immunodeficiency. *J Clin Immunol*. 2021 Oct;41(7):1621-1632.
43. Serana F, Airò P, Chiarini M, Zanotti C, Scarsi M, Frassi M, Lougaris V, Plebani A, Caimi L, Imberti L. Thymic and bone marrow output in patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol*. 2011 Aug;31(4):540-9.
44. Hultberg J, Blixt E, Göransson R, Adolfsson J, Govender M, Larsson M, Nilsson-Augustinsson Å, Ernerudh J, Nyström S. In-depth immune profiling reveals advanced B- and T-cell differentiation to be associated with Th1-driven immune dysregulation in common variable immunodeficiency. *Clin Immunol*. 2023 Dec;257:109816.

45. ofighi Zavareh F, Mirshafiey A, Yazdani R, Keshtkar AA, Abolhassani H, Bagheri Y, Rezaei A, Delavari S, Rezaei N, Aghamohammadi A. Lymphocytes subsets in correlation with clinical profile in CVID patients without monogenic defects. *Expert Rev Clin Immunol*. 2021 Sep;17(9):1041-1051.
46. Cousin VN, Perez GF, Payne KJ, Voll RE, Rizzi M, Mueller CG, Warnatz K. Lymphoid stromal cells - potential implications for the pathogenesis of CVID. *Front Immunol*. 2023 Feb 17;14:1122905.
47. Yesillik S, Gupta S. Phenotypically defined subpopulations of circulating follicular helper T cells in common variable immunodeficiency. *Immun Inflamm Dis*. 2020 Sep;8(3):441-446.
48. Rezaei N, Wing JB, Aghamohammadi A, Carlring J, Lees A, Asgarian-Omran H, Pourpak Z, Sarrafnejad A, Kardar GA, Shahrestani T, Masoumi F, Zare A, Saghafi S, Sarrafzadeh S, Foster RA, Heath AW, Read RC. B-cell-T-cell activation and interaction in common variable immunodeficiency. *Hum Immunol*. 2010 Apr;71(4):355-62.
49. Fekrvand S, Khanmohammadi S, Abolhassani H, Yazdani R. B- and T-Cell Subset Abnormalities in Monogenic Common Variable Immunodeficiency. *Front Immunol*. 2022 Jun 15;13:912826.
50. Azizi G, Abolhassani H, Kiaee F, Tavakolinia N, Rafiemanesh H, Yazdani R, Mahdavian SA, Mohammadikhajehdehi S, Tavakol M, Ziaee V, Negahdari B, Mohammadi J, Mirshafiey A, Aghamohammadi A. Autoimmunity and its association with regulatory T cells and B cell subsets in patients with common variable immunodeficiency. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2018 Mar-Apr;46(2):127-135.
51. Cunningham-Rundles C, Radigan L. Deficient IL-12 and dendritic cell function in common variable immune deficiency. *Clin Immunol*. 2005 May;115(2):147-53.
52. Sharifi L, Tavakolinia N, Kiaee F, Rezaei N, Mohsenzadegan M, Azizi G, Yazdani R, Shariat M, Mirshafiey A, Aghamohammadi A. A Review on Defects of Dendritic Cells in Common Variable Immunodeficiency. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2017;17(2):100-113.
53. Bogaert DJ, Dullaers M, Lambrecht BN, Vermaelen KY, De Baere E, Haerynck F. Genes associated with common variable immunodeficiency: one diagnosis to rule them all? *J Med Genet*. 2016 Sep;53(9):575-90.
54. Chapel H. Common Variable Immunodeficiency Disorders (CVID) - Diagnoses of Exclusion, Especially Combined Immune Defects. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2016 Nov-Dec;4(6):1158-1159.
55. Peng XP, Caballero-Oteyza A, Grimbacher B. Common Variable Immunodeficiency: More Pathways than Roads to Rome. *Annu Rev Pathol*. 2023 Jan 24;18:283-310. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-031521-024229. Epub 2022 Oct 20.
56. Thaventhiran JED, Lango Allen H, Burren OS, Rae W, Greene D, Staples E, Zhang Z, Farmery JHR, Simeoni I, Rivers E, Maimaris J, Penkett CJ, Stephens J, Deevi SVV, Sanchis-Juan A, Gleadall NS, Thomas MJ, Sargur RB, Gordins P, Baxendale HE, Brown M, Tuijnenburg P, Worth A, Hanson S, Linger RJ, Buckland MS, Rayner-Matthews PJ, Gilmour KC, Samarghitean C, Seneviratne SL, Sansom DM, Lynch AG, Megy K, Ellinghaus E, Ellinghaus D, Jorgensen SF, Karlsen TH, Stirrups KE, Cutler AJ, Kumararatne DS, Chandra A,

- Edgar JDM, Herwadkar A, Cooper N, Grigoriadou S, Huissoon AP, Goddard S, Jolles S, Schuetz C, Boschann F; Primary Immunodeficiency Consortium for the NIHR Bioresource; Lyons PA, Hurles ME, Savic S, Burns SO, Kuijpers TW, Turro E, Ouwehand WH, Thrasher AJ, Smith KGC. Whole-genome sequencing of a sporadic primary immunodeficiency cohort. *Nature*. 2020 Jul;583(7814):90-95. doi: 10.1038/s41586-020-2265-1. Epub 2020 May 6. Erratum in: *Nature*. 2020 Aug;584(7819):E2.
57. Aggarwal V, Banday AZ, Jindal AK, Das J, Rawat A. Recent advances in elucidating the genetics of common variable immunodeficiency. *Genes Dis*. 2019 Oct 15;7(1):26-37.
  58. Ameratunga R, Edwards ESJ, Lehnert K, Leung E, Woon ST, Lea E, Allan C, Chan L, Steele R, Longhurst H, Bryant VL. The Rapidly Expanding Genetic Spectrum of Common Variable Immunodeficiency-Like Disorders. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2023 Jun;11(6):1646-1664.
  59. Kainulainen L, Suonpää J, Nikoskelainen J, Svedström E, Vuorinen T, Meurman O, Ruuskanen O. Bacteria and viruses in maxillary sinuses of patients with primary hypogammaglobulinemia. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2007 Jun;133(6):597-602.
  60. Agarwal S, Mayer L. Pathogenesis and treatment of gastrointestinal disease in antibody deficiency syndromes. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Oct;124(4):658-64.
  61. Wang J, Cunningham-Rundles C. Treatment and outcome of autoimmune hematologic disease in common variable immunodeficiency (CVID). *J Autoimmun*. 2005 Aug;25(1):57-62.
  62. Swierkot J, Lewandowicz-Uszynska A, Chlebicki A, Szmyrka-Kaczmarek M, Polańska B, Jankowski A, Szechinski J. Rheumatoid arthritis in a patient with common variable immunodeficiency: difficulty in diagnosis and therapy. *Clin Rheumatol*. 2006 Feb;25(1):92-4.
  63. Fernández-Castro M, Mellor-Pita S, Citores MJ, Muñoz P, Tutor-Ureta P, Silva L, Vargas JA, Yebra-Bango M, Andreu JL. Common variable immunodeficiency in systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum*. 2007 Feb;36(4):238-45.
  64. Quartuccio L, De Marchi G, Longhino S, Manfrè V, Rizzo MT, Gandolfo S, Tommasini A, De Vita S, Fox R. Shared Pathogenetic Features Between Common Variable Immunodeficiency and Sjögren's Syndrome: Clues for a Personalized Medicine. *Front Immunol*. 2021 Jul 12;12:703780.
  65. Jacob JG, Parratt JDE, Kiely CJ, Fernando SL. Common variable immunodeficiency in association with autoimmune encephalitis, collagenous gastritis, and colitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2021 Jul;127(1):137-138.
  66. Mormile I, Punziano A, Riolo CA, Granata F, Williams M, de Paulis A, Spadaro G, Rossi FW. Common Variable Immunodeficiency and Autoimmune Diseases: A Retrospective Study of 95 Adult Patients in a Single Tertiary Care Center. *Front Immunol*. 2021 Jul 5;12:652487.
  67. Mac TT, Castinetti F, Bar C, Julia S, Pasquet M, Romanet P, Saveanu A, Mougel G, Fauquier T, Jullien N, Barlier A, Reynaud R, Brue T. Deficient anterior pituitary with common variable immune deficiency (DAVID syndrome): a new case and literature reports. *J Neuroendocrinol*. 2023 Jun;35(6):e13287. doi: 10.1111/jne.13287. Epub 2023 Jun 15.

