

Risposta immunitaria e meccanismi molecolari di effetti avversi cardiovascolari delle proteine Spike da SARS-CoV-2 e vaccini a mRNA

Paolo Bellavite ^{1,*}, Alessandra Ferraresi ² e Ciro Isidoro ^{2,*}

¹ Ricercatore indipendente, 37134 Verona, Italia

² Laboratorio di Patologia Molecolare, Dipartimento di Scienze della Salute, Università del Piemonte Orientale, Via Solaroli 17, 28100 Novara, Italy; alessandra.ferraresi@med.uniupo.it

* Corrispondenza: paolo.bellavite@gmail.com (P.B.); ciro.isidoro@med.uniupo.it (C.I.)

Riassunto: Il SARS-CoV-2 (coronavirus della sindrome respiratoria acuta grave responsabile della malattia COVID-19) utilizza le proteine Spike del suo involucro per infettare le cellule bersaglio che esprimono sulla membrana l'enzima ACE2 (enzima 2 di conversione dell'angiotensina), che funge da recettore. Per controllare la pandemia, sono stati progettati vaccini geneticamente modificati per indurre anticorpi neutralizzanti contro le proteine Spike. Questi vaccini non agiscono come i tradizionali vaccini a base di proteine, in quanto inseriscono il messaggio sotto forma di mRNA o DNA alle cellule ospiti, che quindi producono ed espongono la proteina Spike sulla membrana (dalla quale può essere liberata in forma solubile) per allertare il sistema immunitario. La vaccinazione di massa ha portato alla luce vari effetti avversi associati a questi vaccini a base genetica, che interessano principalmente il sistema circolatorio e cardiovascolare. L'ACE2 è presente legato alla membrana su diversi tipi di cellule, tra cui la mucosa delle vie respiratorie superiori e del tratto gastrointestinale, l'endotelio, le piastrine e in forma solubile nel plasma. L'enzima ACE2 converte il vasocostrittore angiotensina II in peptidi con proprietà vasodilatatorie. Qui esaminiamo i percorsi per l'immunizzazione e i meccanismi molecolari attraverso i quali la proteina Spike, sia da SARS-CoV-2 che codificata dai vaccini a base di mRNA, interferisce con il sistema renina-angiotensina governato da ACE2, alterando così l'omeostasi della circolazione e del sistema cardiovascolare. Comprendere le interazioni molecolari della proteina Spike con ACE2 e il conseguente impatto sull'omeostasi del sistema cardiovascolare indirizzerà la diagnosi e la terapia degli effetti avversi correlati al vaccino e fornirà informazioni per lo sviluppo di una vaccinazione personalizzata che consideri le condizioni fisiopatologiche predisponenti a tali effetti avversi.

Keywords: COVID-19 (Corona Virus Disease 2019); SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus responsible for the COVID-19 disease); Spike; vaccine; immune response; thrombosis; myocarditis; inflammation; renin-angiotensin system; adversomics

Citazione: Bellavite, P.; Ferraresi, A.; Isidoro, C. Immune Response and Molecular Mechanisms of Cardiovascular Adverse Effects of Spike Proteins from SARS-CoV-2 and mRNA Vaccines. *Biomedicines* **2023**, *11*, 451. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020451>

Academic Editors: Joanna Szczepanek e Francesco Bianco

Ricevuto: 28 Dicembre 2022

Revisionato: 25 Gennaio 2023

Accettato: 30 Gennaio 2023

Pubblicato: 3 Febbraio 2023



Copyright: © 2023 degli autori. Questo articolo è un articolo ad accesso aperto secondo i termini e le condizioni della licenza Creative Commons Attribution (CC BY). (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduzione

Nel dicembre 2019, un focolaio di infezioni polmonari che causano una malattia da distress respiratorio ad alta letalità (almeno nelle prime ondate) è emerso prima in Cina e subito dopo si è diffuso in tutto il mondo, principalmente attraverso i continenti europeo e americano. Le caratteristiche patologiche assomigliavano alla SARS (sindrome respiratoria acuta grave) precedentemente descritta ed è stato rapidamente scoperto che era causata da un nuovo beta coronavirus chiamato poi SARS-CoV-2 (coronavirus della sindrome respiratoria acuta grave responsabile della malattia COVID-19) [1]. A causa della gravità della malattia, della mancanza di antivirali specifici e della presunta pressione sui sistemi sanitari (che richiedono essenzialmente il ricovero in unità di terapia intensiva), la vaccinazione fu considerata la soluzione più promettente e appropriata.

SARS-CoV-2, come altri coronavirus, utilizza la glicoproteina Spike (S) dell'involucro per attaccarsi alla cellula attraverso il suo legame con l'enzima 2 di conversione dell'angiotensina (ACE2), esposto sulla membrana di diversi tipi di cellule e che agisce quindi come recettore del virus nel tratto respiratorio superiore e inferiore, nella bocca e nella mucosa intestinale [2-5] (Figura 1).

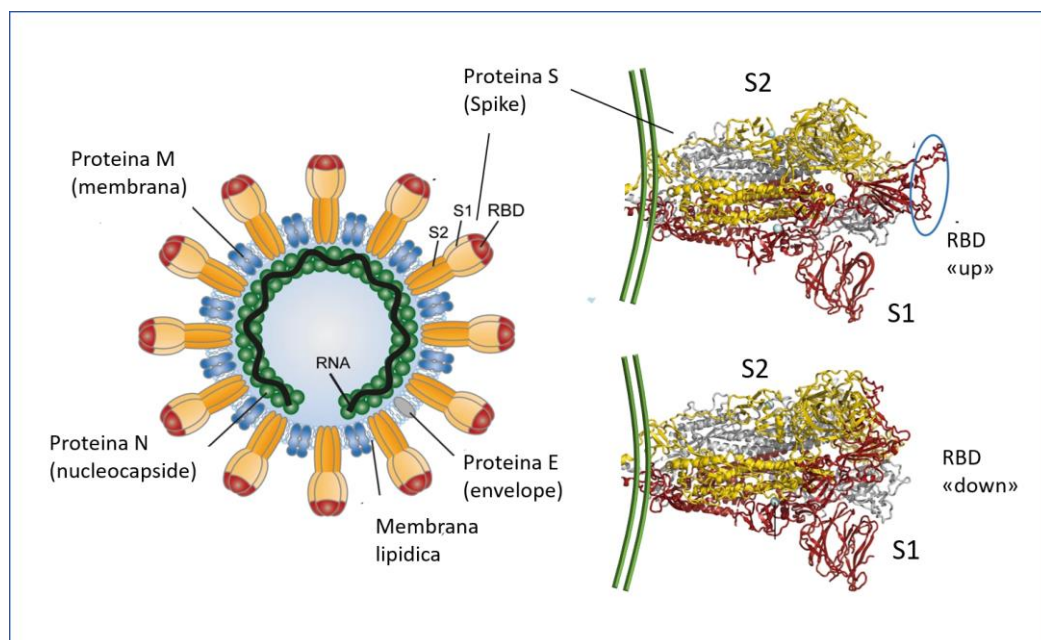


Figura 1. Organizzazione strutturale del virus SARS-CoV-2 (coronavirus della sindrome respiratoria acuta grave responsabile della malattia COVID-19) e della proteina Spike S (a destra). Nello stato chiuso, il dominio di legame del recettore (RBD) è nella conformazione inattiva (giù) e nello stato aperto è nella conformazione "su", che può interagire con il recettore umano ACE2. Il sito di interazione è indicato da un'ellisse nel pannello in alto a destra. Adattato da [7] Copyright 2020 Copyright Franz X. Heinz.

La proteina Spike è composta da due subunità legate in modo non covalente (S1 e S2) che derivano dalla scissione furin-mediata della proteina S nella rete trans-Golgi durante il transito del virus [6]. Le proteine Spike si assemblano quindi come trimeri sull'involucro del virus, conferendo così l'aspetto simile a una corona. È da notare che le cellule infette da SARS-CoV-2 possono esprimere a livello di membrana alcune proteine Spike che non sono state assemblate nel virione, e da esse l'S1 potrebbe essere rilasciato in forma solubile [6]. La Spike si lega al recettore ACE2 tramite una parte della molecola chiamata RBD (receptor binding domain) nella subunità S1, che nello stato di prefusione può assumere la configurazione UP o DOWN con il motivo di legame, rispettivamente accessibile o no, per il legame con ACE2 [6] (Figura 1, pannello a destra).

Dopo l'interazione con il recettore, diverse varianti del virus possono comportarsi diversamente, in termini di infettività e virulenza, probabilmente a causa di diversi meccanismi di ingresso. Infatti, le prime varianti preferivano utilizzare il meccanismo di ingresso che coinvolge la serina proteasi TMPRSS2, pur non sfruttando il meccanismo endosomiale attraverso le catepsine; al contrario, Omicron utilizza principalmente la via endosomiale con coinvolgimento di catepsine e calpaina [8,9]. Quanto queste differenze influenzino l'efficacia dei vaccini è oggetto di dibattito [10].

Sulla base di questa conoscenza, gli scienziati si sono concentrati sulla proteina Spike come miglior antigene candidato per l'immunizzazione. Di fronte all'urgenza posta dalla pandemia, negli Stati Uniti, nel Regno Unito e in Europa sono state impiegate tecnologie di ingegneria genetica e di trasfezione, che hanno consentito il rapido sviluppo e la produzione su larga scala dei vaccini a partire da dicembre 2020 [11] (per trasfezione si

intende l'inserimento artificiale di materiale genetico nelle cellule). Questi vaccini sono stati sviluppati in pochi mesi, il che sembra sorprendentemente rapido, anche se la tecnologia per il trasferimento dell'mRNA in vitro e negli animali era nota da decenni [12]. Successivamente, sono stati eseguiti in parallelo, per un periodo relativamente breve, studi per valutare l'efficacia e la sicurezza, che hanno portato all'approvazione di emergenza del vaccino in pochi mesi. Sebbene abbiano formalmente ottenuto un'autorizzazione all'immissione in commercio, vi è la necessità di fornire ulteriori prove della loro efficacia e sicurezza, sulla base degli studi sperimentali di Fase 3 e degli studi osservazionali di Fase 4 ancora in corso.

Diversi tipi di vaccini anti-COVID-19 sono stati resi disponibili e impiegati in tutto il mondo [13,14]. Il vaccino Pfizer-BioNTech (BNT162b2, Comirnaty) e il vaccino Moderna (mRNA-1273, Spikevax), entrambi utilizzano una piattaforma di nanoparticelle lipidiche (LNP) per fornire l'informazione genetica (mRNA) per istruire la sintesi della proteina Spike. Sono stati tra i primi vaccini ad essere approvati per l'uso di emergenza nel dicembre 2020 e sono attualmente ancora i tipi più diffusi negli Stati Uniti e in Europa. Tuttavia, sono stati sollevati dubbi e preoccupazioni in merito alla loro efficacia nel prevenire la trasmissibilità del virus [15-19] e alla loro sicurezza [20-24].

Se questi vaccini soddisfino la definizione di "vaccino" o debbano invece essere considerati farmaci pro-farmacologici è oggetto di dibattito [24]. Tuttavia, per motivi di praticità, non discuteremo qui il nome che meglio si addice a questi profarmaci immunostimolanti basati su geni che rientrano nella categoria dei prodotti immunologico-genetici e ci concentreremo piuttosto sui loro meccanismi di azione. Qui discuteremo di come il vaccino a base di mRNA suscita la risposta immunitaria insieme a gravi effetti collaterali sul sistema cardiovascolare, la cui gravità dipende dalla distribuzione nel corpo della proteina Spike e dall'entità della risposta immunitaria suscitata dal vaccino.

Prima di entrare nel mercato ed essere autorizzati per l'immunizzazione di una vasta popolazione, i vaccini dovrebbero essere sottoposti a un attento esame per garantire non solo la loro efficacia nella prevenzione dell'infezione o nel ridurre l'estensione delle manifestazioni della malattia causate dall'agente infettivo, ma anche e soprattutto la loro sicurezza. Questo aspetto è cruciale, poiché ci si aspetta che i vaccini siano somministrati a persone sane. Il profilo di sicurezza del vaccino diventa fondamentale, soprattutto se si considera la necessità di frequenti richiami, a causa della diminuzione dell'immunità vaccinale in pochi mesi [25,26]. A questo proposito, i dati di letteratura riportano una varietà di gravi effetti avversi associati alla vaccinazione mRNA COVID-19 [23]. Questi includono miocardite, pericardite, crisi ipertensive e altri gravi eventi cardiovascolari [27-31], nonché reazioni neurologiche [32,33], dermatologiche [34], autoimmuni [35-37] e altre.

Il monitoraggio dei potenziali effetti avversi successivi all'immunizzazione, che potrebbero essere casuali e non correlati al vaccino o potrebbero essere una conseguenza diretta della vaccinazione, è fondamentale per valutare il rapporto beneficio/rischio [35,38-41]. Gli eventi avversi segnalati dai pazienti o dall'operatore sanitario sono raccolti nel database VAERS (*Vaccine Adverse Event Reporting System*) per i consumatori statunitensi (<https://vaers.hhs.gov/> data di accesso 24 luglio 2022) e nel database equivalente *Eudra-vigilance* in Europa (<https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/pharmacovigilance/eudravigilance> accesso 24 luglio 2022), o AIFA in Italia (<https://www.aifa.gov.it/farmacovigilanza-vaccini-covid-19> accesso 24 luglio 2022).

Il problema del rapporto beneficio/rischio dei vaccini anti-COVID-19 è estremamente complesso per diversi motivi, tra cui: (a) La gravità della malattia è molto diversa a seconda dell'età, del sesso e delle condizioni generali di salute della persona. (b) L'efficacia dei vaccini diminuisce nel tempo e cambia a seconda delle varianti. (c) I dati di farmacovigilanza sono ottenuti principalmente attraverso sistemi di rilevazione passiva che sono inadeguati. L'argomento se i rischi della vaccinazione possano in alcune circostanze superare i benefici della difesa contro le malattie non rientra nell'ambito di questo documento, che si concentra invece sui meccanismi molecolari degli eventi avversi successivi alla vaccinazione. Sebbene la patologia associata all'infezione da SARS-CoV-2, soprattutto

con le varianti precedenti a Omicron, fosse più intensa della patologia indotta dal vaccino, quest'ultima non va trascurata. Migliorare la conoscenza scientifica degli eventi avversi, anche nell'ipotesi che quelli gravi siano rari, è di grande importanza per migliorare l'efficacia generale del sistema di prevenzione vaccinale.