68. Yakaboski E, Fuleihan RL, Sullivan KE, Cunningham-Rundles C, Feuille E. Lymphoproliferative Disease in CVID: a Report of Types and Frequencies from a US Patient Registry. *J Clin Immunol*. 2020 Apr;40(3):524-530. doi: 10.1007/s10875-020-00769-8. Epub 2020 Mar 17.
69. Wong GK, Goldacker S, Winterhalter C, Grimbacher B, Chapel H, Lucas M, Alecsandru D, McEwen D, Quinti I, Martini H, Milito C, Schmidt RE, Ernst D, Espanol T, Vidaller A, Carbone J, Fernandez-Cruz E, Lougaris V, Plebani A, Kutukculer N, Gonzalez-Granado LI, Contreras R, Kiani-Alikhan S, Ibrahim MA, Litzman J, Jones A, Gaspar HB, Hammarstrom L, Baumann U, Warnatz K, Huissoon AP; Clinical Working Party of the European Society for Immunodeficiencies (ESID). Outcomes of splenectomy in patients with common variable immunodeficiency (CVID): a survey of 45 patients. *Clin Exp Immunol*. 2013 Apr;172(1):63-72. doi: 10.1111/cei.12039. Erratum in: *Clin Exp Immunol*. 2013 Jul;173(1):161. Milito, C [added].
70. Ho HE, Cunningham-Rundles C. Non-infectious Complications of Common Variable Immunodeficiency: Updated Clinical Spectrum, Sequelae, and Insights to Pathogenesis. *Front Immunol*. 2020 Feb 7;11:149. doi: 10.3389/fimmu.2020.00149.
71. Costagliola G, Consolini R. Lymphadenopathy at the crossroad between immunodeficiency and autoinflammation: An intriguing challenge. *Clin Exp Immunol*. 2021 Sep;205(3):288-305. doi: 10.1111/cei.13620. Epub 2021 Jun 20.
72. Morimoto Y, Routes JM. Granulomatous disease in common variable immunodeficiency. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2005 Sep;5(5):370-5.
73. Resnick ES, Moshier EL, Godbold JH, Cunningham-Rundles C. Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. *Blood*. 2012 Feb 16;119(7):1650-7.
74. Chapel H, Lucas M, Lee M, Bjorkander J, Webster D, Grimbacher B, Fieschi C, Thon V, Abedi MR, Hammarstrom L. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood*. 2008 Jul 15;112(2):277-86.
75. Dhalla F, da Silva SP, Lucas M, Travis S, Chapel H. Review of gastric cancer risk factors in patients with common variable immunodeficiency disorders, resulting in a proposal for a surveillance programme. *Clin Exp Immunol*. 2011 Jul;165(1):1-7.
76. Maglione PJ, Overbey JR, Cunningham-Rundles C. Progression of Common Variable Immunodeficiency Interstitial Lung Disease Accompanies Distinct Pulmonary and Laboratory Findings. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2015 Nov-Dec;3(6):941-50.
77. Maglione PJ, Overbey JR, Radigan L, Bagiella E, Cunningham-Rundles C. Pulmonary radiologic findings in common variable immunodeficiency: clinical and immunological correlations. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2014 Oct;113(4):452-9.
78. Quinti I, Soresina A, Spadaro G, Martino S, Donnanno S, Agostini C, Claudio P, Franco D, Maria Pesce A, Borghese F, Guerra A, Rondelli R, Plebani A; Italian Primary Immunodeficiency Network. Long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol*. 2007 May;27(3):308-16.
79. Schütz K, Alecsandru D, Grimbacher B, Haddock J, Bruining A, Driessen G, de Vries E, van Hagen PM, Hartmann I, Fraioli F, Milito C, Mitrevski M, Quinti I, Serra G, Kelleher P,

- Loebinger M, Litzman J, Postranecka V, Thon V, Babar J, Condliffe AM, Exley A, Kumararatne D, Screaton N, Jones A, Bondioni MP, Lougaris V, Plebani A, Soresina A, Sirignano C, Spadaro G, Galal N, Gonzalez-Granado LI, Dettmer S, Stirling R, Chapel H, Lucas M, Patel S, Farber CM, Meyts I, Banerjee AK, Hackett S, Hurst JR, Warnatz K, Gathmann B, Weidemann J, Berthold D, Baumann U; Chest CT in Antibody Deficiency Group. Correction to: Imaging of Bronchial Pathology in Antibody Deficiency: Data from the European Chest CT Group. *J Clin Immunol*. 2019 Feb;39(2):225-227.
80. Kellner ES, Fuleihan R, Cunningham-Rundles C; USIDNET Consortium; Wechsler JB. Cellular Defects in CVID Patients with Chronic Lung Disease in the USIDNET Registry. *J Clin Immunol*. 2019 Aug;39(6):569-576. doi: 10.1007/s10875-019-00657-w. Epub 2019 Jun 27.
  81. Weinberger T, Fuleihan R, Cunningham-Rundles C, Maglione PJ. Factors Beyond Lack of Antibody Govern Pulmonary Complications in Primary Antibody Deficiency. *J Clin Immunol*. 2019 May;39(4):440-447.
  82. Bates CA, Ellison MC, Lynch DA, Cool CD, Brown KK, Routes JM. Granulomatous-lymphocytic lung disease shortens survival in common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Aug;114(2):415-21.
  83. Park JH, Levinson AI. Granulomatous-lymphocytic interstitial lung disease (GLILD) in common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Immunol*. 2010 Feb;134(2):97-103.
  84. Dhalla F, Lochlainn DJM, Chapel H, Patel SY. Histology of Interstitial Lung Disease in Common Variable Immune Deficiency. *Front Immunol*. 2020 Nov 20;11:605187.
  85. Lima FMS, Toledo-Barros M, Alves VAF, Duarte MIS, Takakura C, Bernardes-Silva CF, Marinho AKBB, Grecco O, Kalil J, Kokron CM. Liver disease accompanied by enteropathy in common variable immunodeficiency: Common pathophysiological mechanisms. *Front Immunol*. 2022 Oct.
  86. Kalha I, Sellin JH. Common variable immunodeficiency and the gastrointestinal tract. *Curr Gastroenterol Rep*. 2004 Oct;6(5):377-83.
  87. Park MA, Li JT, Hagan JB, Maddox DE, Abraham RS. Common variable immunodeficiency: a new look at an old disease. *Lancet*. 2008 Aug 9;372(9637):489-502. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61199-X.
  88. Cunningham-Rundles C. The many faces of common variable immunodeficiency. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:301-5.
  89. Cinetto F, Scarpa R, Carrabba M, Firinu D, Lougaris V, Buso H, Garzi G, Gianese S, Soccodato V, Punziano A, Lagnese G, Tessarin G, Costanzo G, Landini N, Vio S, Bondioni MP, Consonni D, Marasco C, Del Giacco S, Rattazzi M, Vacca A, Plebani A, Fabio G, Spadaro G, Agostini C, Quinti I, Milito C. Granulomatous Lymphocytic Interstitial Lung Disease (GLILD) in Common Variable Immunodeficiency (CVID): A Multicenter Retrospective Study of Patients From Italian PID Referral Centers. *Front Immunol*. 2021 Mar 10;12:627423.
  90. Larsen BT, Smith ML, Tazelaar HD, Yi ES, Ryu JH, Churg A. GLILD Revisited: Pulmonary Pathology of Common Variable and Selective IgA Immunodeficiency. *Am J Surg Pathol*. 2020 Aug;44(8):1073-1081.

91. Hurst JR, Verma N, Lowe D, Baxendale HE, Jolles S, Kelleher P, Longhurst HJ, Patel SY, Renzoni EA, Sander CR, Avery GR, Babar JL, Buckland MS, Burns S, Egner W, Gompels MM, Gordins P, Haddock JA, Hart SP, Hayman GR, Herriot R, Hoyles RK, Huissoon AP, Jacob J, Nicholson AG, Rassl DM, Sargur RB, Savic S, Seneviratne SL, Sheaff M, Vaitla PM, Walters GI, Whitehouse JL, Wright PA, Condliffe AM. British Lung Foundation/United Kingdom Primary Immunodeficiency Network Consensus Statement on the Definition, Diagnosis, and Management of Granulomatous-Lymphocytic Interstitial Lung Disease in Common Variable Immunodeficiency Disorders. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2017 Jul-Aug;5(4):938-945.
92. Malphettes M, Gérard L, Carmagnat M, Mouillot G, Vince N, Boutboul D, Bérezné A, Nove-Josserand R, Lemoing V, Tetu L, Viallard JF, Bonnotte B, Pavic M, Haroche J, Larroche C, Brouet JC, Fermand JP, Rabian C, Fieschi C, Oksenhendler E; DEFI Study Group. Late-onset combined immune deficiency: a subset of common variable immunodeficiency with severe T cell defect. *Clin Infect Dis*. 2009 Nov 1;49(9):1329-38.
93. Cunningham-Rundles C. How I treat common variable immune deficiency. *Blood*. 2010 Jul 8;116(1):7-15. doi: 10.1182/blood-2010-01-254417. Epub 2010 Mar 23.
94. Fevang B. Treatment of inflammatory complications in common variable immunodeficiency (CVID): current concepts and future perspectives. *Expert Rev Clin Immunol*. 2023 Jun;19(6):627-638.
95. Milito C, Pulvirenti F, Cinetto F, Lougaris V, Soresina A, Pecoraro A, Vultaggio A, Carrabba M, Lassandro G, Plebani A, Spadaro G, Matucci A, Fabio G, Dellepiane RM, Martire B, Agostini C, Abeni D, Tabolli S, Quinti I. Double-blind, placebo-controlled, randomized trial on low-dose azithromycin prophylaxis in patients with primary antibody deficiencies. *J Allergy Clin Immunol*. 2019 Aug;144(2):584-593.e7.
96. Dorsey MJ, Wright NAM, Chaimowitz NS, Dávila Saldaña BJ, Miller H, Keller MD, Thakar MS, Shah AJ, Abu-Arja R, Andolina J, Aquino V, Barnum JL, Bednarski JJ, Bhatia M, Bonilla FA, Butte MJ, Bunin NJ, Chandra S, Chaudhury S, Chen K, Chong H, Cuvelier GDE, Dalal J, DeFelice ML, DeSantes KB, Forbes LR, Gillio A, Goldman F, Joshi AY, Kapoor N, Knutsen AP, Kobrynski L, Lieberman JA, Leiding JW, Oshrine B, Patel KP, Prockop S, Quigg TC, Quinones R, Schultz KR, Seroogy C, Shyr D, Siegel S, Smith AR, Torgerson TR, Vander Lugt MT, Yu LC, Cowan MJ, Buckley RH, Dvorak CC, Griffith LM, Haddad E, Kohn DB, Logan B, Notarangelo LD, Pai SY, Puck J, Pulsipher MA, Heimall J. Infections in Infants with SCID: Isolation, Infection Screening, and Prophylaxis in PIDTC Centers. *J Clin Immunol*. 2021 Jan;41(1):38-50. doi: 10.1007/s10875-020-00865-9. Epub 2020 Oct 2. Erratum in: *J Clin Immunol*. 2020 Dec 3.
97. Moschese V, Martire B, Soresina A, Chini L, Graziani S, Monteferrario E, Bacchetta R, Cancrini C, Fiorilli M, Gambineri E, Pession A, Pignata C, Quinti I, Rondelli R, Rossi P, Ugazio AG, Plebani A, Pietrogrande MC. Anti-infective prophylaxis for primary immunodeficiencies: what is done in Italian Primary Immunodeficiency Network centers (IPINet) and review of the literature. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2013 Oct-Dec;27(4):935-46.
98. National Center for Immunization and Respiratory Diseases. General recommendations on immunization --- recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep*. 2011 Jan 28;60(2):1-64.

99. Rubin LG, Levin MJ, Ljungman P, Davies EG, Avery R, Tomblyn M, Bousvaros A, Dhanireddy S, Sung L, Keyserling H, Kang I; Infectious Diseases Society of America. 2013 IDSA clinical practice guideline for vaccination of the immunocompromised host. *Clin Infect Dis*. 2014 Feb;58(3):e44-100. doi: 10.1093/cid/cit684. Epub 2013 Dec 4.
100. Bishop GA, Hostager BS. B lymphocyte activation by contact-mediated interactions with T lymphocytes. *Curr Opin Immunol*. 2001 Jun;13(3):278-85.
101. Lipsky PE, Attrep JF, Grammer AC, McIlraith MJ, Nishioka Y. Analysis of CD40-CD40 ligand interactions in the regulation of human B cell function. *Ann N Y Acad Sci*. 1997 Apr 5;815:372-83.
102. Garland SM, Brotherton JML, Moscicki AB, Kaufmann AM, Stanley M, Bhatla N, Sankaranarayanan R, de Sanjosé S, Palefsky JM; IPVS. HPV vaccination of immunocompromised hosts. *Papillomavirus Res*. 2017 Dec;4:35-38.
103. Wen L, Hanvanich M, Werner-Favre C, Brouwers N, Perrin LH, Zubler RH. Limiting dilution assay for human B cells based on their activation by mutant EL4 thymoma cells: total and antimalaria responder B cell frequencies. *Eur J Immunol*. 1987 Jun;17(6):887-92.
104. Lagoo A, Tseng CK, Sell S. Molecular signals in B cell activation. II. IL-2-mediated signals are required in late G1 for transition to S phase after ionomycin and PMA treatment. *Cell Immunol*. 1990 May;127(2):497-505. doi: 10.1016/0008-8749(90)90149-I.
105. Luo W, Conter L, Elsner RA, Smita S, Weisel F, Callahan D, Wu S, Chikina M, Shlomchik M. IL-21R signal reprogramming cooperates with CD40 and BCR signals to select and differentiate germinal center B cells. *Sci Immunol*. 2023 Feb 24;8(80):eadd1823.
106. Bernasconi NL, Onai N, Lanzavecchia A. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood*. 2003 Jun 1;101(11):4500-4.
107. Lollo C, de Moraes Vasconcelos D, Oliveira LMDS, Domingues R, Carvalho GC, Duarte AJS, Sato MN. Chemokine, cytokine and type I interferon production induced by Toll-like receptor activation in common variable immune deficiency. *Clin Immunol*. 2016 Aug;169:121-127.
108. Pinna D, Corti D, Jarrossay D, Sallusto F, Lanzavecchia A. Clonal dissection of the human memory B-cell repertoire following infection and vaccination. *Eur J Immunol*. 2009 May;39(5):1260-70.
109. Fillatreau S, Manz RA. Tolls for B cells. *Eur J Immunol*. 2006 Apr;36(4):798-801.
110. Jahnmatz M, Kesa G, Netterlid E, Buisman AM, Thorstensson R, Ahlborg N. Optimization of a human IgG B-cell ELISpot assay for the analysis of vaccine-induced B-cell responses. *J Immunol Methods*. 2013 May 31;391(1-2):50-9. doi: 10.1016/j.jim.2013.02.009. Epub 2013 Feb 27.
111. Karahan GE, Krop J, Wehmeier C, de Vaal YJH, Langerak-Langerak J, Roelen DL, Lardy NM, Bemelman FJ, Ten Berge IJM, Reinders MEJ, van Kooten C, Claas FHJ, Heidt S. An Easy and Sensitive Method to Profile the Antibody Specificities of HLA-specific Memory B Cells. *Transplantation*. 2019 Apr;103(4):716-723.

112. Karahan GE, de Vaal YJH, Krop J, Wehmeier C, Roelen DL, Claas FHJ, Heidt S. A Memory B Cell Crossmatch Assay for Quantification of Donor-Specific Memory B Cells in the Peripheral Blood of HLA-Immunized Individuals. *Am J Transplant*. 2017 Oct;17(10):2617-2626.
113. Karahan GE, Eikmans M, Anholts JD, Claas FH, Heidt S. Polyclonal B cell activation for accurate analysis of pre-existing antigen-specific memory B cells. *Clin Exp Immunol*. 2014 Jul;177(1):333-40.
114. Dennig D, Mecheri S, Bourhis JH, Hoffman MK. Interleukin-2 may enhance or inhibit antibody production by B cells depending on intracellular cAMP concentrations. *Immunology*. 1992 Oct;77(2):251-5.
115. Hipp N, Symington H, Pastoret C, Caron G, Monvoisin C, Tarte K, Fest T, Delaloy C. IL-2 imprints human naive B cell fate towards plasma cell through ERK/ELK1-mediated BACH2 repression. *Nat Commun*. 2017 Nov 13;8(1):1443.
116. Malek TR, Castro I. Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity*. 2010 Aug 27;33(2):153-65. doi: 10.1016/j.immuni.2010.08.004.
117. Herrero MJ. ABC de los «Toll-like receptors»: relación con el desarrollo y progresión de enfermedades autoinmunes. *SFER*. 2010 Apr 10;11(4):135-43.
118. Forsbach A, Nemorin JG, Montino C, Müller C, Samulowitz U, Vicari AP, Jurk M, Mutwiri GK, Krieg AM, Lipford GB, Vollmer J. Identification of RNA sequence motifs stimulating sequence-specific TLR8-dependent immune responses. *J Immunol*. 2008 Mar 15;180(6):3729-38.
119. R&D Systems, Inc. 2012. IL-2 Signaling Pathways. Bio-technie. <https://www.rndsystems.com/pathways/il2-signaling-pathways>.
120. Martínez-Espinoza I, Guerrero-Plata A. The Relevance of TLR8 in Viral Infections. *Pathogens*. 2022 Jan 22;11(2):134.
121. Fillatreau S, Manfroi B, Dörner T. Toll-like receptor signalling in B cells during systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol*. 2021 Feb;17(2):98-108.
122. Glaum MC, Narula S, Song D, Zheng Y, Anderson AL, Pletcher CH, Levinson AI. Toll-like receptor 7-induced naive human B-cell differentiation and immunoglobulin production. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Jan;123(1):224-230.e4.
123. Herrero M. ABC de los Toll-like receptors: relación con el desarrollo y progresión de enfermedades autoinmunes. *Semin Fund Esp Reumatol*. 2010;11(4):135–143.
124. Fisher D, Heymann D. Q&A: The novel coronavirus outbreak causing COVID-19. *BMC Med*. 2020 Feb 28;18(1):57.
125. Chams N, Chams S, Badran R, Shams A, Araji A, Raad M, Mukhopadhyay S, Stroberg E, Duval EJ, Barton LM, Hajj Hussein I. COVID-19: A Multidisciplinary Review. *Front Public Health*. 2020 Jul 29;8:383.