Scienze di base come l'immunopatologia, la patologia cellulare e la fisiopatologia del sistema cardiovascolare possono aiutare a capire se e come tali eventi avversi correlati al cuore possano effettivamente essere collegati meccanicamente alla vaccinazione a mRNA. Infatti, eventi avversi cardiaci sono stati segnalati con frequenza anormalmente elevata, in particolare nei casi dei vaccini a mRNA BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) e mRNA-1273 (Moderna). Invece, nel caso di vaccini basati su vettori di adenovirus umani ricombinanti, incapaci di replicazione, sono presenti in letteratura un minor numero di articoli su casi di miocardite [42-44]. Al di là delle differenze nelle piattaforme tecnologiche, va considerato che i vaccini a mRNA hanno avuto una diffusione molto più ampia e, inoltre, richiedono ripetute somministrazioni.

Partendo dalle teorie scientifiche che spiegano come funzionano i vaccini a mRNA anti-COVID-19, questo lavoro si concentra sui meccanismi cellulari, immunologici e fisiopatologici che potrebbero essere alla base delle peculiari reazioni riportate in letteratura per la proteina Spike, che è il principale sistema di infettività del virus e allo stesso tempo il principale prodotto contro il quale i vaccini intendono innescare la risposta immunitaria. Il presente studio contribuisce ad approfondire la comprensione dei potenziali effetti collaterali tossici, per una valutazione completa del profilo di sicurezza di questi vaccini, che è strumentale per informare la politica di sanità pubblica e per la prevenzione e/o cura di effetti collaterali indesiderati.

2. Elementi essenziali della progettazione e del funzionamento dei vaccini a mRNA

Sebbene siano stati descritti vari meccanismi di infettività [45-47], l'ingresso nelle cellule di SARS-CoV-2 si basa principalmente sull'interazione della proteina Spike dell'involucro con l'ACE2 cellulare. Pertanto, bloccare questa interazione con un anticorpo sembrava una buona strategia. Ciò ha spinto le grandi case farmaceutiche a progettare un vaccino geneticamente modificato in grado di indurre nell'ospite la produzione di anticorpi neutralizzanti contro la proteina Spike, in particolare verso la regione di interazione chiamata RBD. L'antigene che dovrebbe immunizzare viene prodotto all'interno della cellula ospitante una volta iniettato il prodotto contenente nanoparticelle incapsulanti molecole di mRNA. Pertanto, affinché il vaccino possa innescare la risposta immunitaria, cioè suscitare l'effetto biologico (immunologico), l'mRNA deve essere tradotto nella proteina che, a sua volta, deve interagire con il sistema immunitario.

La concezione e la rapida produzione di questi nuovi vaccini contro SARS-CoV-2 iniziarono pochi mesi dopo che le autorità cinesi rivelarono la sequenza del virus isolato a Wuhan. Le aziende farmaceutiche occidentali si affrettarono a utilizzare questa sequenza, e in particolare il "messaggio" dell'RNA che codifica la proteina Spike, utilizzando una tecnologia già disponibile [12,48] ma mai sfruttata su larga scala per uso umano. Senneff e collaboratori [49] hanno analizzato attentamente e ampiamente molti dei punti critici relativi ai vaccini a mRNA ingegnerizzati. Qui riportiamo brevemente gli aspetti riguardanti l'immunogenicità dell'mRNA del vaccino esogeno, il suo ingresso nelle cellule e la sua stabilità.

L'mRNA del vaccino è stato progettato per aumentare la sua stabilità, per sfuggire alla degradazione cellulare e per garantire la produzione della proteina Spike con l'RBD accessibile al sistema immunitario per indurre anticorpi neutralizzanti [13,14]. È interessante notare che la sequenza del vaccino mRNA mantiene il sito di clivaggio della furina (un tratto dei quattro aminoacidi basici Arg-Arg-Ala-Arg alla giunzione S1-S2) come nella sequenza virale, e questo ha implicazioni per la generazione del peptide S1 solubile [14,22].

La sequenza originale della proteina è stata leggermente modificata (cioè, K986 e V987 nella subunità S2 sono state sostituite da due proline) per indirizzare la sintesi della

proteina in una conformazione stabilizzata di “pre-fusione” (aperta), come quella che interagisce con i recettori ACE2 delle cellule e verso la quale dovrebbero reagire gli anticorpi neutralizzanti [13,14]. Altre modifiche sono descritte brevemente di seguito.

Per consentire l'ingresso nelle cellule, l'mRNA è incapsulato in nanoparticelle lipidiche (LNP) contenenti colesterolo e fosfolipidi associati a polietilenglicole modificato per evitarne la degradazione [50]. Normalmente, l'RNA virale è riconosciuto dalle cellule umane come estraneo e questo innesca reazioni di difesa che ne compromettono la traduzione in proteine, dirigendone al tempo stesso la degradazione [51,52]. La sostituzione delle uridine con pseudouridine o (ancora meglio) con metil-pseudouridine, supera il riconoscimento come mRNA estraneo da parte dei Toll-Like Receptors (TLR) e la successiva attivazione dell'IFN di tipo I [53]. Per stabilizzare l'mRNA e quindi migliorare la sua traduzione, i vaccini mRNA anti-COVID-19 hanno questa caratteristica [54].

Per stabilizzare ulteriormente l'mRNA e aumentare la produzione di proteine S, alla molecola di mRNA sono stati aggiunti una lunga coda di poli(A) [55] e l'UTR 3' della globina umana [56]. È stata aggiunta una sequenza leader, per la traduzione nei ribosomi associati al reticolo endoplasmatico, per garantire l'inserimento della proteina Spike nella membrana plasmatica. In particolare, i vaccini a mRNA sono arricchiti nel contenuto di GC: 53% in BNT162b2 e 61% in mRNA-1273 rispetto al 36% in mRNA nativo di SARS-CoV-2 [57], e anche questo contribuisce ad aumentare la produzione di proteine [58]. Presi insieme, gli mRNA del vaccino che guidano la sintesi della proteina Spike sono stati progettati in modo tale da sfidare la risposta cellulare allo stress per il riconoscimento di acidi nucleici e proteine esogeni, e questo potrebbe avere un impatto sulla distribuzione degli mRNA che codificano per la proteina Spike e della proteina stessa, che può quindi spiegare gli effetti biologici e fisiopatologici in organi distanti dal sito di iniezione.

In effetti, la vera biodistribuzione e l'emivita dell'mRNA del vaccino nell'uomo sono attualmente sconosciute. Normalmente, l'mRNA è molto fragile e si degrada rapidamente (entro pochi giorni). Inizialmente si pensava che l'mRNA del vaccino sarebbe rimasto localizzato nel sito di iniezione e sarebbe stato degradato entro pochi giorni, come avviene per il normale mRNA. Tuttavia, le osservazioni del mondo reale contraddicono questa previsione. La proteina S è stata rilevata nel plasma di vaccinati con mRNA-1273 anche 15 giorni dopo l'iniezione [59]. Sia l'mRNA che la proteina S sono stati trovati nei linfonodi ascellari dopo 60 giorni [60]. Molto recentemente, Spike-mRNA è stato rilevato nel sangue di individui vaccinati 15 e fino a 28 giorni dopo la vaccinazione COVID-19 [61,62]. Pertanto, è probabile che le LNP con mRNA rimangano in circolazione per lunghi periodi di tempo, conservando la loro capacità di indurre l'espressione della proteina S nelle cellule incontrate. I vaccini mRNA bivalenti aggiornati che includono la sequenza codificante per la variante Omicron BA.4/BA.5 sono stati resi disponibili nel settembre 2022 e gli studi sulla loro efficacia e sicurezza sono ancora in corso. Sulla base di due studi preliminari, non ancora sottoposti a revisione paritaria, il vaccino bivalente a mRNA mostra una protezione modesta [63] e un tasso più elevato di eventi avversi rispetto al vaccino monovalente a mRNA [64].

3. La risposta immunitaria al SARS-CoV-2 e ai vaccini a mRNA

L'esatto meccanismo di stimolazione del sistema immunitario da parte dei vaccini codificanti per la proteina Spike è ancora ipotetico e ne esistono diverse versioni. Il primo problema riguarda l'interazione del prodotto iniettato con l'ospite.

3.1. L'importanza del percorso di ingresso

Normalmente, i patogeni entrano nel corpo attraverso diverse vie, vale a dire la mucosa orale e gastro-intestinale, la mucosa nasale, la mucosa urogenitale e la pelle. Ciascuna di queste vie è caratterizzata da un peculiare microambiente locale (cellule stromali, fattori tissutali specifici e microbiota commensale) che influenza pesantemente il tipo e l'entità della risposta immunitaria innata e specifica. Quando un agente infettivo, una tossina o

una molecola antigenica estranea entrano nei tessuti corporei o nel sangue, il sistema immunitario attiva una robusta risposta proinfiammatoria, coinvolgendo prima il sistema immunitario innato (non specifico per l'antigene) e, se necessario (a seconda della tipo di antigene, via di ingresso e sua persistenza), il sistema immunitario adattativo antigene-specifico.

Con l'evoluzione, il sistema immunitario è diventato sempre più compartimentato (sistema immunitario cutaneo, sistema immunitario delle mucose e sistema immunitario sistemico) per migliorare la sua risposta e ridurre il rischio di una reazione disregolata e sproporzionata. Allo stesso tempo, le cellule del sistema immunitario possono viaggiare tra i compartimenti ed essere influenzate dai diversi ambienti locali. I tessuti immunitari compartimentalizzati comunicano tra loro per avvisare il sistema della presenza del "nemico" estraneo potenzialmente dannoso attraverso il rilascio di esosomi. Questi ultimi sono microscopiche particelle di origine cellulare contenenti molecole informative: citochine, microRNA, PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns), DAMP (Damage Associated Molecular Patterns) [65]. In particolare, negli individui vaccinati sono stati rilevati esosomi circolanti con inserita sulla membrana la proteina Spike, e si presume che tali esosomi siano interiorizzati dall'APC, aggiungendo così un'altra via di sensibilizzazione immunitaria [66].

Il compartimento anatomico determina le caratteristiche (stato di differenziazione, fenotipo, funzione, durata, tasso di turnover, capacità di localizzazione e meccanismi regolatori) delle cellule immunitarie. La soglia per l'attivazione del sistema immunitario è diversa in ciascun organo e correla inversamente con la relativa sterilità [67,68]. Per ottenere una protezione efficace e duratura nel sito di ingresso, l'agente patogeno deve avere un contatto diretto ed essere processato dal tessuto locale e dal sistema immunitario compartimentato [67].

Come con altri virus respiratori, nel caso dell'infezione da SARS-CoV-2, la fase iniziale della risposta umorale è mediata da anticorpi IgA che mostrano una maggiore attività neutralizzante rispetto alle IgG [69]. Dopo l'infezione virale, i plasmablasti con recettori "homing" per i siti della mucosa e con IgA intracellulari aumentano nel sangue [69]. Il fatto che il livello di IgA secretorie specifiche per lo Spike RBD nella saliva fosse superiore a quello nel sangue dello stesso soggetto 49 giorni dopo l'insorgenza dei sintomi è indicativo della persistenza di IgA nella mucosa orale [69].

La forma dimerica di IgA, che si trova in tutte le secrezioni della mucosa sia respiratoria che intestinale, contro SARS-CoV-2 è più potente della IgA monomerica [70,71]. Le IgA salivari specifiche per la proteina Spike sono significativamente inferiori nei vaccinati con mRNA anti-COVID-19 rispetto ai controlli convalescenti COVID-19 [72]. Infatti, gli attuali vaccini a mRNA, pur essendo in grado di prevenire/attenuare le conseguenze più gravi della malattia, non innescano la risposta IgA mucosale [73], anche dopo il richiamo [74] e non impediscono la colonizzazione di il virus nelle membrane mucose [16]. Anche il modello della risposta delle citochine è di fondamentale importanza. La risposta immunitaria al virus e ai vaccini a mRNA differisce in quanto la prima è caratterizzata da una forte induzione dell'interferone e dei linfociti circolanti effettori B e T, mentre la seconda è essenzialmente ristretta alle cellule di memoria circolanti [75].

3.2. Vie di immunizzazione dei vaccini SARS-CoV-2 e mRNA

I vaccini mRNA anti-COVID-19 hanno lo scopo di indurre linfociti B in grado di produrre anticorpi contro la proteina S (virale) per impedire l'ingresso di SARS-CoV-2 nelle cellule, nonché linfociti T in grado di uccidere le cellule infettate dal virus (in il polmone, il rene, ecc.) che esprimono l'antigene S sulla membrana. Tuttavia, il percorso per suscitare la risposta immunitaria alla proteina S codificata dai vaccini a mRNA presenta molte peculiarità che devono essere chiarite.

Un'idea errata, ma molto diffusa, nella teoria che sostiene tali vaccini a mRNA è considerare la proteina Spike come un semplice "antigene estraneo" in grado di stimolare le difese immunitarie, come avviene per i vaccini convenzionali.

Consideriamo ad esempio la documentazione fornita per la prima registrazione del vaccino mRNA-1273 di Moderna presso la Federal Drug Administration degli Stati Uniti [76]. Nella presentazione che illustra il processo di immunizzazione [77], leggiamo che l'LNP caricato con l'mRNA codificante Spike si fonderebbe con la membrana plasmatica e rilascerebbe l'mRNA nelle cellule presentanti l'antigene (APC), che a loro volta produrrebbero la proteina Spike e la presenterebbero sulla membrana alle cellule T helper CD4+, alle cellule T citotossiche CD8+ e alle cellule B. Secondo questa teoria, il vaccino a mRNA (in corsivo le parole tradotte dall'originale): (a) "fornisce istruzione (proteina Spike) direttamente al sistema immunitario" e (b) "crea efficacemente memoria immunitaria specifica in un contesto naturale (in situ)". Questo percorso "teorico" è illustrato nella parte superiore (A2) della Figura 2.