126. Wang MY, Zhao R, Gao LJ, Gao XF, Wang DP, Cao JM. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020 Nov 25;10:587269.
127. Rabaan AA, Al-Ahmed SH, Haque S, Sah R, Tiwari R, Malik YS, Dhama K, Yatoo MI, Bonilla-Aldana DK, Rodriguez-Morales AJ. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-COV: A comparative overview. *Infez Med.* 2020 Ahead Of Print Jun 1;28(2):174-184.
128. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Pöhlmann S. A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. *Mol Cell.* 2020 May 21;78(4):779-784.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2020.04.022. Epub 2020 May 1.
129. Shang J, Wan Y, Luo C, Ye G, Geng Q, Auerbach A, Li F. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020 May 26;117(21):11727-11734.
130. Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022 Jan;23(1):3-20.
131. Zhang Z, Nomura N, Muramoto Y, Ekimoto T, Uemura T, Liu K, Yui M, Kono N, Aoki J, Ikeguchi M, Noda T, Iwata S, Ohto U, Shimizu T. Structure of SARS-CoV-2 membrane protein essential for virus assembly. *Nat Commun.* 2022 Aug 5;13(1):4399.
132. Mu J, Xu J, Zhang L, Shu T, Wu D, Huang M, Ren Y, Li X, Geng Q, Xu Y, Qiu Y, Zhou X. SARS-CoV-2-encoded nucleocapsid protein acts as a viral suppressor of RNA interference in cells. *Sci China Life Sci.* 2020 Sep;63(9):1413-1416.
133. Bai Z, Cao Y, Liu W, Li J. The SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Its Role in Viral Structure, Biological Functions, and a Potential Target for Drug or Vaccine Mitigation. *Viruses.* 2021 Jun 10;13(6):1115.
134. Brochot E, Demey B, Touzé A, Belouzard S, Dubuisson J, Schmit JL, Duverlie G, Francois C, Castelain S, Helle F. Anti-spike, Anti-nucleocapsid and Neutralizing Antibodies in SARS-CoV-2 Inpatients and Asymptomatic Individuals. *Front Microbiol.* 2020 Oct 19;11:584251.
135. Lee YL, Liao CH, Liu PY, Cheng CY, Chung MY, Liu CE, Chang SY, Hsueh PR. Dynamics of anti-SARS-Cov-2 IgM and IgG antibodies among COVID-19 patients. *J Infect.* 2020 Aug;81(2):e55-e58.
136. Williams DM, Hornsby HR, Shehata OM, Brown R, Gallis M, Meardon N, Newman TAH, Plowright M, Zafred D, Shun-Shion ASM, Hodder AJ, Bliss D, Metcalfe A, Edgar JR, Gordon DE, Sayers JR, Nicklin MJ, Carroll M; PITCH Consortium; Collini PJ, Brown S, de Silva TI, Peden AA. Establishing SARS-CoV-2 membrane protein-specific antibodies as a valuable serological target via high-content microscopy. *iScience.* 2023 Jul 21;26(7):107056.
137. Mason RJ. Pathogenesis of COVID-19 from a cell biology perspective. *Eur Respir J.* 2020 Apr 16;55(4):2000607.
138. Sridhar S, Nicholls J. Pathophysiology of infection with SARS-CoV-2-What is known and what remains a mystery. *Respirology.* 2021 Jul;26(7):652-665.
139. Gorog DA, Storey RF, Gurbel PA, Tantry US, Berger JS, Chan MY, Duerschmied D, Smyth SS, Parker WAE, Ajjan RA, Vilahur G, Badimon L, Berg JMT, Cate HT, Peyvandi F, Wang TT, Becker RC. Current and novel biomarkers of thrombotic risk in COVID-19: a Consensus

Statement from the International COVID-19 Thrombosis Biomarkers Colloquium. *Nat Rev Cardiol.* 2022 Jul;19(7):475-495.

140. Becker RC. COVID-19-associated vasculitis and vasculopathy. *J Thromb Thrombolysis.* 2020 Oct;50(3):499-511.
141. Hu B, Huang S, Yin L. The cytokine storm and COVID-19. *J Med Virol.* 2021 Jan;93(1):250-256.
142. Organización Mundial de la salud: Manejo clínico de la COVID-19. Orientaciones provisionales. 2020 may. WHO/2019-nCoV/clinical/2020.5.
143. Lo MW, Kemper C, Woodruff TM. COVID-19: Complement, Coagulation, and Collateral Damage. *J Immunol.* 2020 Sep 15;205(6):1488-1495.
144. Gusev E, Sarapultsev A, Solomatina L, Chereshev V. SARS-CoV-2-Specific Immune Response and the Pathogenesis of COVID-19. *Int J Mol Sci.* 2022 Feb 2;23(3):1716.
145. Delavari S, Abolhassani H, Abolnezhadian F, Babaha F, Iranparast S, Ahanchian H, Moazzen N, Nabavi M, Arshi S, Fallahpour M, Bemanian MH, Shokri S, Momen T, Sadeghi-Shabestari M, Molatefi R, Shirkani A, Vosughimotlagh A, Safarirad M, Sharifzadeh M, Pashangzadeh S, Salami F, Shirmast P, Rezaei A, Moeini Shad T, Mohraz M, Rezaei N, Hammarström L, Yazdani R, Aghamohamamdi A. Impact of SARS-CoV-2 Pandemic on Patients with Primary Immunodeficiency. *J Clin Immunol.* 2021 Feb;41(2):345-355.
146. Meyts I, Buccioli G, Quinti I, Neven B, Fischer A, Seoane E, Lopez-Granados E, Gianelli C, Robles-Marhuenda A, Jeandel PY, Paillard C, Sankaran VG, Demirdag YY, Lougaris V, Aiuti A, Plebani A, Milito C, Dalm VA, Guevara-Hoyer K, Sánchez-Ramón S, Bezrodnik L, Barzaghi F, Gonzalez-Granado LI, Hayman GR, Uzel G, Mendonça LO, Agostini C, Spadaro G, Badolato R, Soresina A, Vermeulen F, Bosteels C, Lambrecht BN, Keller M, Mustillo PJ, Abraham RS, Gupta S, Ozen A, Karakoc-Aydiner E, Baris S, Freeman AF, Yamazaki-Nakashimada M, Scheffler-Mendoza S, Espinosa-Padilla S, Gennery AR, Jolles S, Espinosa Y, Poli MC, Fieschi C, Hauck F, Cunningham-Rundles C, Mahlaoui N; IUIS Committee of Inborn Errors of Immunity; Warnatz K, Sullivan KE, Tangye SG. Coronavirus disease 2019 in patients with inborn errors of immunity: An international study. *J Allergy Clin Immunol.* 2021 Feb;147(2):520-531.
147. SeyedAlinaghi S, Karimi A, Barzegary A, Mojdeganlou H, Vahedi F, Mirghaderi SP, Shobeiri P, Ramezani M, Yousefi Konjdar P, Mirzapour P, Tantuoyir MM, Mehraeen E, Dadras O, Voltarelli F. COVID-19 mortality in patients with immunodeficiency and its predictors: a systematic review. *Eur J Med Res.* 2022 Oct 8;27(1):195.
148. Cohen B, Rubinstein R, Gans MD, Deng L, Rubinstein A, Eisenberg R. COVID-19 infection in 10 common variable immunodeficiency patients in New York City. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2021 Jan;9(1):504-507.e1.
149. Ferenc T, Vilibić-Čavlek T. COMMON VARIABLE IMMUNODEFICIENCY: PREDISPOSING OR PROTECTIVE FACTOR FOR SEVERE COMPLICATIONS OF COVID-19? *Acta Clin Croat.* 2022 Mar;61(1):107-114.
150. Pulvirenti F, Cinetto F, Milito C, Bonanni L, Pesce AM, Leodori G, Garzi G, Miglionico M, Tabolli S, Quinti I. Health-Related Quality of Life in Common Variable Immunodeficiency

Italian Patients Switched to Remote Assistance During the COVID-19 Pandemic. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2020 Jun;8(6):1894-1899.e2.

151. Fiolet T, Kherabi Y, MacDonald CJ, 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 Feb;28(2):202-221.
152. Perez Navarro A, Pilkington V, Pepperrell T, Mirchandani M, Levi J, Hill A. Efficacy of Approved Versus Unapproved Vaccines for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection in Randomized Blinded Clinical Trials. *Open Forum Infect Dis*. 2022 Aug 22;9(9):ofac408.
153. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines - a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov*. 2018 Apr;17(4):261-279.
154. Kim J, Eygeris Y, Gupta M, Sahay G. Self-assembled mRNA vaccines. *Adv Drug Deliv Rev*. 2021 Mar;170:83-112.
155. Han X, Xu P, Ye Q. Analysis of COVID-19 vaccines: Types, thoughts, and application. *J Clin Lab Anal*. 2021 Sep;35(9):e23937.
156. Verbeke R, Lentacker I, De Smedt SC, Dewitte H. The dawn of mRNA vaccines: The COVID-19 case. *J Control Release*. 2021 May 10;333:511-520.
157. Tartof SY, Slezak JM, Fischer H, Hong V, Ackerson BK, Ranasinghe ON, Frankland TB, Ogun OA, Zamparo JM, Gray S, Valluri SR, Pan K, Angulo FJ, Jodar L, McLaughlin JM. Effectiveness of mRNA BNT162b2 COVID-19 vaccine up to 6 months in a large integrated health system in the USA: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2021 Oct 16;398(10309):1407-1416.
158. Vacunas y programa de vacunación del Ministerio de Sanidad (España). España, Ministerio de Sanidad. 2023 Dec 28.  
[https://www.sanidad.gob.es/areas/promocionPrevencion/vacunaciones/covid19/Actualizaciones\\_EstrategiaVacunacionCOVID-19.htm](https://www.sanidad.gob.es/areas/promocionPrevencion/vacunaciones/covid19/Actualizaciones_EstrategiaVacunacionCOVID-19.htm).
159. Goldacker S, Draeger R, Warnatz K, Huzly D, Salzer U, Thiel J, Eibel H, Schlesier M, Peter HH. Active vaccination in patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Immunol*. 2007 Sep;124(3):294-303.
160. van Assen S, Holvast A, Telgt DS, Benne CA, de Haan A, Westra J, Kallenberg CG, Bijl M. Patients with humoral primary immunodeficiency do not develop protective anti-influenza antibody titers after vaccination with trivalent subunit influenza vaccine. *Clin Immunol*. 2010 Aug;136(2):228-35.
161. Schlumberger M, Yvonnet B, Que HV, Chhem DB, Saliou P, Le Tu TC, Glaziou P. Résultats d'une enquête sérologique réalisée au Cambodge lors d'une vaccination antitétanique des adultes [Serological study carried out in Cambodia during a tetanus vaccination in adults]. *Bull Soc Pathol Exot*. 2008 Feb;101(1):36-42.
162. Hong R, Agrawal S, Gollapudi S, Gupta S. Impaired pneumovax-23-induced monocyte-derived cytokine production in patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol*. 2010 May;30(3):435-41.

163. Rezaei N, Siadat SD, Aghamohammadi A, Moin M, Pourpak Z, Norouzian D, Mobarakeh JI, Aghasadeghi MR, Nejati M, Read RC. Serum bactericidal antibody response 1 year after meningococcal polysaccharide vaccination of patients with common variable immunodeficiency. *Clin Vaccine Immunol*. 2010 Apr;17(4):524-8.
164. Chovancova Z, Vlkova M, Litzman J, Lokaj J, Thon V. Antibody forming cells and plasmablasts in peripheral blood in CVID patients after vaccination. *Vaccine*. 2011 May 31;29(24):4142-50.
165. Adam E, Church JA. Antibody levels to *Bordetella pertussis* and *Neisseria meningitidis* in immunodeficient patients receiving immunoglobulin replacement therapy. *J Clin Immunol*. 2015 Feb;35(2):213-7.
166. Hanitsch LG, Löbel M, Mieves JF, Bauer S, Babel N, Schweiger B, Wittke K, Grabowski P, Volk HD, Scheibenbogen C. Cellular and humoral influenza-specific immune response upon vaccination in patients with common variable immunodeficiency and unclassified antibody deficiency. *Vaccine*. 2016 May 5;34(21):2417-2423.
167. Sánchez-Ramón S, de Gracia J, García-Alonso AM, Rodríguez Molina JJ, Melero J, de Andrés A, García Ruiz de Morales JM, Ferreira A, Ocejo-Vinyals JG, Cid JJ, García Martínez JM, Lasheras T, Vargas ML, Gil-Herrera J, García Rodríguez MC, Castañer JL, González Granado LI, Allende LM, Soler-Palacin P, Herráiz L, López Hoyos M, Bellón JM, Silva G, Gurbindo DM, Carbone J, Rodríguez-Sáinz C, Matamoros N, Parker AR, Fernández-Cruz E; EMPATHY group. Multicenter study for the evaluation of the antibody response against salmonella typhi Vi vaccination (EMPATHY) for the diagnosis of Anti-polysaccharide antibody production deficiency in patients with primary immunodeficiency. *Clin Immunol*. 2016 Aug;169:80-84.
168. Kumarage J, Seneviratne SL, Senaratne V, Fernando A, Gunasekera K, Gunasena B, Gurugama P, Peiris S, Parker AR, Harding S, de Silva NR. The response to Typhi Vi vaccination is compromised in individuals with primary immunodeficiency. *Heliyon*. 2017 Jun 23;3(6):e00333.
169. Gardulf A, Abolhassani H, Gustafson R, Eriksson LE, Hammarström L. Predictive markers for humoral influenza vaccine response in patients with common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2018 Dec;142(6):1922-1931.e2.
170. Hagin D, Freund T, Navon M, Halperin T, Adir D, Marom R, Levi I, Benor S, Alcalay Y, Freund NT. Immunogenicity of Pfizer-BioNTech COVID-19 vaccine in patients with inborn errors of immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2021 Sep;148(3):739-749.
171. Luczkowiak J, Radreau P, Nguyen L, Labiod N, Lasala F, Veas F, Herbreteau CH, Delgado R. Potent Neutralizing Activity of Polyclonal Equine Antibodies Against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Variants of Concern. *J Infect Dis*. 2022 Dec 28;227(1):35-39.
172. Mueller SN, Rouse BT. Immune responses to viruses. *Clinical Immunology*. 2008:421–31.
173. Rouse BT, Sehrawat S. Immunity and immunopathology to viruses: what decides the outcome? *Nat Rev Immunol*. 2010 Jul;10(7):514-26.
174. Hao X, Li S, Chen L, Dong M, Wang J, Hu J, Gu M, Wang X, Hu S, Peng D, Liu X, Shang S. Establishing a Multicolor Flow Cytometry to Characterize Cellular Immune Response in

Chickens Following H7N9 Avian Influenza Virus Infection. *Viruses*. 2020 Dec 6;12(12):1396.

175. Le Bert N, Tan AT, Kunasegaran K, Tham CYL, Hafezi M, Chia A, Chng MHY, Lin M, Tan N, Linster M, Chia WN, Chen MI, Wang LF, Ooi EE, Kalimuddin S, Tambyah PA, Low JG, Tan YJ, Bertoletti A. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature*. 2020 Aug;584(7821):457-462.
176. Wik JA, Skålhegg BS. T Cell Metabolism in Infection. *Front Immunol*. 2022 Mar 14;13:840610.
177. Hao Q, Kundu S, Shetty S, Tucker TA, Idell S, Tang H. Inducible general knockout of Runx3 profoundly reduces pulmonary cytotoxic CD8+ T cells with minimal effect on outcomes in mice following influenza infection. *Front Immunol*. 2022 Oct 7;13:1011922.
178. Saeidi A, Buggert M, Che KF, Kong YY, Velu V, Larsson M, Shankar EM. Regulation of CD8+ T-cell cytotoxicity in HIV-1 infection. *Cell Immunol*. 2015 Nov-Dec;298(1-2):126-33.
179. Mongellaz C, Vicente R, Noroski LM, Noraz N, Courgnaud V, Chinen J, Faria E, Zimmermann VS, Taylor N. Combined immunodeficiency caused by pathogenic variants in the ZAP70 C-terminal SH2 domain. *Front Immunol*. 2023 May 29;14:1155883.
180. Cannons JL, Preite S, Kapnick SM, Uzel G, Schwartzberg PL. Genetic Defects in Phosphoinositide 3-Kinase  $\delta$  Influence CD8+ T Cell Survival, Differentiation, and Function. *Front Immunol*. 2018 Aug 2;9:1758.
181. Shah K, Al-Haidari A, Sun J, Kazi JU. T cell receptor (TCR) signaling in health and disease. *Signal Transduct Target Ther*. 2021 Dec 13;6(1):412.
182. Wooldridge L, van den Berg HA, Glick M, Gostick E, Laugel B, Hutchinson SL, Milicic A, Brenchley JM, Douek DC, Price DA, Sewell AK. Interaction between the CD8 coreceptor and major histocompatibility complex class I stabilizes T cell receptor-antigen complexes at the cell surface. *J Biol Chem*. 2005 Jul 29;280(30):27491-501.
183. Goldrath AW, Hogquist KA, Bevan MJ. CD8 lineage commitment in the absence of CD8. *Immunity*. 1997 May;6(5):633-42.
184. Zamoyska R. The CD8 coreceptor revisited: one chain good, two chains better. *Immunity*. 1994 Jul;1(4):243-6. doi: 10.1016/1074-7613(94)90075-2.
185. Cole DK, Gao GF. CD8: adhesion molecule, co-receptor and immuno-modulator. *Cell Mol Immunol*. 2004 Apr;1(2):81-8.
186. Dumontet E, Osman J, Guillemont-Lambert N, Cros G, Moshous D, Picard C. Recurrent Respiratory Infections Revealing CD8 $\alpha$  Deficiency. *J Clin Immunol*. 2015 Nov;35(8):692-5.
187. van Leeuwen EM, de Bree GJ, ten Berge IJ, van Lier RA. Human virus-specific CD8+ T cells: diversity specialists. *Immunol Rev*. 2006 Jun;211:225-35.
188. Kawasaki T, Ikegawa M, Yunoki K, Otani H, Ori D, Ishii KJ, Kuroda E, Takamura S, Kitabatake M, Ito T, Isotani A, Kawai T. Alveolar macrophages instruct CD8+ T cell expansion by antigen cross-presentation in lung. *Cell Rep*. 2022 Dec 13;41(11):111828.

189. Kemming J, Gundlach S, Panning M, Huzly D, Huang J, Lütgehetmann M, Pischke S, Schulze Zur Wiesch J, Emmerich F, Llewellyn-Lacey S, Price DA, Tanriver Y, Warnatz K, Boettler T, Thimme R, Hofmann M, Fischer N, Neumann-Haefelin C. Mechanisms of CD8+ T-cell failure in chronic hepatitis E virus infection. *J Hepatol.* 2022 Oct;77(4):978-990.
190. Bernardo I, Mancebo E, Aguiló I, Anel A, Allende LM, Guerra-Vales JM, Ruiz-Contreras J, Serrano A, Talayero P, de la Calle O, Gonzalez-Santesteban C, Paz-Artal E. Phenotypic and functional evaluation of CD3+CD4-CD8- T cells in human CD8 immunodeficiency. *Haematologica.* 2011 Aug;96(8):1195-203.
191. Hsieh CL, Goldsmith JA, Schaub JM, DiVenere AM, Kuo HC, Javanmardi K, Le KC, Wrapp D, Lee AG, Liu Y, Chou CW, Byrne PO, Hjorth CK, Johnson NV, Ludes-Meyers J, Nguyen AW, Park J, Wang N, Amengor D, Lavinder JJ, Ippolito GC, Maynard JA, Finkelstein IJ, McLellan JS. Structure-based design of prefusion-stabilized SARS-CoV-2 spikes. *Science.* 2020 Sep 18;369(6510):1501-1505.
192. Battles MB, Más V, Olmedillas E, Cano O, Vázquez M, Rodríguez L, Melero JA, McLellan JS. Structure and immunogenicity of pre-fusion-stabilized human metapneumovirus F glycoprotein. *Nat Commun.* 2017 Nov 16;8(1):1528.
193. Almendro-Vázquez P, Laguna-Goya R, Ruiz-Ruigomez M, Utrero-Rico A, Lalueza A, Maestro de la Calle G, Delgado P, Perez-Ordoño L, Muro E, Vila J, Zamarron I, Moreno-Batanero M, Chivite-Lacaba M, Gil-Etayo FJ, Martín-Higuera C, Meléndez-Carmona MÁ, Lumbreras C, Arellano I, Alarcon B, Allende LM, Aguado JM, Paz-Artal E. Longitudinal dynamics of SARS-CoV-2-specific cellular and humoral immunity after natural infection or BNT162b2 vaccination. *PLoS Pathog.* 2021 Dec 28;17(12):e1010211.
194. Park LM, Lannigan J, Jaimes MC. OMIP-069: Forty-Color Full Spectrum Flow Cytometry Panel for Deep Immunophenotyping of Major Cell Subsets in Human Peripheral Blood. *Cytometry A.* 2020 Oct;97(10):1044-1051.
195. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013 Jan 1;29(1):15-21.
196. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics.* 2015 Jan 15;31(2):166-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btu638. Epub 2014 Sep 25.
197. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550.
198. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Oct 25;102(43):15545-50.
199. Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, Cunningham-Rundles C, Franco JL, Holland SM, Klein C, Morio T, Oksenhendler E, Picard C, Puel A, Puck J, Seppänen MRJ, Somech R, Su HC, Sullivan KE, Torgerson TR, Meyts I. Human Inborn Errors of Immunity: 2022 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol.* 2022 Oct;42(7):1473-1507.