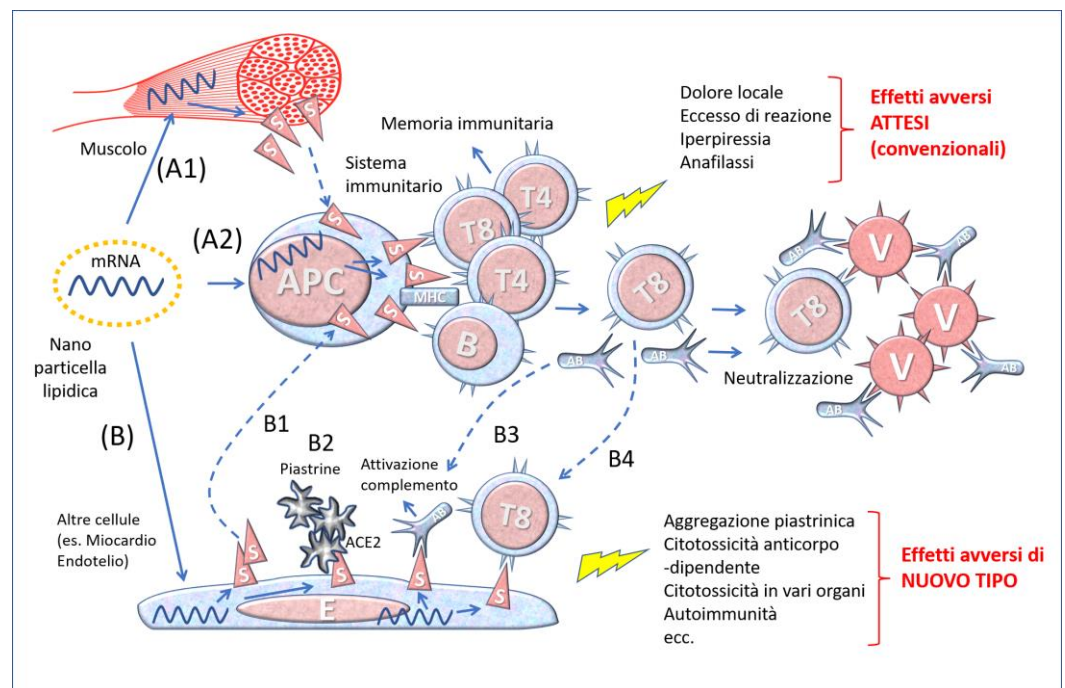


Figura 2. Schema della teoria del funzionamento dei vaccini a mRNA anti-COVID-19. A1–2 La teoria semplicistica presentata da Moderna per la registrazione, che rappresenta la produzione e la presentazione della proteina Spike da parte delle APC ai linfociti; A1: produzione di Spike da parte delle cellule muscolari locali e rilascio (mediante spargimento) di S solubile che verrebbe catturata ed elaborata da APC per la stimolazione immunitaria; A2: gli LNP trasporterebbero l'mRNA nelle APC, che poi produrrebbero la Spike presentandola nel contesto di MHC alle cellule immunitarie. B. Conseguenze dell'espressione della proteina Spike da parte di tipi cellulari diversi dalle cellule immunitarie trasfettate da mRNA contenente LNP. B1: la proteina S rilasciata dalle cellule somatiche stimola il sistema immunitario tramite APC; B2: interazione delle piastrine del sangue mediante ACE2 con la proteina S espressa sulla membrana delle cellule endoteliali; B3: anticorpi specifici si legano alla proteina S sulla membrana delle cellule somatiche (miocardio, endotelio, ecc.) e attivano il sistema del complemento (o citotossicità anticorpo-dipendente; non mostrato) portando alla morte cellulare; B4: specifici linfociti T CD8+ (T8) attaccano le cellule endoteliali che esprimono la proteina S. Abbreviazioni e simboli: LNP: nanoparticelle lipidiche; APC: cellula presentante l'antigene; MHC: Complesso maggiore di istocompatibilità; S: Spike; T e B: linfociti; V: Virus; E: cellula endoteliale; AB: Anticorpo; ADCC: citotossicità cellulare dipendente da anticorpi; ACE2: enzima 2 di conversione dell'angiotensina. Freccie a linea continua: azione, funzionamento; freccie tratteggiate: movimento, spostamento.

Questo modello, nella parte alta della figura2, ripropone i passaggi essenziali (non considerando le complessità del sistema MHC, dei mediatori chimici, delle cellule accessorie, ecc.) della teoria dell'immunizzazione con vaccini tradizionali realizzati con sostanze derivate dal microbo o con il microbo intero dopo che è stato attenuato, inattivato

o ucciso. La differenza sta nel fatto che l'mRNA dei vaccini viene iniettato nelle cellule muscolari, che producono ed espongono sulla membrana la proteina Spike che alla fine potrebbe essere liberata e quindi catturata dalle APC (Figura 2, A1), oppure entra nelle APC (Figura 2, A2).

Le conoscenze immunologiche convenzionali insegnano che le cellule presentanti l'antigene (APC, cellule dendritiche, macrofagi e cellule di memoria B) "catturano" particelle extracellulari potenzialmente patogene (che mostrano un modello molecolare associato al patogeno, PAMP) per mezzo di una serie di adatti recettori. Queste particelle antigeniche vengono poi internalizzate per endocitosi o fagocitosi (a seconda della dimensione particellare e del tipo cellulare), "processate" (cioè digerite) in piccoli peptidi (circa 30 amminoacidi) ed eventualmente inserite nell'MHC-II (principale complesso di istocompatibilità) fessura per i linfociti Th (CD4+) in formazione. Tuttavia, per i vaccini mRNA COVID-19 lo scenario potrebbe non essere affatto così semplice, come discuteremo di seguito.

La teoria della vaccinologia convenzionale prevede che l'immunità si ottenga iniettando una "antigene" estraneo, inattivato in modo da non arrecare alcun danno all'ospite, ma comunque in grado di stimolare una specifica reazione immunitaria umorale e cellulare [78]. Secondo questo punto di vista, valido per gli antigeni microbici finora usati, gli eventi avversi attesi dopo l'immunizzazione sono dolore e infiammazione transitori nel sito di iniezione e sintomi sistemici transitori come febbre e malessere. Sebbene raramente, dopo la vaccinazione possono verificarsi gravi effetti avversi, ad esempio a causa di una condizione allergica (anafilassi) o di disregolazione immunitaria o autoimmunità mediata dagli antigeni stessi o dall'adiuvante (ad es. particelle di alluminio), o forse a causa dell'uso involontario di microrganismi impropriamente inattivati o mutati (ad es. Sabin polio) o suscettibilità genetica [40,79-82].

Nel caso specifico delle tecnologie che producono l'antigene codificato da mRNA rilasciato tramite LNP, dovrebbero essere considerate le seguenti peculiarità: 1. Le LNP possono fondersi con la membrana di qualsiasi cellula che incontrano e rilasciare lì il carico utile [83]. Ciò implica che l'mRNA può dirigere la sintesi della proteina Spike non esclusivamente nelle cellule muscolari ma anche in altre cellule somatiche. 2. L'mRNA è dotato di una sequenza leader, che dirige la sintesi della proteina Spike nei ribosomi associati al reticolo endoplasmatico. La proteina S legata alla membrana viaggerebbe quindi attraverso il complesso di Golgi (qui sarà scissa in S1 e S2 dalla furina) e quindi sarebbe esposta sulla membrana plasmatica tramite esocitosi inserzionale [14]. Le cellule trasfettate potrebbero liberare la proteina S e/o i suoi frammenti dopo l'uccisione da parte delle cellule T citotossiche, e S1 (che è legato in modo non covalente a S2) potrebbe essere liberato dalla membrana [14,22]. Infatti, alti livelli di proteine Spike solubili si trovano nella circolazione dei vaccinati con miocardite [84]. La Spike solubile può essere successivamente endocitata da APC e linfociti B. Le cellule trasfettate possono rilasciare esosomi che esprimono la proteina S sulla membrana, coda che contribuisce anche all'immunostimolazione delle APC negli organi distanti [66].

L'elaborazione dell'antigene segue due percorsi diversi a seconda del tipo di cellula (immune o non immune) e se l'antigene si localizza nei compartimenti endosomiali o nel citoplasma. Nel primo caso (che si verifica ad esempio nelle APC), l'antigene esogeno internalizzato per endocitosi/fagocitosi viene idrolizzato dalle cathepsine endosomiali e i suoi frammenti sono inseriti nel solco dell'antigene MHC di classe II (HLA-II) per essere esposti sulla plasma membrana per informare i linfociti T helper CD4+. Nel caso dell'infezione virale (ad es., SARS-CoV-2) delle cellule parenchimali, le proteine virali (ad esempio la proteina S) sono idrolizzate nel citoplasma dalla via ubiquitina-proteasoma e i peptidi (immunodominanti) traslocati in reticolo endoplasmatico dove vengono inseriti nel solco dell'MHC di classe I ed infine esposti sulla membrana plasmatica. Questo informerà il linfocita citotossico T CD8+ che la cellula è stata infettata e deve essere uccisa. I linfociti B, dal canto loro, sono stimolati da antigeni solubili riconosciuti dai recettori delle cellule B di membrana (un complesso contenente IgD o IgM) e stimolati a diventare plasmacellule

che producono e secernono anticorpi solubili. Esiste un “dialogo incrociato” di citochine tra APC, Thelper, Tcitotossici e linfociti B per orchestrare la risposta immunitaria.

Questo è un percorso seguito dal sistema immunitario nel caso di infezione naturale. Tuttavia, nel caso della vaccinazione COVID-19 con LNP caricato con l'mRNA modificato, ci troviamo di fronte a esiti imprevedibili, poiché la trasfezione dell'mRNA potrebbe avvenire in modo aspecifico in qualsiasi cellula, comprese APC, cellule endoteliali e cellule parenchimali di organi distanti, in cui l'mRNA dirigerebbe quindi la sintesi persistente della proteina S modificata (stabilizzata in conformazione aperta). Il percorso di elaborazione della proteina S determinerà il destino delle cellule trasfettate.

In caso di trasfezione con LNP delle cellule parenchimali (idealmente dovrebbe accadere solo nelle cellule muscolari nel sito di iniezione), l'esposizione sulla membrana della proteina S innescherebbe prevedibilmente l'attacco dei linfociti T CD8+, proprio come accadrebbe alle cellule infettate da virus, e conseguente citotossicità nel tessuto bersaglio.

Un'altra possibilità è che, a differenza dell'infezione naturale, nelle cellule trasfettate la proteina S potrebbe (in parte) non essere processata, ed essere esposta sulla membrana non nel contesto dell'MHC di classe I. Questa eventualità potrebbe trarre in inganno le cellule immunitarie, che potrebbero considerare la proteina come normale e ignorarne quindi la presenza.

Per aggiungere complessità, dobbiamo considerare che altre cellule, oltre alle APC, possono essere trasfettate dall'mRNA contenente LNP, come illustrato nella Figura 2, disegno in basso (B). Queste cellule (es. cellule della superficie dei vasi o cellule cardiache) produrrebbero proteine Spike, le mostrerebbero sulla membrana, o le rilascerebbero dopo la morte cellulare o distaccandolo dalla membrana. Tutto ciò innescherebbe la risposta del sistema immunitario (B1 nella Figura 2). Inoltre, le Spikes esposte sulla membrana dell'endotelio possono interagire con i recettori ACE2 esposti sulla membrana piastrinica, favorendone l'aggregazione (B2 in Figura 2). Quando la sintesi di Spike è indotta da booster, cioè in individui immunizzati, il rischio è che le cellule trasfettate diventino vittime dell'aggressione da parte di anticorpi precedentemente formati (B3 in Figura 2) o di linfociti T8 citotossici (B4 in Figura 2). Se questo è il caso, gli eventi avversi a seguito di immunizzazioni ripetute possono essere peggiori e coinvolgere vari organi in cui si localizzano le proteine Spike.

Quindi, la "teoria" del vaccino a mRNA inizialmente presentata per l'autorizzazione trascura la possibilità che qualsiasi cellula che produce la proteina Spike e la mostra sulla sua membrana (associata o meno con MHC-I) venga attaccata e distrutta dalle cellule T CD8+. La gravità delle conseguenze per l'ospite a seguito della vaccinazione dipenderà dal tipo e dal numero di cellule colpite e dal tessuto in cui si verifica la reazione. Ad esempio, la miocardite è considerata una reazione avversa alla vaccinazione mRNA [85,86]. Il fatto che questo evento sia più frequente dopo la seconda dose e si verifichi alcuni giorni dopo l'inoculazione [27], suggerisce un meccanismo immuno-mediato analogo ad una reazione autoimmune. Per concludere, la proteina Spike agisce in modo peculiare, non semplicemente come immunogeno, ma come agente che causa malattie.

3.3. Differenze tra il contatto con il virus intero e con la proteina Spike derivata dal vaccino

Il contatto con l'intero virus istruisce in modo completo il sistema immunitario e tutti i suoi componenti. Ciò fa sì che, nel caso in cui un costituente del virus cambi a causa di mutazioni genetiche, la memoria immunitaria verso i componenti virali conservati possa ancora innescare la risposta immunitaria. Inoltre, i diversi frammenti del virus presentati dalle APC ai linfociti innescano una complessa risposta immunitaria policlonale, che neutralizza efficacemente il virus.

I componenti di un virus intero determinano il tipo di risposta immunitaria innata e specifica. Un patogeno contiene proteine, lipidi, carboidrati e acidi nucleici che costituiscono i cosiddetti PAMP che si legano ai PRR (Pattern Recognition Receptors) presenti sulle APC. L'interazione porta alla maturazione dell'APC e all'inizio della risposta

immunitaria adattativa con l'innescò e la differenziazione delle cellule T helper antigene specifiche, delle cellule T citotossiche e delle cellule B. La combinazione di PAMP determina il tipo (innato e/o adattativo), l'estensione e la durata della risposta immunitaria.

Tutti i virus hanno uno specifico tropismo cellulare, nel senso che entrano e infettano solo quelle cellule che esprimono il recettore adatto sulle loro membrane. Nel caso di SARS-CoV-2, il virus entra preferenzialmente nelle cellule che esprimono il recettore per Spike (cioè ACE2). Al contrario, come delineato sopra, i vaccini a mRNA somministrati tramite LNP possono in linea di principio (e in pratica) trasferire l'informazione per la sintesi della proteina S a qualsiasi cellula. Le implicazioni biologiche e immunologiche dell'immunizzazione Spike in relazione al tipo di vaccino, adiuvante e via di somministrazione sono state studiate in modelli animali [87].

Molte cose sull'esito della vaccinazione che ancora non sappiamo: 1. La quantità di proteina S sintetizzata al momento della vaccinazione è paragonabile a quella di un'infezione virale naturale o è superiore di molti ordini di grandezza? 2. Quanto dura la sintesi di Spike dopo la somministrazione di mRNA? 3. Per quanto tempo le proteine Spike derivate dal vaccino rimangono biologicamente attive?