200. Hargreaves CE, Salatino S, Sasson SC, Charlesworth JEG, Bateman E, Patel AM, Anzilotti C, Broxholme J, Knight JC, Patel SY. Decreased ATM Function Causes Delayed DNA Repair and Apoptosis in Common Variable Immunodeficiency Disorders. *J Clin Immunol.* 2021 Aug;41(6):1315-1330.
201. Pulvirenti F, Zuntini R, Milito C, Specchia F, Spadaro G, Danieli MG, Pession A, Quinti I, Ferrari S. Clinical Associations of Biallelic and Monoallelic TNFRSF13B Variants in Italian Primary Antibody Deficiency Syndromes. *J Immunol Res.* 2016;2016:8390356.
202. de la Calle-Martin O, Hernandez M, Ordi J, Casamitjana N, Arostegui JI, Caragol I, Ferrando M, Labrador M, Rodriguez-Sanchez JL, Espanol T. Familial CD8 deficiency due to a mutation in the CD8 alpha gene. *J Clin Invest.* 2001 Jul;108(1):117-23.
203. Luczkowiak J, Labiod N, Rivas G, Rolo M, Lasala F, Lora-Tamayo J, Mancheno-Losa M, Rial D, Pérez-Rivilla A, Folgueira MD, Delgado R. Prime-Boost Vaccination With BNT162b2 Induces High Neutralizing Activity Against SARS-CoV-2 Variants in Naïve and COVID-19-Convalescent Individuals. *Open Forum Infect Dis.* 2021 Sep 24;8(10):ofab468.
204. ESTRATEGIA DE VIGILANCIA Y CONTROL FRENTE A COVID-19 TRAS LA FASE AGUDA DE LA PANDEMIA. España, Ministerio de Sanidad. 2023 Dec 28. [https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/Nueva\\_estrategia\\_vigilancia\\_y\\_control.pdf](https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/Nueva_estrategia_vigilancia_y_control.pdf).
205. Bossen C, Schneider P. BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling. *Semin Immunol.* 2006 Oct;18(5):263-75.
206. Lucas CL, Chandra A, Nejentsev S, Condliffe AM, Okkenhaug K. PI3K $\delta$  and primary immunodeficiencies. *Nat Rev Immunol.* 2016 Nov;16(11):702-714.
207. Alkhairy OK, Rezaei N, Graham RR, Abolhassani H, Borte S, Hultenby K, Wu C, Aghamohammadi A, Williams DA, Behrens TW, Hammarström L, Pan-Hammarström Q. RAC2 loss-of-function mutation in 2 siblings with characteristics of common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2015 May;135(5):1380-4.e1-5.
208. Stuchlý J, Kanderová V, Vlková M, Heřmanová I, Slámová L, Pelák O, Taraldsrud E, Jílek D, Králíčková P, Fevang B, Trková M, Hrušák O, Froňková E, Šedivá A, Litzman J, Kalina T. Common Variable Immunodeficiency patients with a phenotypic profile of immunosenescence present with thrombocytopenia. *Sci Rep.* 2017 Jan 5;7:39710. doi: 10.1038/srep39710.
209. Del Pino-Molina L, Rodríguez-Ubreva J, Torres Canizales J, Coronel-Díaz M, Kulis M, Martín-Subero JI, van der Burg M, Ballestar E, López-Granados E. Impaired CpG Demethylation in Common Variable Immunodeficiency Associates With B Cell Phenotype and Proliferation Rate. *Front Immunol.* 2019 Apr 24;10:878.
210. Chapel H, Lucas M, Lee M, Bjorkander J, Webster D, Grimbacher B, Fieschi C, Thon V, Abedi MR, Hammarstrom L. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood.* 2008 Jul 15;112(2):277-86.
211. Salzer U, Chapel HM, Webster AD, Pan-Hammarström Q, Schmitt-Graeff A, Schlesier M, Peter HH, Rockstroh JK, Schneider P, Schäffer AA, Hammarström L, Grimbacher B. Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nat Genet.* 2005 Aug;37(8):820-8.

212. Martínez-Pomar N, Detková D, Arostegui JI, Alvarez A, Soler-Palacín P, Vidaller A, Espanol T, Sampalo A, de Gracia J, Hernandez M, Yagüe J, Matamoros N. Role of TNFRSF13B variants in patients with common variable immunodeficiency. *Blood*. 2009 Sep 24;114(13):2846-8.
213. Salzer U, Grimbacher B. TACI deficiency - a complex system out of balance. *Curr Opin Immunol*. 2021 Aug;71:81-88.
214. Cascalho M, Platt JL. TNFRSF13B Diversification Fueled by B Cell Responses to Environmental Challenges-A Hypothesis. *Front Immunol*. 2021 Feb 17;12:634544.
215. Squire J, Joshi A. Seroconversion after coronavirus disease 2019 vaccination in patients with immune deficiency. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2021 Sep;127(3):383-384.
216. Friedmann D, Goldacker S, Peter HH, Warnatz K. Preserved Cellular Immunity Upon Influenza Vaccination in Most Patients with Common Variable Immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2020 Jul-Aug;8(7):2332-2340.e5.
217. Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, Strålin K, Gorin JB, Olsson A, Llewellyn-Lacey S, Kamal H, Bogdanovic G, Muschiol S, Wullimann DJ, Kammann T, Emgård J, Parrot T, Folkesson E; Karolinska COVID-19 Study Group; Rooyackers O, Eriksson LI, Henter JI, Sönnernborg A, Allander T, Albert J, Nielsen M, Klingström J, Gredmark-Russ S, Björkström NK, Sandberg JK, Price DA, Ljunggren HG, Aleman S, Buggert M. Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell*. 2020 Oct 1;183(1):158-168.e14.
218. Romero C, Díez JM, Gajardo R. Anti-SARS-CoV-2 antibodies in healthy donor plasma pools and IVIG products. *Lancet Infect Dis*. 2021 Jun;21(6):765-766.
219. Rezaei N, Aghamohammadi A, Siadat SD, Moin M, Pourpak Z, Nejati M, Ahmadi H, Kamali S, Norouzian D, Tabaraei B, Read RC. Serum bactericidal antibody responses to meningococcal polysaccharide vaccination as a basis for clinical classification of common variable immunodeficiency. *Clin Vaccine Immunol*. 2008 Apr;15(4):607-11.
220. Sette A, Crotty S. Immunological memory to SARS-CoV-2 infection and COVID-19 vaccines. *Immunol Rev*. 2022 Sep;310(1):27-46.
221. Terreri S, Piano Mortari E, Vinci MR, Russo C, Alteri C, Albano C, Colavita F, Gramigna G, Agrati C, Linardos G, Coltella L, Colagrossi L, Deriu G, Ciofi Degli Atti M, Rizzo C, Scarsella M, Brugaletta R, Camisa V, Santoro A, Roscilli G, Pavoni E, Muzi A, Magnavita N, Scutari R, Villani A, Raponi M, Locatelli F, Perno CF, Zaffina S, Carsetti R. Persistent B cell memory after SARS-CoV-2 vaccination is functional during breakthrough infections. *Cell Host Microbe*. 2022 Mar 9;30(3):400-408.e4.
222. Kudryavtsev IV, Arsentieva NA, Korobova ZR, Isakov DV, Rubinstein AA, Batsunov OK, Khamitova IV, Kuznetsova RN, Savin TV, Akisheva TV, Stanevich OV, Lebedeva AA, Vorobyov EA, Vorobyova SV, Kulikov AN, Sharapova MA, Pevtsov DE, Totolian AA. Heterogenous CD8+ T Cell Maturation and «Polarization» in Acute and Convalescent COVID-19 Patients. *Viruses*. 2022 Aug 28;14(9):1906.
223. Martin-Ruiz C, Hoffmann J, Shmeleva E, Zglinicki TV, Richardson G, Draganova L, Redgrave R, Collerton J, Arthur H, Keavney B, Spyridopoulos I. CMV-independent increase in CD27-