È difficile calcolare esattamente il numero di copie della proteina Spike che risulta dalla somministrazione di questi vaccini, perché la quantità dichiarata di mRNA non è coerente in tutti i lotti (il produttore Pfizer ha ammesso che solo dal 30 al 70% dell'mRNA in il vaccino è intero per una traduzione efficace) e perché la sua stabilità intracellulare può variare da cellula a cellula.

Pertanto, è ragionevole aspettarsi una grande differenza nell'effetto biologico e nella risposta immunitaria tra l'infezione naturale e la somministrazione di vaccini a mRNA.

4. Biodistribuzione di LNP e rilevamento della Spike

Nel dossier presentato alla FDA per l'autorizzazione dell'mRNA-1273, il produttore del vaccino (Moderna) ha affermato che la reazione immunitaria allo Spike si sarebbe verificata "in situ", cioè al punto dell'iniezione [77]. Tuttavia, i pochi studi di biodistribuzione condotti [88] hanno mostrato che nei topi e nei ratti, iniettati con LNP marcate con sonda radioattiva o luciferasi, il segnale viene rilevato in vari tessuti, oltre al sito di iniezione, soprattutto nella milza e nel fegato [89]. Il dossier tecnico presentato per la registrazione del vaccino Pfizer anti-COVID-19 riporta che le LNP si sono ridistribuite principalmente a fegato, ghiandole surrenali, milza e ovaie entro 48 ore dall'iniezione.

Studi successivi hanno dimostrato la presenza di proteine Spike derivate dal vaccino nel sangue di soggetti inoculati [59,90]. Poiché i recettori per Spike sono ubiquitariamente espressi in una varietà di tessuti e organi, è probabile che questa proteina svolga attività che vanno chiaramente oltre la sua funzione prevista come semplice "antigene" [91,92]. Studi su animali da laboratorio hanno dimostrato che le proteine Spike possono anche attraversare la barriera emato-encefalica, il che può spiegare i sintomi neurologici della malattia e del vaccino [93].

Inoltre, la colorazione immunostochimica delle biopsie dei linfonodi ascellari mostra che le proteine Spike del vaccino erano ancora presenti fino a 60 giorni dopo la seconda dose di vaccini a mRNA [60]. Questi autori hanno trovato la proteina Spike anche nel plasma nei primi giorni dopo la vaccinazione (concentrazione media di 47 pg/mL); tuttavia la misurazione della Spike nel sangue dopo i boost era influenzata dalla presenza di anticorpi specifici. Gli esosomi circolanti contenenti la proteina Spike sono stati trovati il giorno 14 dopo la vaccinazione e sono aumentati dopo la dose di richiamo, durando fino a quattro mesi [66]. Sebbene sia stato suggerito che queste vescicole che esprimono la proteina Spike sulla membrana abbiano la funzione di stimolare la risposta immunitaria, non è noto se possano interagire con le cellule che esprimono ACE2. L'mRNA derivato dal vaccino e la proteina Spike sono stati rilevati nel centro germinativo dei tessuti linfoidei secondari due mesi dopo la vaccinazione, suggerendo un'induzione prolungata della sintesi proteica [60]. Recentemente, le proteine Spike circolanti sono state rilevate nel sangue di soggetti ospedalizzati per miocardite dopo vaccinazione con mRNA [84].

Sorprendentemente, la concentrazione della proteina Spike (media $33,9 \pm 22,4$ pg/mL) era significativamente più alta nei vaccinati sintomatici rispetto a quelli asintomatici, ed era misurabile fino a tre settimane dopo la vaccinazione [84].

La proteina Spike è stata rilevata mediante immunoistochimica nella parete vascolare del cervello e del cuore di un paziente di 76 anni deceduto tre settimane dopo aver ricevuto la sua terza vaccinazione COVID-19 [94]. Poiché non è stata rilevata alcuna proteina nucleocapside (N), gli autori sostengono che la patologia sia stata causata dalla vaccinazione e non dall'infezione da virus SARS-CoV-2.

È da sottolineare che anche nel corso della malattia da COVID-19 sono state trovate proteine Spike libere nel plasma, il che può spiegare alcune manifestazioni cliniche e fisiopatologiche. La proteina S1 libera circolante (la subunità extracellulare contenente l'RBD) è stata rilevata in quantità considerevole nei pazienti, in particolare in quelli gravemente malati, e probabilmente ha contribuito alla disregolazione endoteliale e alla trombosi [95]. La proteina Spike è stata rilevata nelle piastrine dei trombi dei pazienti COVID-19, in assenza di RNA virale, suggerendo il suo coinvolgimento diretto nell'attivazione piastrinica e nella formazione del coagulo [96].

Un altro inquietante studio sul vaccino Pfizer presenta prove della possibile permanenza del messaggio all'interno della cellula sotto forma di DNA [97]. Secondo questo studio, il rapido ingresso dell'mRNA nelle cellule epatiche umane sarebbe seguito da una "trascrizione inversa" nel DNA entro poche ore [97]. Non è stato dimostrato se il DNA retroscritto dall'mRNA di BNT162b2 sia integrato nel genoma cellulare, tuttavia la scoperta solleva la preoccupazione che l'integrità del DNA genomico possa essere compromessa, sottolineando possibili effetti collaterali genotossici. Inoltre, se il messaggio dell'mRNA viene retroscritto nel DNA, che è più stabile, la sintesi delle proteine Spike può persistere a lungo.

5. La Spike "attiva" e il Sistema Renina-Angiotensina

ACE2 è un enzima transmembrana localizzato in molti organi tra cui polmone, rene, cellule endoteliali [98,99], piastrine [46], mastociti [100,101], cervello [102], testicoli, prostata e utero [103], mucosa orale, ghiandole salivari, enterociti, colangiociti del fegato e tessuto adiposo [99]. L'ampia distribuzione di ACE2 può spiegare i danni multiorgano causati dalle proteine Spike, prodotte dall'infezione da SARS-CoV-2 o dalla vaccinazione con mRNA.

Infatti, a parte alcune piccole modifiche apportate per stabilizzare la proteina nella conformazione aperta, la Spike "selvaggia" (cioè virale) e la Spike "sintetica" (dal vaccino a mRNA) hanno le stesse caratteristiche biochimiche e, cosa più importante, le stesse funzioni patologiche [22,92,104]. In altre parole, le proteine Spike derivate dal vaccino "imitano" il comportamento delle omologhe derivate dal virus e la patologia dipende dagli organi in cui le Spikes si formano e si distribuiscono.

In questa sezione si spiega come l'impegno del recettore ACE2 da parte della proteina Spike, sia dal virus che dal vaccino, alteri l'equilibrio nel sistema renina-angiotensina (RAS), e come questo abbia varie conseguenze nella fisiopatologia del sangue e del sistema cardiovascolare, come mostrato in Figura 3.

L'ingresso cellulare di SARS-CoV-2 attraverso ACE2 ha conseguenze considerevoli nel corso della malattia COVID-19 [105], anche perché quando si lega ai recettori ACE2 sulle piastrine può causare trombosi. Nei leucociti, altri recettori, oltre all'ACE2, possono essere presi di mira dalle proteine Spike [106,107].

Data la somiglianza biochimica tra le Spikes derivate dal virus e quelle derivate dal vaccino, si prevede che anche quest'ultimo influisca sul RAS con possibili conseguenze patologiche, in particolare sulla pressione sanguigna e sulla circolazione [104,108-113].

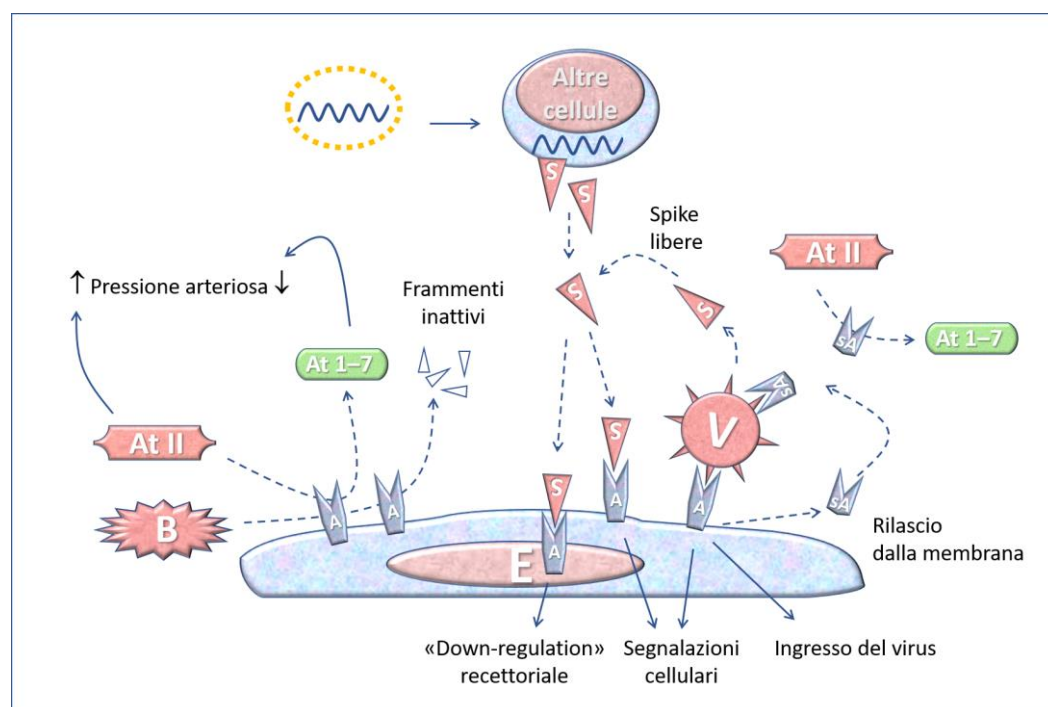


Figura 3. L'interazione tra SARS-CoV-2 o la proteina Spike libera con i recettori ACE2 sulla membrana di una cellula endoteliale. L'interazione favorisce l'ingresso del virus nella cellula (ad es. piastrine, leucociti, macrofagi, endoteli) e l'attivazione cellulare mediata da recettori ("Segnalazione cellulare") da parte della Spike libera. L'ACE2 di membrana (a sinistra) o solubile nel plasma perché distaccato dalle membrane (a destra) converte l'angiotensina II (composta da 8 aminoacidi) in una forma inattiva (1-7) e può inattivare la bradichinina, un importante mediatore dell'infiammazione acuta. L'interazione Spike-ACE2 può portare ad aggregazione piastrinica, infiammazione e trombosi, come descritto nel testo. Abbreviazioni e simboli: E: cellula endoteliale; V: Virus; S: Spike; A: ACE2; sA: ACE2 solubile; ATII: angiotensina II; A 1-7: angiotensina 1-7; B: bradichinina. Freccia continua: azione, operazione, effetto; frecce tratteggiate: spostamento, conversione.

Oltre alla forma di membrana di ACE2 (chiamata anche "mACE2"), una forma solubile chiamata "sACE2" può essere trovata libera nel plasma. Il rilascio di ACE2 (e la formazione di sACE2) è un processo ben noto mediato dalla scissione della forma legata alla membrana, mediata da ADAM17, una metalloproteasi chiamata anche TACE (Convertasi del Tumor Necrosis Factor Alpha) [114]. Quando SARS-CoV-2 si lega alle cellule bersaglio, una certa quantità di molecole di ACE2 viene rilasciata dalle membrane per azione degli enzimi proteolitici e passa nel plasma, dove può diminuire il livello di angiotensina II, portando così all'ipotesione [113]. Nei pazienti COVID-19, la diffusione di ACE2 è esacerbata e il livello plasmatico di sACE2 è correlato alla gravità del COVID-19 [115]. È concepibile che una tendenza simile si verifichi negli individui vaccinati con mRNA a causa della Spike solubile, o degli esosomi che espongono lo Spike legata alla membrana.

Inoltre, le proteine Spike migliorano l'aggregazione piastrinica, promuovendo così la trombosi [116] e attivano le cellule endoteliali tramite ACE2, aumentando così il reclutamento dei leucociti, l'adesione e l'attivazione del complemento [95].

Il problema maggiore sorge quando i complessi sACE2-virus o sACE2-Spike vengono eliminati dagli anticorpi (formati pochi giorni dopo l'insorgenza della malattia o dopo la vaccinazione) o dalle cellule fagocitiche. Ciò porta a una ridotta attività di ACE2 e, di conseguenza, a un aumento del livello dell'angiotensina II ipertensiva e all'alterazione dell'infiammazione, della coagulazione e dei sistemi idroelettrolitici [117] (Figura 4).

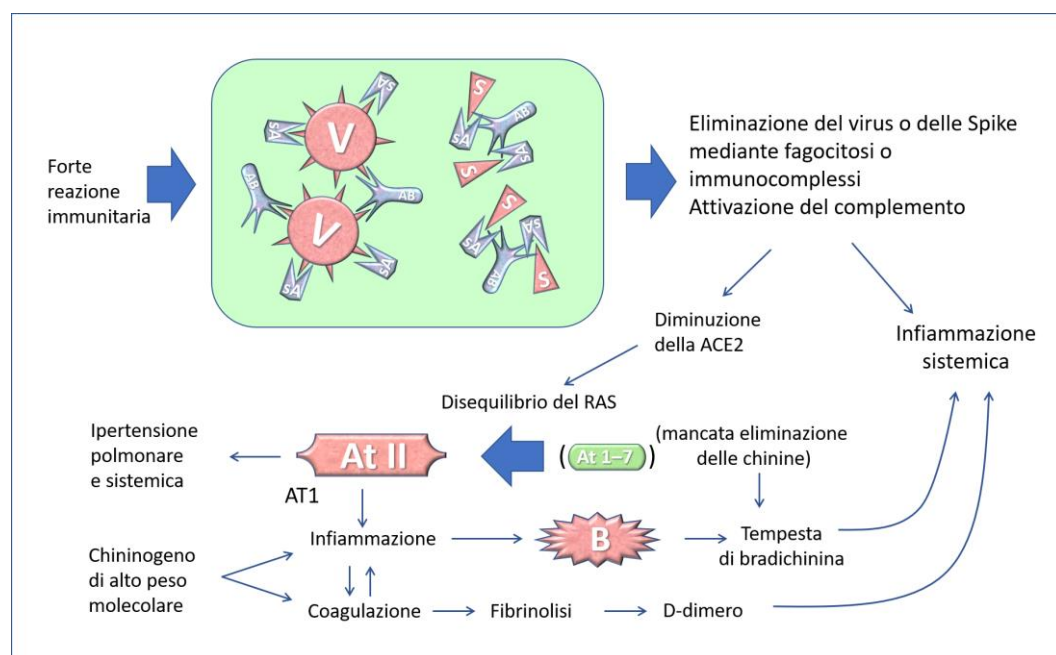


Figure 4. Effetti patologici di COVID-19 e del vaccino sul sistema renina-angiotensina. L'ACE2 normalmente distrugge l'angiotensina II, un peptide di 8 aminoacidi che ha un'azione ipertensiva e provoca ritenzione idrica, e la converte in "angiotensina 1-7", che ha un effetto ipotensivo. Qui è illustrato il meccanismo del disequilibrio del RAS causato dallo sbilanciamento tra angiotensina II e angiotensina 1-7 a favore della prima. Abbreviazioni e simboli: RAS: Sistema renina-angiotensina; E: cellula endoteliale; V: Virus; S: Spike; sA: ACE2 solubile; ATII: Angiotensina II; A 1-7: Angiotensina 1-7; B: bradichinina; AB: Anticorpo; AT1: recettore 1 dell'angiotensina II.