- CD28+ CD8+ EMRA T cells is inversely related to mortality in octogenarians. *NPJ Aging Mech Dis.* 2020 Jan 21;6:3.
224. Cho JH, Kim HO, Kim KS, Yang DH, Surh CD, Sprent J. Unique features of naive CD8+ T cell activation by IL-2. *J Immunol.* 2013 Dec 1;191(11):5559-73.
225. Cho JH, Boyman O, Kim HO, Hahm B, Rubinstein MP, Ramsey C, Kim DM, Surh CD, Sprent J. An intense form of homeostatic proliferation of naive CD8+ cells driven by IL-2. *J Exp Med.* 2007 Aug 6;204(8):1787-801.
226. Cho JH, Kim HO, Surh CD, Sprent J. T cell receptor-dependent regulation of lipid rafts controls naive CD8+ T cell homeostasis. *Immunity.* 2010 Feb 26;32(2):214-26.
227. Kalia V, Sarkar S. Regulation of Effector and Memory CD8 T Cell Differentiation by IL-2-A Balancing Act. *Front Immunol.* 2018 Dec 20;9:2987.
228. Weltevrede M, Eilers R, de Melker HE, van Baarle D. Cytomegalovirus persistence and T-cell immunosenescence in people aged fifty and older: A systematic review. *Exp Gerontol.* 2016 May;77:87-95.
229. Díaz L, Méndez-Lagares G, Correa-Rocha R, Pacheco YM, Ferrando-Martínez S, Ruiz-Mateos E, del Mar del Pozo-Balado M, León JA, Gurbindo MD, Isabel de José M, Leal M, Muñoz-Fernández MÁ. Detectable viral load aggravates immunosenescence features of CD8 T-cell subsets in vertically HIV-infected children. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2012 Aug 15;60(5):447-54.
230. Bikker A, Kruize AA, van der Wurff-Jacobs KM, Peters RP, Kleinjan M, Redegeld F, de Jager W, Lafeber FP, van Roon JA. Interleukin-7 and Toll-like receptor 7 induce synergistic B cell and T cell activation. *PLoS One.* 2014 Apr 16;9(4):e94756.
231. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdörfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol.* 2002 May 1;168(9):4531-7.
232. Liao W, Lin JX, Wang L, Li P, Leonard WJ. Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages. *Nat Immunol.* 2011 Jun;12(6):551-9. doi: 10.1038/ni.2030. Epub 2011 Apr 24. Erratum in: *Nat Immunol.* 2011 Jun;12(6): 2 p following 559.
233. Ye J, Wang Y, Liu X, Li L, Opejin A, Hsueh EC, Luo H, Wang T, Hawiger D, Peng G. TLR7 Signaling Regulates Th17 Cells and Autoimmunity: Novel Potential for Autoimmune Therapy. *J Immunol.* 2017 Aug 1;199(3):941-954.
234. Meås HZ, Haug M, Beckwith MS, Louet C, Ryan L, Hu Z, Landskron J, Nordbø SA, Taskén K, Yin H, Damås JK, Flo TH. Sensing of HIV-1 by TLR8 activates human T cells and reverses latency. *Nat Commun.* 2020 Jan 9;11(1):147.
235. de Marcken M, Dhaliwal K, Danielsen AC, Gautron AS, Dominguez-Villar M. TLR7 and TLR8 activate distinct pathways in monocytes during RNA virus infection. *Sci Signal.* 2019 Oct 29;12(605):eaaw1347.

236. Ayithan N, Tang L, Tan SK, Chen D, Wallin JJ, Fletcher SP, Kottlil S, Poonia B. Follicular Helper T (TFH) Cell Targeting by TLR8 Signaling For Improving HBsAg-Specific B Cell Response In Chronic Hepatitis B Patients. *Front Immunol.* 2021 Aug 26;12:735913.
237. Song Z, Yuan W, Zheng L, Wang X, Kuchroo VK, Mohib K, Rothstein DM. B Cell IL-4 Drives Th2 Responses In Vivo, Ameliorates Allograft Rejection, and Promotes Allergic Airway Disease. *Front Immunol.* 2022 Mar 14;13:762390.
238. Jacobi AM, Reiter K, Mackay M, Aranow C, Hiepe F, Radbruch A, Hansen A, Burmester GR, Diamond B, Lipsky PE, Dörner T. Activated memory B cell subsets correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus: delineation by expression of CD27, IgD, and CD95. *Arthritis Rheum.* 2008 Jun;58(6):1762-73.
239. Nakayamada S, Kubo S, Yoshikawa M, Miyazaki Y, Yunoue N, Iwata S, Miyagawa I, Hirata S, Nakano K, Saito K, Tanaka Y. Differential effects of biological DMARDs on peripheral immune cell phenotypes in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2018 Jan 1;57(1):164-174.
240. Min YG, Park C, Kwon YN, Shin JY, Sung JJ, Hong YH. B Cell Immunophenotyping and Transcriptional Profiles of Memory B Cells in Patients with Myasthenia Gravis. *Exp Neurobiol.* 2019 Dec 31;28(6):720-726.
241. Centuori SM, Gomes CJ, Kim SS, Putnam CW, Larsen BT, Garland LL, Mount DW, Martinez JD. Double-negative (CD27-IgD-) B cells are expanded in NSCLC and inversely correlate with affinity-matured B cell populations. *J Transl Med.* 2018 Feb 15;16(1):30.
242. Vodjgani M, Aghamohammadi A, Samadi M, Moin M, Hadjati J, Mirahmadian M, Parvaneh N, Salavati A, Abdollahzade S, Rezaei N, Srrafnejad A. Analysis of class-switched memory B cells in patients with common variable immunodeficiency and its clinical implications. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2007;17(5):321-8.
243. Tofighi Zavareh F, Mirshafiey A, Yazdani R, Keshtkar AA, Abolhassani H, Mahdavian SA, Habibi S, Sohani M, Rezaei N, Aghamohammadi A. Immunophenotypic and functional analysis of lymphocyte subsets in common variable immunodeficiency patients without monogenic defects. *Scand J Immunol.* 2022 Jul;96(1):e13164.
244. Piedra-Quintero ZL, Wilson Z, Nava P, Guerau-de-Arellano M. CD38: An Immunomodulatory Molecule in Inflammation and Autoimmunity. *Front Immunol.* 2020 Nov 30;11:597959.
245. Frasca D, Diaz A, Romero M, Blomberg BB. Human peripheral late/exhausted memory B cells express a senescent-associated secretory phenotype and preferentially utilize metabolic signaling pathways. *Exp Gerontol.* 2017 Jan;87(Pt A):113-120.
246. Rinaldi S, Pallikkuth S, George VK, de Armas LR, Pahwa R, Sanchez CM, Pallin MF, Pan L, Cotugno N, Dickinson G, Rodriguez A, Fischl M, Alcaide M, Gonzalez L, Palma P, Pahwa S. Paradoxical aging in HIV: immune senescence of B Cells is most prominent in young age. *Aging (Albany NY).* 2017 Apr;9(4):1307-1325.
247. Seda V, Mraz M. B-cell receptor signalling and its crosstalk with other pathways in normal and malignant cells. *Eur J Haematol.* 2015 Mar;94(3):193-205.

248. Khoder A, Alsuliman A, Basar R, Sobieski C, Kondo K, Alousi AM, Szydlo R, Muftuoglu M, Shaim H, Apperley JF, Gokdemir E, Cooper N, Mehta RS, Marin D, Champlin R, Shpall E, Rezvani K. Evidence for B Cell Exhaustion in Chronic Graft-versus-Host Disease. *Front Immunol.* 2018 Jan 12;8:1937.
249. Grimsholm O, Piano Mortari E, Davydov AN, Shugay M, Obratzsova AS, Bocci C, Marasco E, Marcellini V, Aranburu A, Farroni C, Silvestris DA, Cristofolletti C, Giorda E, Scarsella M, Cascioli S, Barresi S, Lougaris V, Plebani A, Cancrini C, Finocchi A, Moschese V, Valentini D, Vallone C, Signore F, de Vincentiis G, Zaffina S, Russo G, Gallo A, Locatelli F, Tozzi AE, Tartaglia M, Chudakov DM, Carsetti R. The Interplay between CD27<sup>dull</sup> and CD27<sup>bright</sup> B Cells Ensures the Flexibility, Stability, and Resilience of Human B Cell Memory. *Cell Rep.* 2020 Mar 3;30(9):2963-2977.e6.
250. Weisel NM, Joachim SM, Smita S, Callahan D, Elsner RA, Conter LJ, Chikina M, Farber DL, Weisel FJ, Shlomchik MJ. Surface phenotypes of naive and memory B cells in mouse and human tissues. *Nat Immunol.* 2022 Jan;23(1):135-145.
251. Cancro MP, Tomayko MM. Memory B cells and plasma cells: The differentiative continuum of humoral immunity. *Immunol Rev.* 2021 Sep;303(1):72-82.
252. Han BK, Olsen NJ, Bottaro A. The CD27-CD70 pathway and pathogenesis of autoimmune disease. *Semin Arthritis Rheum.* 2016 Feb;45(4):496-501.
253. Strohmeier V, Andrieux G, Unger S, Pascual-Reguant A, Klocperk A, Seidl M, Marques OC, Eckert M, Gräwe K, Shabani M, von Spee-Mayer C, Friedmann D, Harder I, Gutenberger S, Keller B, Proietti M, Bulashevskaya A, Grimbacher B, Provaznik J, Benes V, Goldacker S, Schell C, Hauser AE, Boerries M, Hasselblatt P, Warnatz K. Interferon-Driven Immune Dysregulation in Common Variable Immunodeficiency-Associated Villous Atrophy and Norovirus Infection. *J Clin Immunol.* 2023 Feb;43(2):371-390.
254. Park J, Munagala I, Xu H, Blankenship D, Maffucci P, Chaussabel D, Banchereau J, Pascual V, Cunningham-Rundles C. Interferon signature in the blood in inflammatory common variable immune deficiency. *PLoS One.* 2013 Sep 17;8(9):e74893.
255. Chen L, Grabowski KA, Xin JP, Coleman J, Huang Z, Espiritu B, Alkan S, Xie HB, Zhu Y, White FA, Clancy J Jr, Huang H. IL-4 induces differentiation and expansion of Th2 cytokine-producing eosinophils. *J Immunol.* 2004 Feb 15;172(4):2059-66.
256. Wurster AL, Rodgers VL, Satoskar AR, Whitters MJ, Young DA, Collins M, Grusby MJ. Interleukin 21 is a T helper (Th) cell 2 cytokine that specifically inhibits the differentiation of naive Th cells into interferon gamma-producing Th1 cells. *J Exp Med.* 2002 Oct 7;196(7):969-77.
257. Belnoue E, Pihlgren M, McGaha TL, Tougne C, Rochat AF, Bossen C, Schneider P, Huard B, Lambert PH, Siegrist CA. APRIL is critical for plasmablast survival in the bone marrow and poorly expressed by early-life bone marrow stromal cells. *Blood.* 2008 Mar 1;111(5):2755-64.
258. Vendel AC, Calemene-Fenaux J, Izrael-Tomasevic A, Chauhan V, Arnott D, Eaton DL. B and T lymphocyte attenuator regulates B cell receptor signaling by targeting Syk and BLNK. *J Immunol.* 2009 Feb 1;182(3):1509-17.