Uno scenario simile può verificarsi dopo la reinfezione in individui vaccinati. Il legame della proteina Spike del coronavirus al recettore ACE2 ne provoca l'internalizzazione [118], e questo porta a una netta diminuzione dell'attività dell'enzima ACE2, che si traduce quindi in un aumento dell'angiotensina II e di conseguenza in un aumento della pressione sanguigna e dell'accumulo di bradichinina. Inoltre, il legame di Spike all'ACE2 legato alla membrana può causare lesioni polmonari e vasocostrizione a causa della ridotta conversione dell'angiotensina II in angiotensina 1-7 in quella sede [113,119].

Inoltre, sorgono squilibri nel sistema delle chinine, fino alla cosiddetta "tempesta di chinine" [120,121]. L'ACE2, infatti, regola anche il sistema delle chinine eliminando la bradichinina, responsabile dei fenomeni infiammatori e degli essudati. È stato dimostrato che elementi chiave dei sistemi di bradichinina, angiotensina e coagulazione sono co-espressi con ACE2 nelle cellule alveolari polmonari, e questo potrebbe spiegare come i cambiamenti nell'ACE2 di membrana causati dal virus determinino lo sviluppo delle forme cliniche più gravi di COVID-19 [122,123]. Infatti, l'infiammazione mediata dalla bradichinina contribuisce a complicanze respiratorie potenzialmente letali nel COVID-19 [124], e questo è uno dei motivi per raccomandare un antinfiammatorio nel trattamento dei pazienti con COVID-19 [125].

Si è visto che dosi minime di Spike, aggiunte al sangue intero umano in vitro, inducono la produzione di molti tipi di citochine, fattori di crescita, chemochine e citochine chiamate "RANTES" (regolate all'attivazione espresse e secrete da cellule T normali) [126]. Come affermato, la clearance mediata da anticorpi del virus complessato con sACE2 provoca un rapido declino dell'ACE2 circolante. Allo stesso modo, la clearance della Spike libera (e dell'esosoma contenente Spike) provocata dal vaccino mRNA può portare a uno sconvolgimento del RAS che può causare un aumento della pressione sanguigna e reazioni iperinfiammatorie [92,104,113,127,128] (Figura 5).

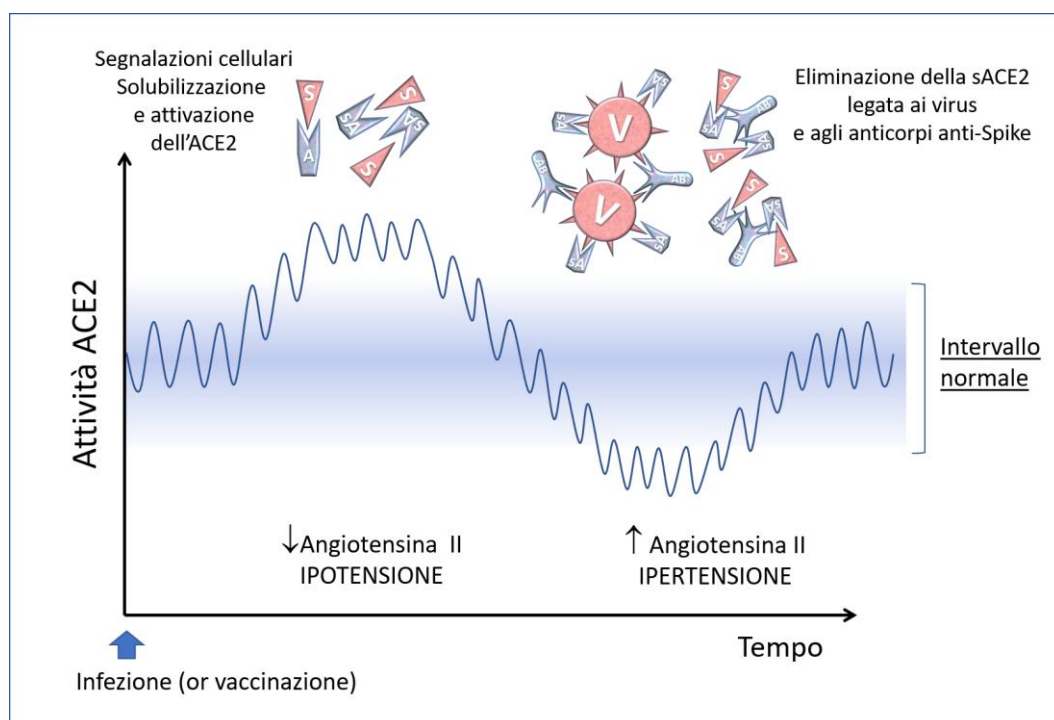


Figura 5. Diagramma concettuale di possibili squilibri nel sistema renina-angiotensina causati dall'interazione di anticorpi con SARS-CoV-2 o proteine Spike derivate dal vaccino. Tratto da [104] di Paolo Bellavite.

Coerentemente con queste teorie, un aumento acuto e significativo della pressione arteriosa è stato riportato come reazione avversa dell'anti-COVID-19 [127]. La crisi ipertensiva può avere conseguenze gravi e persino tragiche, essendo un fattore di rischio consolidato per l'emorragia cerebrale subaracnoidea, aumentando il rischio di 2,6 volte (a confronto, il fumo lo aumenta di 3,1 volte e l'abuso di alcol di 1,5 volte) [129].

Rispetto al vaccino antinfluenzale, i vaccini mRNA COVID-19 hanno un rischio molto più elevato di crisi ipertensive (odds ratio aggiustato 12,72, 95% CI 2,47-65,54) e tachicardia sopraventricolare (odds ratio aggiustato 7,94, 95% CI 2,62-24,00) [30]. Il rischio è quindi fino a 12 volte superiore con il vaccino a mRNA anti-COVID-19 che con il vaccino anti-influenzale.

6. Mimetismo molecolare e anticorpi anti-idiotipo

La proteina Spike presenta alcuni motivi molecolari in comune con le proteine umane, tra cui un tratto di cinque amminoacidi (precisamente TQLPP) con proprietà antigeniche che sono omologhe con una sequenza trovata nella trombopoietina, e il motivo ELDKY che è condiviso con la tropomiosina e con la protein-kinasi cGMP-dipendente di tipo 1 (PRKG1), una chinasi coinvolta nell'attivazione piastrinica e nella regolazione dello ione calcio [37,130].

Il mimetismo molecolare è uno dei meccanismi ipotizzati per spiegare lo sviluppo di malattie autoimmuni. Una preoccupazione importante è se la vaccinazione con mRNA per la produzione della proteina Spike possa determinare una rottura nella tolleranza e nello sviluppo di una malattia autoimmune, a causa del mimetismo molecolare. Il rischio aumenta con somministrazioni frequenti e ravvicinate del vaccino, che sfidano lo stato immunogenico rispetto a tollerogenico del sistema immunitario. In questa condizione, le citochine proinfiammatorie possono alterare il controllo dei circuiti immunoregolatori in modo che le cellule T autoreattive possano diventare efficaci e innescare l'autoimmunità [131]. Inoltre, le "omologie" tra la proteina Spike e le proteine umane sono molto maggiori che per altri virus e batteri, aumentando il rischio di sviluppare malattie autoimmuni.

La questione delle interazioni tra il sistema immunitario e ACE2 (o altri recettori del virus) è ulteriormente complicata se si considera che il sistema immunitario è complesso e dinamico. Ciò è illustrato dalla formazione di anticorpi "anti-idiotipo" (vedi Figura 6).

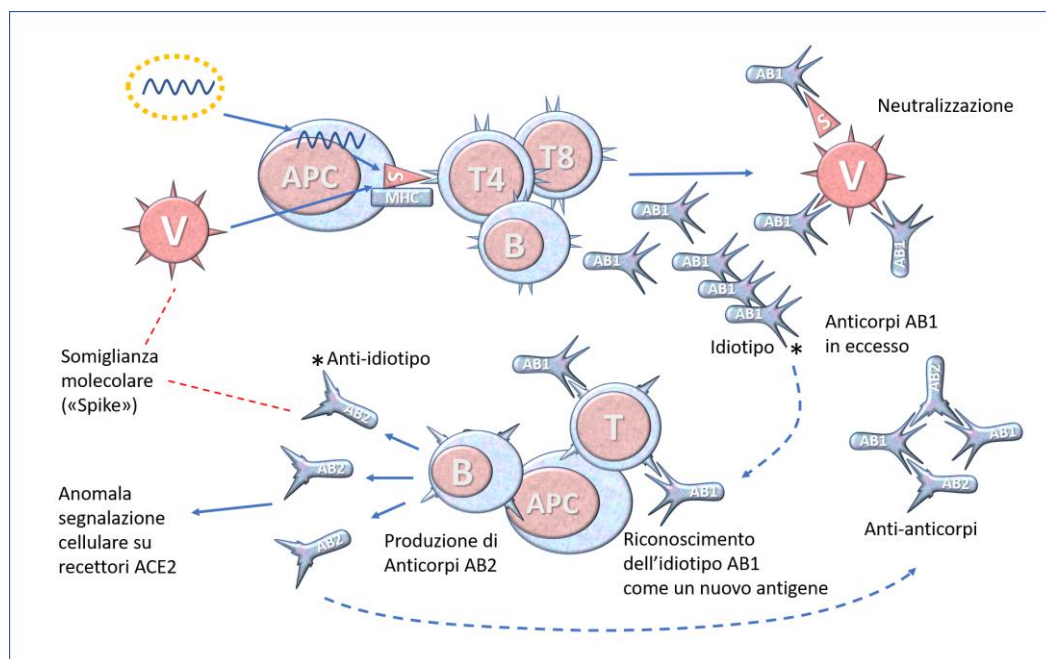


Figura 6. Schema semplificato della formazione di anticorpi anti-idiotipo. Una parte variabile dell'anticorpo (AB1) in grado di legarsi allo Spike è detta idiotipo. Poiché questa parte è una "nuova" proteina all'interno del repertorio di antigeni noti al sistema immunitario, quest'ultimo produce anticorpi (AB2) in risposta all'idiotipo, in grado di riconoscerlo e legarsi ad esso. Questi anticorpi secondari, detti "anti-idiotipo", rappresentano in un certo modo l'immagine interna dell'antigene esterno (Spike) e possono condividerne alcune proprietà biologiche. * Complementarietà molecolare degli idiotipi.

La formazione di anticorpi e linfociti anti-idiotipo è una possibile spiegazione della persistenza dei sintomi tipici del COVID-19 anche dopo che il virus è stato eliminato dall'organismo. In accordo con la consolidata teoria di Jerne [132], questi anticorpi "sembrano" la parte critica dello Spike. Pertanto, gli anticorpi anti-idiotipo (AB2 nella Figura 6), che riflettono l'epitopo Spike, possono legarsi a ACE2 o strutture simili e causare la reazione fisiopatologica sopra descritta.

Anticorpi anti-idiotipo contro ACE2 sono stati trovati nell'81% dei pazienti con COVID-19, ma non nei pazienti non affetti [133]. Gli autori hanno ipotizzato un ruolo di questi anticorpi nello spiegare gli eventi cardiovascolari associati a COVID-19. Questo fenomeno può verificarsi con l'infezione da SARS-CoV-2 così come con i vaccini anti-COVID-19 [134], spiegando almeno in parte la persistenza di reazioni avverse in alcuni individui. È stato anche suggerito che gli anticorpi anti-idiotipo potrebbero legarsi alla neuropilina-1, che è riconosciuta dallo Spike del virus SARS-CoV-2 [135], e questo potrebbe spiegare alcuni effetti avversi neurologici come la neuropatia periferica che si manifesta dopo la vaccinazione con BNT162b2 [136].

7. Il "Boost" e l'immunità addestrata

A causa della rapida perdita di efficacia protettiva indotta dagli attuali vaccini a mRNA, sono state previste somministrazioni multiple con l'idea di dare una "spinta" periodica al sistema immunitario. Le conseguenze di queste ripetute dosi di richiamo nel tempo, a breve, medio e lungo termine non sono note. La valutazione della sicurezza di dosi ripetute di richiamo che stimolano il sistema immunitario dovrebbe considerare anche il funzionamento dell'immunità innata.

Anche le cellule di difesa innata possono sviluppare caratteristiche di memoria immunitaria, un processo chiamato immunità addestrata [137,138]. Si tratta, in altre parole, di una forma di memoria legata alle cellule fagocitarie, diversa da quella anticorpale, che “imparano” da ripetute sollecitazioni con sostanze estranee. Molti insulti infiammatori possono a lungo andare alterare la funzionalità e la reattività del sistema immunitario innato, e questo potrebbe essere rilevante quando gli stimoli vengono reiterati, come nel caso di ripetute vaccinazioni.

Va sottolineato che l'immunità innata ha una memoria a lungo termine a causa della riprogrammazione "epigenetica" della cromatina cellulare e la capacità di una maggiore reattività rimane quando l'infiammazione si risolve [139]. Nei monociti e nei macrofagi, questa riprogrammazione epigenetica è stata associata ad un aumento della produzione di citochine e ad uno spostamento metabolico dalla fosforilazione ossidativa alla glicolisi [140]. Questo potrebbe essere un vantaggio in termini di risposta specifica verso i microbi, ma la stessa immunità addestrata può diventare "disadattativa" in malattie caratterizzate da infiammazione sistemica cronica, come l'aterosclerosi e il cancro [137-140]. Inoltre, anche alcune cellule non immunitarie come le cellule endoteliali e i fibroblasti mostrano caratteristiche immunitarie addestrate, e questo è stato visto anche in relazione all'infezione da coronavirus [141]. A lungo termine, un possibile esito del COVID-19 così come dei ripetuti richiami vaccinali potrebbe essere lo sviluppo di malattia infiammatoria cronica vascolare o l'esacerbazione di una preesistente aterosclerosi. Infatti, quest'ultima è una malattia infiammatoria cronica della parete vascolare che coinvolge anche le cellule fagocitiche monocito-macrofagiche [142] (vedi Figura 7).

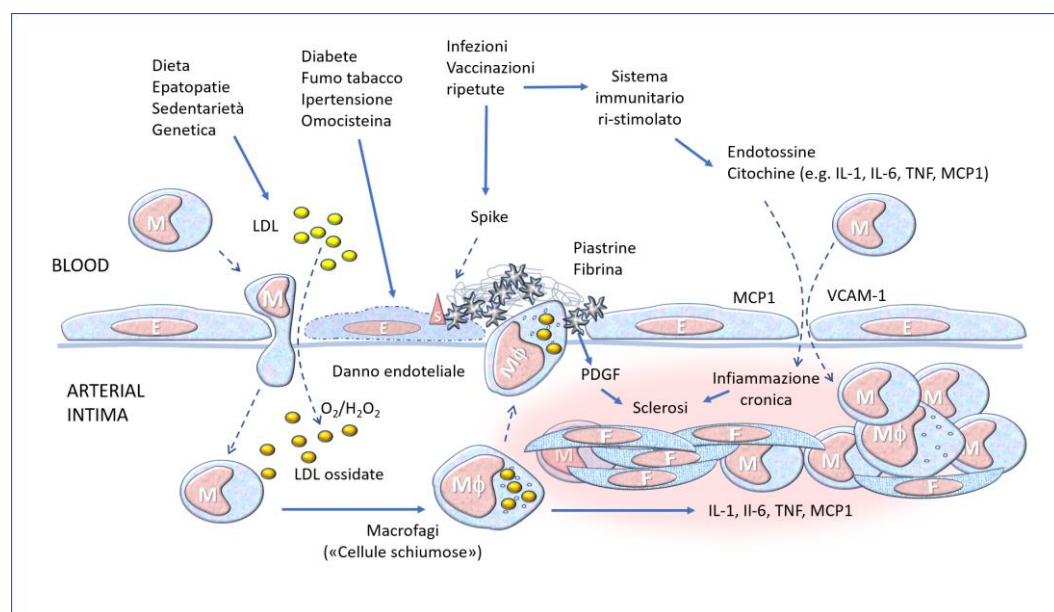


Figura 7. Meccanismi essenziali della patogenesi dell'aterosclerosi, vista come malattia infiammatoria cronica. Una serie di fattori patogeni ben noti (in alto) causano danno alla parete, con sviluppo di una placca fibrosa nel tessuto sotto-endoteliale; su questi si può sovrapporre il “boost” ripetuto della Spike. M: monociti; Mφ: Macrofago; E: cellula endoteliale; F: fibroblasti; LDL: lipoproteine a bassa densità; VCAM-1: proteina di adesione delle cellule vascolari 1; PDGF: fattore di crescita derivato dalle piastrine; TNF: fattore di necrosi tumorale; IL: interleuchina; MCP1: proteina chemiotattica monocitica-1 (CCL2). Freccie linea continua: azione, operazione; freccie tratteggiate: movimento, spostamento.

Pertanto, la somministrazione ripetuta di dosi di richiamo a distanza di alcuni mesi potrebbe avere effetti positivi e desiderabili se rafforzasse un'immunità specifica (anticorpi o cellule T), ma potrebbe avere effetti negativi nello stimolare la capacità reattiva "non specifica" basata sull'immunità allenata delle cellule endoteliali e dei macrofagi. Queste cellule non solo sono in grado di stimolare il sistema linfocitario (cosa auspicabile nel

contesto di un sistema immunitario ben funzionante, tranne nel caso di autoimmunità), ma sono coinvolte anche in molteplici processi patologici caratterizzati da infiammazione cronica, come malattie cardiovascolari, diabete, osteoartriti e altri.

Ulteriori studi e test confermeranno se la somministrazione ripetuta di stimoli vaccinali a lungo termine avrà un impatto negativo sul sistema cardiovascolare. Ciò pone la questione se il rischio di contrarre la malattia virale, che provoca reazioni forti e acute ma lascia un'immunità completa e duratura [143], sia paragonabile al rischio di effetti collaterali della vaccinazione, che dando protezione a breve termine richiede somministrazioni ripetute (ogni 3-5 mesi) e quindi potrebbe scatenare o aggravare patologie infiammatorie croniche.

8. Panoramica e prospettive

I meccanismi attraverso i quali la proteina Spike libera può agire nei sistemi viventi sono riassunti nella Tabella 1.

Tabella 1. Meccanismi molecolari, cellulari e immunologici degli effetti patogeni della proteina Spike libera. Una sinossi degli studi che riportano i possibili effetti clinici e i meccanismi sottostanti, causati dall'espressione della proteina Spike codificata da SARS-CoV-2 o dal vaccino a mRNA. I meccanismi includono l'interazione molecolare della proteina S con peptidi legati alla membrana o solubili (ad es. ACE2, sACE2, CD147, PAF, PF4, TLR), il mimetismo molecolare, l'induzione di autoanticorpi e di anticorpi anti-idiotipo, espressione genica alterata, splicing alternativo e imprinting immunitario (per i dettagli, fare riferimento alle voci citate). PAF, fattore di attivazione piastrinica; PF4, Fattore piastrinico 4; TLR, recettore Toll-like.

Meccanismi molecolari	Meccanismi patogenetici	Possibili effetti clinici	Citazioni
Spike-ACE2	Iperreattività piastrinica e aggregazione	Trombosi	[116,144]
Spike-ACE2	Attivazione delle cellule endoteliali umane e fenotipo pro-infiammatorio	Infiammazione, trombosi	[95]
Spike-ACE2	Inibizione della differenziazione delle cellule staminali emopoietiche	Immunosoppressione	[145]
Spike (S1)-ACE2	Subunità intratracheale S1 della proteina Spike nei topi transgenici hACE2 che sovraesprimono l'ACE2 umano	Permeabilità vascolare polmonare e danno polmonare	[146]
Spike-ACE2	Attivazione delle mastcellule	Infiammazione e danno polmonari	[144]
Spike-ACE2	Stress ossidativo nei periciti, attivazione delle vie di segnalazione del fattore nucleare-kappa-B	Encefalite	[147]
Spike-ACE2	Down-regulation di ACE2 endoteliale ed e-NOS, danno mitocondriale	Polmonite interstiziale	[148]
Spike-ACE2	Diminuzione di interferoni di tipo I in cellule polmonari primarie	Gravità della polmonite	[149]
Spike (S1)-ACE2	Subunità S1 co-localizzata con caspasi-3, ACE2, IL6, TNF α e C5b-9 (endotelio cerebrale di topo)	Infiammazione e neuropatologia	[150]
Spike (S1)-ACE2	La subunità S1 suscita la segnalazione cellulare della via MEK/ERK nelle cellule vascolari polmonari	Ispessimento della parete vascolare polmonare, ipertensione polmonare	[92]
Spike-ACE2	Diminuzione delle papille gustative delle papille circumvallate di ratto	Difetti del gusto	[151]
Spike-ACE2	Perdita di integrità della barriera emato-encefalica umana	Risposta pro-infiammatoria nel cervello	[93,152–155]
Spike (S1)-ACE2	Perdita di integrità delle cellule endoteliali arteriose polmonari umane	Risposta pro-infiammatoria nel polmone	[156]
Spike-sACE2-antibodies	Interiorizzazione di ACE2 solubili e clearance	Crisi ipertensiva, infiammazione, tempesta di bradichinine	[104,113]

Spike-CD147	Segnalazione cellulare nei periciti cardiaci umani, secrezione di citochine, apoptosi	Danno microvascolare cardiaco [157]
Spike-CD147	Attivazione delle piastrine	Trombosi, infiammazione [158]
Spike-PAF	Aumento dell'aggregazione piastrinica indotta da PAF in vitro e stimolazione della produzione di PAF in cellule di linea mieloide	Sindromi infiammatorie, long COVID-19 [159]
Mimetismo molecolare	Cross-reazione degli anticorpi anti-Spike con il pericardio	Pericardite [130,160]
Mimetismo molecolare	Cross-reazione degli anticorpi anti-Spike con la trombopoietina e con la tropomiosina	Trombocitopenia, miocardite [37,161]
Autoanticorpi anti-Spike	Infiammazione alla tiroide	Tiroidite subacuta [162]
Interazione Spike-PF4	Generazione di anticorpi anti-PF4 e legame con l'ACE2 piastrinico	Trombosi con trombocitopenia [163]
Anticorpi anti-PF4	Attivazione e aggregazione piastrinica	Trombosi con trombocitopenia [164,165]
Anti-idiotipo	L'anti-idiotipo (AB2) si legherebbe ad ACE2 e/o alla neuropilina-1	Sintomi COVID-19-like [134,136]
Espressione genica	Diminuzione di ACE2 e aumento di ACE	Infiammazione, miocardite [166]
Spike-TLR4	La proteina S attiva i TLR e induce citochine infiammatorie	Peggioramento delle malattie infiammatorie [167]
Imprinting immunitario ("peccato originale antigenico")	La memoria immunitaria del vaccino contro la proteina S della variante originale inibisce la risposta a nuovi epitopi di SARS-CoV-2	Maggiore suscettibilità alle varianti COVID-19 [168]

Inoltre, dovrebbero essere considerati altri meccanismi che potrebbero contribuire ai disturbi cardiovascolari associati al vaccino COVID-19 [169]. È stato ipotizzato che la vaccinazione contro il COVID-19 possa aggravare una preesistente autoimmunità specifica T-mediata del cuore. L'infiltrazione di linfociti T CD3+ è stata segnalata nella miocardite acuta dopo la vaccinazione con BNT162b2 mRNA COVID-19 [170]. Dovrebbe essere considerato anche un ruolo degli ormoni sessuali sull'infiammazione del miocardio dopo l'infezione da COVID-19 o la vaccinazione dell'mRNA, dato che il testosterone e gli estrogeni suscitano effetti opposti sulla risposta delle cellule T.

Questi meccanismi non sono indipendenti e possono sovrapporsi e agire sinergicamente. Si apre così un nuovo capitolo della vaccinologia, forse inaspettato per gli stessi inventori dei vaccini, che andrebbe approfondito poiché le patologie associate hanno un enorme impatto sulla valutazione del rischio da vaccino. Inoltre, la conoscenza dei fattori meccanicistici coinvolti nel danno da vaccino potrebbe aiutare ad allestire una migliore diagnostica (ad es. D-dimero, misurazione dell'istamina o della triptasi, della troponina, schemi di citochine plasmatiche, misurazione accurata della pressione sanguigna, valutazione del rischio genetico, ecc.) e più appropriati e tempestivi interventi terapeutici.

8.1. Valutazione di causalità

L'immunizzazione con i vaccini mRNA COVID-19 è particolarmente impegnativa per il sistema immunitario e ha importanti riflessi sulla fisiopatologia del sistema cardiovascolare perché: 1. Non si tratta di vaccini tradizionali, ma si comportano invece come profarmaci immunomodulatori che vengono "metabolizzati" per produrre l'antigene attivo in una quantità imprevedibile, in siti imprevedibili (tessuto, tipo di cellula) e per periodi di tempo imprevedibili. 2. La proteina Spike codificata non è semplicemente un antigene; invece, è un modulatore attivo del RAS. 3. La proteina Spike codificata può non risiedere sulla membrana delle cellule trasfettate, ma può invece essere rilasciata in forma libera o legata agli esosomi e viaggiare in siti distanti dal sito di sintesi.

Le considerazioni di cui sopra sono importanti quando si valuta la causa di qualsiasi evento avverso dopo la vaccinazione che coinvolga il sistema cardiovascolare, come arresto cardiaco, ictus, emorragia e shock. Il nesso correlativo non implica necessariamente un nesso causativo. A questo proposito, l'OMS ha elaborato delle linee guida per la valutazione della causalità di un evento avverso successivo alla vaccinazione in cui dovrebbero essere considerate tutte le "altre possibili cause" che potrebbero aver portato all'evento [171,172]. L'anamnesi e gli esami clinici del paziente insieme ai dati di laboratorio aiutano a identificare altre malattie o anomalie congenite che potrebbero aver causato l'evento, che non siano in qualche modo correlabili.

Oltre all'assenza di un'altra causa "forte" non correlata al possibile effetto del vaccino e alla presenza di una correlazione temporale, è molto importante la plausibilità della spiegazione del possibile effetto patogeno del vaccino [40]. Ad esempio, un improvviso aumento della pressione sanguigna potrebbe essere fatale nelle persone con aneurismi cerebrali, un problema aggravato da una possibile trombocitopenia. Per questo motivo è fondamentale comprendere i meccanismi di azione della proteina Spike, soprattutto in caso di effetti imprevisti e inspiegabili sulla base delle conoscenze accumulate con i precedenti vaccini "convenzionali".

Come esempio delle difficoltà di una genuina valutazione della correlazione, si considerino i risultati contenuti nel rapporto sulla sperimentazione del vaccino BNT162b2 della durata di 6 mesi [173]. Si legge che durante il periodo di studio, 15 partecipanti sono morti nel gruppo trattato con vaccino e 14 nel gruppo trattato con placebo e che, secondo i ricercatori, nessuno di questi decessi era correlato a BNT162b2 o al placebo. Tuttavia, a un esame più attento, la tabella S4 di quel documento [173] mostra che tra i decessi nel gruppo trattato con vaccino, quattro erano dovuti ad "arresto cardiaco" e due ad "aterosclerosi", mentre nel gruppo trattato con placebo i decessi a causa di queste due condizioni erano rispettivamente 1 e 0. Il fatto che le proteine Spike derivate dal vaccino possano avere un'influenza disregolatoria sulla RAS implica che, nel caso di pazienti con malattie cardiovascolari e della coagulazione, un'interazione tra il vaccino e la condizione sottostante è del tutto plausibile e non dovrebbe essere scartata.