259. Thibult ML, Rivals JP, Mamessier E, Gertner-Dardenne J, Pastor S, Speiser DE, Derré L, Olive D. CpG-ODN-induced sustained expression of BTLA mediating selective inhibition of human B cells. *J Mol Med (Berl)*. 2013 Feb;91(2):195-205.
260. Rydzynski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM, Grifoni A, Hastie KM, Weiskopf D, Belanger S, Abbott RK, Kim C, Choi J, Kato Y, Crotty EG, Kim C, Rawlings SA, Mateus J, Tse LPV, Frazier A, Baric R, Peters B, Greenbaum J, Ollmann Saphire E, Smith DM, Sette A, Crotty S. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell*. 2020 Nov 12;183(4):996-1012.e19.
261. Antoun E, Peng Y, Dong T. Vaccine-induced CD8+ T cells are key to protection from SARS-CoV-2. *Nat Immunol*. 2023 Oct;24(10):1594-1596.



## 11.- Artículos

Los resultados de esta tesis han sido incluidos en las siguientes publicaciones:

1.- Arroyo-Sánchez D, Cabrera-Marante O, Laguna-Goya R, Almendro-Vázquez P, Carretero O, Gil-Etayo FJ, Suárez-Fernández P, Pérez-Romero P, Rodríguez de Frías E, Serrano A, Allende LM, Pleguezuelo D, Paz-Artal E. Immunogenicity of Anti-SARS-CoV-2 Vaccines in Common Variable Immunodeficiency. *J Clin Immunol.* 2022 Feb;42(2):240-252.

2.- Arroyo-Sánchez D, Luczkowiak J, Delgado R, Cabrera-Marante O, Paz-Artal E. Immune Response Against SARS-CoV-2 Infection and Vaccination in a CD8 $\alpha$ -Deficient Patient. *J Clin Immunol.* 2023 Aug;43(6):1072-1074.

## 12.- Anexo I

Genes incluidos en el panel de NGS:

ABCC8; ACD; ACP5; ACTB; ADA; ADA2; ADAM17; ADAR; AICDA; AIRE; ALDOB; ALPI; AP1S3; AP3B1; AP3D1; APPL1; ARHGEF1; ARPC1B; ATG16L1; ATM; ATP6AP1; B2M; BACH2; BCL10; BCL11B; BLK; BLM; BLNK; BTK; C1QA; C1QB; C1QC; C1R; C1S; C2orf69; C3; C4A; C4B; C5; C6; C7; C8A; C8B; C8G; C9; CARD11; CARD14; CARD8; CARD9C ARMIL2; CASP10; CASP8; CCBE1; CD247; CD27; CD28; CD3D; CD3E; CD3G; CD40; CD40LG; CD46; CD55; CD59; CD70; CD79A; CD79B; CD81; CD8A; CDC42; CDCA7; CEL; CFB; CFD; CFH; CFHR1; CFHR2; CFHR3; CFHR4; CFHR5; CFI; CFP; CFTR; CHD7; CIB1; CIITA; CLCN7; CLPB; COPA; CORO1A; CR2; CSF2RA; CSF2RB; CSF3R; CTC1; CTLA4; CTNBL1; CTPS1; CTSC; CXCR4; CYBA; CYBB; DBF4; DBR1; DCLRE1C; DDX58; DEF6; DMD; DNAJC21; DNASE1L3; DNASE2; DNMT3B; DOCK2; DOCK8; EFL1; ELANE; EPG5; ERBIN; ERCC6L2; EXTL3; FAAP24; FADD; FAS; FASLG; FAT4; FCGR3A; FCHO1; FCN3; FERMT1; FERMT3; FNIP1; FOXP1; FOXP3; FPR1; G6PC3; G6PD; GCK; GFI1; GINS1; HAVCR2; HAX1; HELLS; HNF4A; HYOU1; ICOS; ICOSLG; IFIH1; IFNAR1; IFNAR2; IFNG; IFNGR1; IFNGR2; IGHM; IGKC; IGLL1; IGLL2; IGLL3; IKBKB; IKBKG; IKZF1; IKZF3; IL10; IL10RA; IL10RB; IL12B; IL12RB1; IL12RB2; IL17F; IL17RA; IL17RC; IL18BP; IL1RN; IL21; IL21R; IL23R; IL2RA; IL2RB; IL2RG; IL36RN; IL6R; IL6ST; IL7; IL7R; INO80; INS; IRAK1; IRAK4; IRF2BP2; IRF3; IRF4; IRF7; IRF8; IRF9; IRGM; ISG15; ITCH; ITGAM; ITGB2; ITK; ITPKB; ITPR3; JAGN1; JAK1; KCNJ11; KLF11; KMT2A; KMT2D; KRAS; LAMTOR2; LAT; LCK; LCP2; LIG1; LIG4; LPIN2; LRBA; LRRC8A; LSM11; LYN; LYST; MAGT1; MAN2B2; MAP1LC3B2; MAP3K14;

MAPK8; MASP2; MCM10; MCM4; MLH3; MRTFA; MSH3; MSH6; MSN; MTHFD1; MVK; MYD88; MYSM1; NBAS; NBN; NCF1; NCF2; NCF4; NCKAP1L; NEUROD1; NFAT5; NFE2L2; NFKB1; NFKB2; NFKBIA; NHEJ1; NHP2; NLRC4; NLRP1; NLRP12; NLRP3; NLRP7; NOD2; NOP10; NOS2; NRAS; NSMCE3; OAS1; ORAI1; OSTM1; OTULIN; PARN; PAX4; PDX1; PEPD; PGM3; PIK3CD; PIK3CG; PIK3R1; PLCG2; PMS1; PMS2; PNP; POLA1; POLD1; POLD2; POLD3; POLD4; POLE; POLE2; POLR3A; POLR3C; POLR3F; POMP; POU2AF1; PRF1; PRKCD; PRSS1; PSEN1; PSENEN; PSMA3; PSMB4; PSMB8; PSMG2; PSTPIP1; PTEN; PTPRC; RAB27A; RAC2; RAG1; RAG2; RANBP2; RASGRP1; RBCK1; REL; RELB; RFX5; RFXANK; RFXAP; RHOG; RHOH; RIPK1; RMRP; RNASEH2A; RNASEH2B; RNASEH2C; RNF113A; RNF168; RNF31; RNU4ATAC; RORC; RPSA; RTEL1; SAA1; SAMD9L; SAMHD1; SASH3; SBDS; SEC61A1; SEMA3E; SERPING1; SH2D1A; SH3BP2; SIAE; SKIV2L; SLC29A3; SLC35C1; SLC37A4; SLC39A7; SLC46A1; SLC7A7; SMARCAL1; SMARCD2; SNX10; SOCS1; SP110; SPINK5; SPPL2A; SRP54; SRP72; STAT1; STAT2; STAT3; STAT4; STAT5B; STIM1; STK4; STN1; STX11; STX3; STXBP2; TAP1; TAP2; TAPBP; TAZ; TBK1; TBX1; TBX21; TCF3; TCIRG1; TCN2; TERC; TERT; TET2; TFRC; TGFB1; TGFBR1; TGFBR2; THBD; TICAM1; TINF2; TIRAP; TLR3; TLR7; TLR8; TMC6; TMC8; TMEM173; TNFAIP3; TNFRSF11A; TNFRSF13B; TNFRSF13C; TNFRSF1A; TNFRSF4; TNFRSF6B; TNFRSF9; TNFSF11; TNFSF12; TNFSF13; TONSL; TOP2B; TP53; TPP2; TPT1; TRAF3; TRAF3IP2; TRIM22; TRNT1; TTC7A; TTC37; TTR; TYK2; UBA1; UNC13D; UNC93B1; UNG; USB1; USP18; VAV1; VPS13B; VPS45; WAS; WDR1; WIPF1; WRAP53; XIAP; ZAP70; ZBTB24; ZNF341; ZNFX1.

Los resultados del análisis del transcriptoma están recogidos en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/1058506> (ID del proyecto: PRJNA1058506).

### **13.- Anexo II**

Los anticuerpos seleccionados para realizar la citometría fueron: CD3-BV510; CD19-Spark NIR 685PerCP/Cy; CD16-BUV469; CD4-cFluor-YG584; CD8-BUV805; CD56-BUV737; CD45RA-BUV395; CD27-APC-H7; IgD-BV480; CD185(CXCR5)-BV750; CD183(CXCR3)-PE-Cy7; CD196(CCR6)-BV711; CD197(CCR7)-BV421; CD38-APC/Fire 810; CD20-Pacific Orange y LIVE/DEAD blue (Biolegend®, California, EE. UU.).