8.2. Implicazioni diagnostiche e terapeutiche

La conoscenza della complessità e della varietà delle reazioni evidenziate dall'uso dei vaccini a base di proteine Spike suggerisce una maggiore attenzione all'individualizzazione della somministrazione del vaccino. Il paradigma della vaccinazione di massa, a prescindere dalla valutazione individuale dei benefici e dei rischi attesi dall'immunizzazione, potrebbe essere stata comprensibile (se non accettabile) all'inizio di una campagna vaccinale di emergenza, ma ora è necessario un approccio attento e personalizzato così come lo è stato proposto per altri vaccini [174,175].

La conoscenza delle interazioni molecolari della proteina Spike e del suo impatto sull'omeostasi dell'organismo può aiutare a migliorare l'attività diagnostica pre-vaccinale. Ad esempio, la pressione arteriosa, i parametri della coagulazione, la presenza di fattori di rischio potenzialmente interagenti come quelli sopra menzionati (Figura 7) e la suscettibilità genetica alle malattie infiammatorie e autoimmuni dovrebbero essere attentamente valutate.

Come per i vaccini tradizionali, sarebbe possibile sviluppare un programma per la rilevazione sistematica degli effetti avversi e associarli alle caratteristiche immunogenetiche e cardiovascolari, per costruire una mappa predittiva dei rischi [176,177]. Sarebbe importante valutare i diversi pattern di citochine, che potrebbero determinare la maggiore o minore reazione sistemica alla vaccinazione, come riportato dopo l'immunizzazione contro il vaiolo [178-181]. È stato chiaramente stabilito che alcune caratteristiche del background genetico, come le citochine o i polimorfismi ACE2, possono potenzialmente spiegare la grande variazione interindividuale della malattia COVID-19 [182]. È quindi plausibile che lo sviluppo di test finalizzati all'identificazione di varianti specifiche di ACE2 possa essere una strategia per valutare anche il rischio di reazione avversa alla

vaccinazione. Inoltre, la consapevolezza del rischio cardiovascolare legato alle reazioni avverse ai vaccini può far scattare il sospetto diagnostico in caso di sintomi vaghi e aspecifici. Ad esempio, il dosaggio della troponina è un valido marker di danno cardiaco e potrebbe essere informativo anche in caso di autopsia, purché eseguita entro 48 ore dalla morte [183].

Soprattutto, le terapie per le reazioni avverse più gravi devono essere basate sulla piena comprensione dei meccanismi coinvolti. Ad esempio, se si sospetta uno squilibrio nel sistema RAS, si potrebbe prendere in considerazione l'uso di inibitori dell'angiotensina II o della bradichinina; se si sospetta un'implicazione di coagulazione del sangue prevalente dai sintomi o da un aumento del D-dimero, si potrebbe prendere in considerazione l'uso di inibitori dell'aggregazione piastrinica o anticoagulanti; se si osservano manifestazioni allergiche o orticarioidi (dovute al coinvolgimento dei mastociti, con possibile osservazione di un aumento dell'istamina o della triptasi), si potrebbe prendere in considerazione l'uso di antistaminici; se l'ipotesi patogenetica prevalente si focalizza sull'autoimmunità in caso di gravi patologie neurologiche, potrebbe essere indicato l'uso di corticosteroidi o immunosoppressori.

Data l'azione patogena simile del SARS-CoV-2 e della proteina Spike codificata dall'mRNA del vaccino, sembra plausibile che molecole in grado di bloccare il legame del virus ai recettori ACE2 possano anche prevenire o contrastare gli eventi avversi della vaccinazione. È stata identificata una varietà di molecole naturali e sintetiche in grado di legarsi al frammento RBD della Spike e all'ACE2 [184-191]. L'utilità di queste molecole o di altre con proprietà immunomodulanti (farmaci antiallergici o anti-citochine) nella prevenzione o nel trattamento delle reazioni avverse ai vaccini dovrebbe essere valutata attraverso opportuni studi clinici randomizzati. Infine, un approccio razionale sarebbe quello di sfruttare la tecnologia "omica" per la progettazione di vaccini più efficaci e sicuri, nonché per comprendere le cause meccanicistiche degli effetti avversi del vaccino per una migliore valutazione personalizzata del rapporto beneficio/rischio della vaccinazione [40,174,175].

Contributo degli Autori: PB e CI concettualizzazione, editing finale e armonizzazione; PB e A.F. disegni delle figure; PB, AF e CI hanno redatto il manoscritto in collaborazione. Tutti gli autori hanno letto e accettato la versione pubblicata del manoscritto.

Finanziamenti: Questa ricerca non ha ricevuto finanziamenti esterni.

Potenziali conflitti di interesse: PB svolge una consulenza con Vanda Omeopatici s.r.l. (Roma, Frascati), azienda che produce integratori alimentari. Gli altri autori non hanno potenziali interessi concorrenti.

Abbreviazioni

Effetti avversi a seguito di immunizzazione, AEFI; enzima di conversione dell'angiotensina 2, ACE2; angiotensina, At; anticorpo, AB; citotossicità cellulare anticorpo-dipendente, ADCC; cellule presentanti l'antigene, APC; malattia da coronavirus 2019, COVID-19; coronavirus, CoV; modelli molecolari associati al danno, DAMP; involucro, proteina E; antigene leucocitario umano, HLA; immunoglobulina, Ig; interferone, IFN; interleuchina, IL; nanoparticelle lipidiche, LNP; lipoproteine a bassa densità, LDL; complesso maggiore di istocompatibilità, MHC; membrana, proteina M; proteina chemiotattica dei monociti-1, MCP1; nucleocapside, proteina N; modelli molecolari associati ai patogeni, PAMP; recettori per il riconoscimento di schemi, PRR; fattore attivante piastrinico, PAF; fattore piastrinico 4, PF4; fattore di crescita derivato dalle piastrine, PDGF; dominio di legame del recettore, RBD; motivo di legame del recettore, RBM; regolato all'attivazione, cellule T normali espresse e secrete; RANTES; sistema renina-angiotensina, RAS; sindrome respiratoria acuta grave, SARS; ACE2 solubile, sACE2; punta, proteina S; Recettori Toll-like, TLR; rete trans-Golgi, TGN; fattore di necrosi tumorale, TNF; proteina di adesione delle cellule vascolari 1, VCAM-1; organizzazione mondiale della sanità, OMS.

Bibliografia

1. Petrosillo, N.; Viceconte, G.; Ergonul, O.; Ippolito, G.; Petersen, E. COVID-19, SARS and MERS: Are they closely related? *Clin. Microbiol. Infect.* **2020**, *26*, 729–734.
2. Zhang, H.; Penninger, J.M.; Li, Y.; Zhong, N.; Slutsky, A.S. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: Molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Med.* **2020**, *46*, 586–590.
3. Lamers, M.M.; Beumer, J.; Van Der Vaart, J.; Knoops, K.; Puschhof, J.; Breugem, T.I.; Ravelli, R.B.G.; Paul van Schayck, J.; Mykytyn, A.Z.; Duimel, H.Q.; et al. SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes. *Science* **2020**, *369*, 50–54.
4. Ortiz, M.E.; Thurman, A.; Pezzulo, A.A.; Leidinger, M.R.; Klesney-Tait, J.A.; Karp, P.H.; Tan, P.; Wohlford-Lenane, C.; McCray, P.B.; Meyerholz, D.K. Heterogeneous expression of the SARS-Coronavirus-2 receptor ACE2 in the human respiratory tract. *Ebiomedicine* **2020**, *60*, 102976–102976, <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102976>.
5. Verdecchia, P.; Cavallini, C.; Spanevello, A.; Angeli, F. COVID-19: ACE2centric Infective Disease? *Hypertension* **2020**, *76*, 294–299.
6. Jackson, C.B.; Farzan, M.; Chen, B.; Choe, H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2022**, *23*, 3–20. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>.
7. Heinz, F.X.; Stiasny, K. Profile of SARS-CoV-2. *Wien. Klin. Wochenschr.* **2020**, *132*, 635–644.
8. Juibari, A.D.; Rezaadoost, M.H.; Soleimani, M. The key role of Calpain in COVID-19 as a therapeutic strategy. *Inflammopharmacology* **2022**, *30*, 1479–1491, <https://doi.org/10.1007/s10787-022-01002-1>.
9. Zhao, H.; Meng, X.; Peng, Z.; Lam, H.; Zhang, C.; Zhou, X.; Chan, J.F.; Kao, R.Y.T.; To, K.K.; Yuen, K.Y. Fusion-inhibition peptide broadly inhibits influenza virus and SARS-CoV-2, including Delta and Omicron variants. *Emerg. Microbes Infect.* **2022**, *11*, 926–937.
10. Willett, B.J.; Grove, J.; MacLean, O.A.; Wilkie, C.; De Lorenzo, G.; Furnon, W.; Cantoni, D.; Scott, S.; Logan, N.; Ashraf, S.; et al. SARS-CoV-2 Omicron is an immune escape variant with an altered cell entry pathway. *Nat. Microbiol.* **2022**, *7*, 1161–1179.
11. Rauch, S.; Jasny, E.; Schmidt, K.E.; Petsch, B. New Vaccine Technologies to Combat Outbreak Situations. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1963, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01963>.
12. Pardi, N.; Hogan, M.J.; Porter, F.W.; Weissman, D. mRNA vaccines—A new era in vaccinology. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *17*, 261–279, <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.243>.
13. Forchette, L.; Sebastian, W.; Liu, T. A Comprehensive Review of COVID-19 Virology, Vaccines, Variants, and Therapeutics. *Curr. Med. Sci.* **2021**, *41*, 1037–1051, <https://doi.org/10.1007/s11596-021-2395-1>.
14. Heinz, F.X.; Stiasny, K. Distinguishing features of current COVID-19 vaccines: Knowns and unknowns of antigen presentation and modes of action. *NPJ Vaccines* **2021**, *6*, 1–13, <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00369-6>.
15. Wilder-Smith, A. What is the vaccine effect on reducing transmission in the context of the SARS-CoV-2 delta variant? *Lancet Infect. Dis.* **2022**, *22*, 152–153.
16. Singanayagam, A.; Hakki, S.; Dunning, J.; Madon, K.J.; Crone, M.A.; Koycheva, A.; Derqui-Fernandez, N.; Barnett, J.L.; Whitfield, M.G.; Varro, R.; et al. Community transmission and viral load kinetics of the SARS-CoV-2 delta (B.1.617.2) variant in vaccinated and unvaccinated individuals in the UK: A prospective, longitudinal, cohort study. *Lancet Infect. Dis.* **2022**, *22*, 183–195, [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(21\)00648-4](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(21)00648-4).
17. Solante, R.; Alvarez-Moreno, C.; Burhan, E.; Chariyalertsak, S.; Chiu, N.-C.; Chuenkitmongkol, S.; Dung, D.V.; Hwang, K.-P.; Ibarra, J.O.; Kiertiburanakul, S.; et al. Expert review of global real-world data on COVID-19 vaccine booster effectiveness and safety during the omicron-dominant phase of the pandemic. *Expert Rev. Vaccines* **2022**, *22*, 1–16, <https://doi.org/10.1080/14760584.2023.2143347>.
18. Addo, I.Y.; Dadzie, F.A.; Okeke, S.R.; Boadi, C.; Boadu, E.F. Duration of immunity following full vaccination against SARS-CoV-2: A systematic review. *Arch. Public Health* **2022**, *80*, 200.
19. Kerr, S.; Bedston, S.; Bradley, D.T.; Joy, M.; Lowthian, E.; Mulholland, R.M.; Akbari, A.; Hobbs, F.D.R.; Katikireddi, S.V.; de Lusignan, S.; et al. Waning of first- and second-dose ChAdOx1 and BNT162b2 COVID-19 vaccinations: A pooled target trial study of 12.9 million individuals in England, Northern Ireland, Scotland and Wales. *Int. J. Epidemiol.* **2022**, <https://doi.org/10.1093/ije/dyac199>.
20. Liu, J.; Wang, J.; Xu, J.; Xia, H.; Wang, Y.; Zhang, C.; Chen, W.; Zhang, H.; Liu, Q.; Zhu, R.; et al. Comprehensive investigations revealed consistent pathophysiological alterations after vaccination with COVID-19 vaccines. *Cell Discov.* **2021**, *7*, 99, <https://doi.org/10.1038/s41421-021-00329-3>.
21. Yamamoto, K. Adverse effects of COVID-19 vaccines and measures to prevent them. *Viol. J.* **2022**, *19*, 100, <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01831-0>.
22. Trougakos, I.P.; Terpos, E.; Alexopoulos, H.; Politou, M.; Paraskevis, D.; Scorilas, A.; Kastiris, E.; Andreakos, E.; Dimopoulos, M.A. Adverse effects of COVID-19 mRNA vaccines: The spike hypothesis. *Trends Mol. Med.* **2022**, *28*, 542–554, <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2022.04.007>.
23. Kouhpayeh, H.; Ansari, H. Adverse events following COVID-19 vaccination: A systematic review and meta-analysis. *Int. Immunopharmacol.* **2022**, *109*, 108906, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.108906>.
24. Cosentino, M.; Marino, F. Understanding the Pharmacology of COVID-19 mRNA Vaccines: Playing Dice with the Spike? *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 10881.
25. Zhou, W.; Tang, B.; Bai, Y.; Shao, Y.; Xiao, Y.; Tang, S. The resurgence risk of COVID-19 in China in the presence of immunity waning and ADE: A mathematical modelling study. *Vaccine* **2022**, *40*, 7141–7150, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.10.043>.

26. Ozbay Kurt, F.G.; Lepper, A.; Gerhards, C.; Roemer, M.; Lasser, S.; Arkhypov, I.; Bitsch, R.; Bugert, P.; Altevogt, P.; Gouttefangeas, C.; et al. Booster dose of mRNA vaccine augments waning T cell and antibody responses against SARS-CoV-2. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 1012526.
27. Karlstad, .; Hovi, P.; Husby, A.; Härkänen, T.; Selmer, R.M.; Pihlström, N.; Hansen, J.V.; Nohynek, H.; Gunnes, N.; Sundström, A.; et al. SARS-CoV-2 Vaccination and Myocarditis in a Nordic Cohort Study of 23 Million Residents. *JAMA Cardiol.* **2022**, *7*, 600, <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2022.0583>.
28. Sun, C.L.F.; Jaffe, E.; Levi, R. Increased emergency cardiovascular events among under-40 population in Israel during vaccine rollout and third COVID-19 wave. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 6978, <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10928-z>.
29. Athyros, V.G.; Doumas, M. A Possible Case of Hypertensive Crisis With Intracranial Haemorrhage After an mRNA Anti-COVID-19 Vaccine. *Angiology* **2022**, *73*, 87–87, <https://doi.org/10.1177/00033197211018323>.
30. Kim, M.S.; Jung, S.Y.; Ahn, J.G.; Park, S.J.; Shoenfeld, Y.; Kronbichler, A.; Koyanagi, A.; Dragioti, E.; Tizaoui, K.; Hong, S.H.; et al. Comparative safety of mRNA COVID-19 vaccines to influenza vaccines: A pharmacovigilance analysis using WHO international database. *J. Med. Virol.* **2021**, *94*, 1085–1095, <https://doi.org/10.1002/jmv.27424>.
31. Almas, T.; Rehman, S.; Mansour, E.; Khedro, T.; Alansari, A.; Malik, J.; Alshareef, N.; Nagarajan, V.R.; Al-Awaid, A.H.; Al-sufyani, R.; et al. Epidemiology, clinical ramifications, and cellular pathogenesis of COVID-19 mRNA-vaccination-induced adverse cardiovascular outcomes: A state-of-the-heart review. *Biomed. Pharmacother.* **2022**, *149*, 112843.
32. Shafiq, A.; Salameh, M.A.; Laswi, I.; Mohammed, I.; Mhaimeed, O.; Mhaimeed, N.; Mhaimeed, N.; Paul, P.; Mushannen, M.; Elshafeey, A.; et al. Neurological Immune-Related Adverse Events After COVID-19 Vaccination: A Systematic Review. *J. Clin. Pharmacol.* **2021**, *62*, 291–303, <https://doi.org/10.1002/jcph.2017>.
33. Afshar, Z.M.; Sharma, A.; Babazadeh, A.; Alizadeh-Khatir, A.; Sio, T.T.; Moghadam, M.A.T.; Pirzaman, A.T.; Mojadad, A.; Hossainzadeh, R.; Barary, M.; et al. A review of the potential neurological adverse events of COVID-19 vaccines. *Acta Neurol. Belg.* **2022**, 1–36, <https://doi.org/10.1007/s13760-022-02137-2>.
34. Pour Mohammad, A.; Mashayekhi, F.; Seirafianpour, F.; Gholizadeh Mesgarha, M.; Goodarzi, A. COVID-19 and COVID-19 vaccine-related dermatological reactions: An interesting case series with a narrative review of the potential critical and non-critical mucocutaneous adverse effects related to virus, therapy, and the vaccination. *Clin. Case Rep.* **2022**, *10*, e05775.
35. Mahroum, N.; Lavine, N.; Ohayon, A.; Seida, R.; Alwani, A.; Alrais, M.; Zoubi, M.; Bragazzi, N.L. COVID-19 Vaccination and the Rate of Immune and Autoimmune Adverse Events Following Immunization: Insights From a Narrative Literature Review. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 872683, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.872683>.
36. Mingot-Castellano, M.E.; Butta, N.; Canaro, M.; Gomez Del Castillo Solano, M.D.C.; Sánchez-González, B.; Jiménez-Bárceñas, R.; Pascual-Izquierdo, C.; Caballero-Navarro, G.; Ureña, L.E.; González-López, T.J.; et al. COVID-19 Vaccines and Autoimmune Hematologic Disorders. *Vaccines* **2022**, *10*, 961, <https://doi.org/10.3390/vaccines10060961>.
37. Nunez-Castilla, J.; Stebliankin, V.; Baral, P.; Balbin, C.A.; Sobhan, M.; Cickovski, T.; Mondal, A.M.; Narasimhan, G.; Chapagain, P.; Mathee, K.; Silberg-Liberles, J. Potential Autoimmunity Resulting from Molecular Mimicry between SARS-CoV-2 Spike and Human Proteins. *Viruses* **2022**, *14*, 1415.
38. Crawford, N.W.; Clothier, H.; Hodgson, K.; Selvaraj, G.; Easton, M.L.; Buttery, J.P. Active surveillance for adverse events following immunization. *Expert Rev. Vaccines* **2014**, *13*, 265–276, <https://doi.org/10.1586/14760584.2014.866895>.
39. Shimabukuro, T.T.; Nguyen, M.; Martin, D.; DeStefano, F. Safety monitoring in the Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS). *Vaccine* **2015**, *33*, 4398–4405, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.07.035>.
40. Bellavite, P. Causality assessment of adverse events following immunization: The problem of multifactorial pathology. *F1000Res* **2020**, *9*, 170.
41. Bellavite, P.; Donzelli, A. Adverse events following measles-mumps-rubella-varicella vaccine: An independent perspective on Italian pharmacovigilance data. *F1000Res* **2020**, *9*, 1176.
42. Rosner, C.M.; Genovese, L.; Tehrani, B.N.; Atkins, M.; Bakhshi, H.; Chaudhri, S.; Damluji, A.A.; de Lemos, J.A.; Desai, S.S.; Emamina, A.; et al. Myocarditis Temporally Associated With COVID-19 Vaccination. *Circulation* **2021**, *144*, 502–505, <https://doi.org/10.1161/circulationaha.121.055891>.
43. Sulemankhil, I.; Abdelrahman, M.; Negi, S.I. Temporal Association Between the COVID-19 Ad26.COVS Vaccine and Acute Myocarditis: A Case Report and Literature Review. *Cardiovasc. Revasc. Med.* **2022**, *38*, 117–123, <https://doi.org/10.1016/j.car-rev.2021.08.012>.
44. Patone, M.; Mei, X.W.; Handunnetthi, L.; Dixon, S.; Zaccardi, F.; Shankar-Hari, M.; Watkinson, P.; Khunti, K.; Harnden, A.; Coupland, C.A.; et al. Risk of Myocarditis After Sequential Doses of COVID-19 Vaccine and SARS-CoV-2 Infection by Age and Sex. *Circulation* **2022**, *146*, 743–754, <https://doi.org/10.1161/circulationaha.122.059970>.
45. Evans, J.P.; Liu, S.L. Role of host factors in SARS-CoV-2 entry. *J. Biol. Chem.* **2021**, *297*, 100847.
46. Campbell, R.A.; Boilard, E.; Rondina, M.T. Is there a role for the ACE2 receptor in SARS-CoV-2 interactions with platelets? *J. Thromb. Haemost.* **2021**, *19*, 46–50.
47. Bugatti, A.; Filippini, F.; Bardelli, M.; Zani, A.; Chiodelli, P.; Messali, S.; Caruso, A.; Caccuri, F. SARS-CoV-2 Infects Human ACE2-Negative Endothelial Cells through an alphavbeta3 Integrin-Mediated Endocytosis Even in the Presence of Vaccine-Elicited Neutralizing Antibodies. *Viruses* **2022**, *14*, 705.
48. Malone, R.W.; Felgner, P.L.; Verma, I.M. Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 6077–81.

49. Seneff, S.; Nigh, G.; Kyriakopoulos, A.M.; McCullough, P.A. Innate immune suppression by SARS-CoV-2 mRNA vaccinations: The role of G-quadruplexes, exosomes, and MicroRNAs. *Food Chem. Toxicol.* **2022**. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113008>.
50. Hou, X.; Zaks, T.; Langer, R.; Dong, Y. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nat. Rev. Mater.* **2021**, *6*, 1078–1094. <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00358-0>.
51. Karikó, K.; Buckstein, M.; Ni, H.; Weissman, D. Suppression of RNA Recognition by Toll-like Receptors: The Impact of Nucleoside Modification and the Evolutionary Origin of RNA. *Immunity* **2005**, *23*, 165–175. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.06.008>.
52. De Beuckelaer, A.; Pollard, C.; Van Lint, S.; Roose, K.; Van Hoecke, L.; Naessens, T.; Udhayakumar, V.K.; Smet, M.; Sanders, N.; Lienenklaus, S.; et al. Type I Interferons Interfere with the Capacity of mRNA Lipoplex Vaccines to Elicit Cytolytic T Cell Responses. *Mol. Ther.* **2016**, *24*, 2012–2020. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.161>.
53. Andries, O.; Mc Cafferty, S.; De Smedt, S.C.; Weiss, R.; Sanders, N.N.; Kitada, T. N1-methylpseudouridine-incorporated mRNA outperforms pseudouridine-incorporated mRNA by providing enhanced protein expression and reduced immunogenicity in mammalian cell lines and mice. *J. Control Release* **2015**, *217*, 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.08.051>.
54. Park, J.W.; Lagniton, P.N.; Liu, Y.; Xu, R.-H. mRNA vaccines for COVID-19: What, why and how. *Int. J. Biol. Sci.* **2021**, *17*, 1446–1460. <https://doi.org/10.7150/ijbs.59233>.
55. Kyriakopoulos, A.M.; McCullough, P.A. Synthetic mRNAs; Their Analogue Caps and Contribution to Disease. *Diseases* **2021**, *9*, 57. <https://doi.org/10.3390/diseases9030057>.
56. Orlandini von Niessen, A.G.; Poleganov, M.A.; Rechner, C.; Plaschke, A.; Kranz, L.M.; Fesser, S.; Diken, M.; Löwer, M.; Vallazza, B.; Beissert, T.; et al. Improving mRNA-Based Therapeutic Gene Delivery by Expression-Augmenting 3' UTRs Identified by Cellular Library Screening. *Mol. Ther.* **2019**, *27*, 824–836.
57. McKernan K.; Kyriakopoulos, A.M.; McCullough, P.A. Differences in Vaccine and SARS-CoV-2 Replication Derived mRNA: Implications for Cell Biology and Future Disease. 2021, Pre-print. <https://doi.org/10.31219/osf.io/bcsa6>.
58. Mauro, V.P.; Chappell, S.A. A critical analysis of codon optimization in human therapeutics. *Trends Mol. Med.* **2014**, *20*, 604–613. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.09.003>.
59. Ogata, A.F.; Cheng, C.-A.; Desjardins, M.; Senussi, Y.; Sherman, A.C.; Powell, M.; Novack, L.; Von, S.; Li, X.; Baden, L.R.; et al. Circulating Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Vaccine Antigen Detected in the Plasma of mRNA-1273 Vaccine Recipients. *Clin. Infect. Dis.* **2022**, *74*, 715–718. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab465>.
60. Roltgen, K.; Nielsen, S.C.A.; Silva, O.; Younes, S.F.; Zaslavsky, M.; Costales, C.; Yang, F.; Wirz, O.F.; Solis, D.; Hoh, R.A.; et al. Immune imprinting, breadth of variant recognition, and germinal center response in human SARS-CoV-2 infection and vaccination. *Cell* **2022**, *185*, 1025–1040.e14.
61. Fertig, T.E.; Chitoiu, L.; Marta, D.S.; Ionescu, V.-S.; Cismasiu, V.B.; Radu, E.; Angheluta, G.; Dobre, M.; Serbanescu, A.; Hinescu, M.E.; et al. Vaccine mRNA Can Be Detected in Blood at 15 Days Post-Vaccination. *Biomedicines* **2022**, *10*, 1538. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071538>.
62. Castruita, J.A.S.; Vest Schneider, U.; Mollerup, S.; Leineweber, T.D.; Weis, N.; Bukh, J.; Pedersen, M.S.; Westh, H. SARS-CoV -2 spike mRNA vaccine sequences circulate in blood up to 28 days after COVID -19 vaccination. *APMIS* **2023**, *Epub ahead of print*, <https://doi.org/10.1111/apm.13294>.
63. Shrestha, N.K.; Burke, P.C.; Nowacki, A.S.; Simon, J.F.; Hagen, A.; Gordon, S.M.. Effectiveness of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Bivalent Vaccine. *medRxiv* **2022**. <https://doi.org/10.1101/2022.12.17.22283625>.
64. Wagenhäuser I., Reusch, J., Gabel, A., Krone, L.B., Kurzai, O., Petri, N., Krone, M. Bivalent BNT162b2mRNA original/Omicron BA.4-5 booster vaccination: Adverse reactions and inability to work compared to the monovalent COVID-19 booster. *medRxiv* **2022**. <https://doi.org/10.1101/2022.11.07.22281982>.
65. Hwang, I. Cell-cell communication via extracellular membrane vesicles and its role in the immune response. *Mol. Cells* **2013**, *36*, 105–111. <https://doi.org/10.1007/s10059-013-0154-2>.
66. Bansal, S.; Perincheri, S.; Fleming, T.; Poulson, C.; Tiffany, B.; Bremner, R.M.; Mohanakumar, T.. Cutting Edge: Circulating Exosomes with COVID Spike Protein Are Induced by BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) Vaccination prior to Development of Antibodies: A Novel Mechanism for Immune Activation by mRNA Vaccines. *J. Immunol.* **2021**, *207*, 2405–2410.
67. Hu, W.; Pasare, C. Location, location, location: Tissue-specific regulation of immune responses. *J. Leukoc. Biol.* **2013**, *94*, 409–421. <https://doi.org/10.1189/jlb.0413207>.
68. Horwitz, D.A.; Zheng, S.G.; Gray, J.D. Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+)CD4(+) CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other. *Trends Immunol.* **2008**, *29*, 429–35.
69. Sterlin, D.; Mathian, A.; Miyara, M.; Mohr, A.; Anna, F.; Claer, L.; Quentric, P.; Fadlallah, J.; Devilliers, H.; Ghillani, P.; et al. IgA dominates the early neutralizing antibody response to SARS-CoV-2. *Sci Transl Med* **2021**;13.
70. Drummer, H.E.; Van, H.; Klock, E.; Zheng, S.; Wei, Z.; Boo, I.; Center, R.J.; Li, F.; Bhat, P.; Ffrench, R.; et al. Dimeric IgA is a specific biomarker of recent SARS-CoV-2 infection. *medRxiv* **2021**. <https://doi.org/10.1101/2021.06.28.21259671>.
71. Wang, Z.; Lorenzi, J.C.C.; Muecksch, F.; Finklin, S.; Viant, C.; Gaebler, C.; Cipolla, M.; Hoffmann, H.H.; Oliveira, T.Y.; Oren, D.A.; et al. Enhanced SARS-CoV-2 neutralization by dimeric IgA. *Sci. Transl. Med.* **2021**, *13*, eabf1555.
72. Sheikh-Mohamed, S.; Isho, B.; Chao, G.Y.C.; Zuo, M.; Cohen, C.; Lustig, Y.; Nahass, G.R.; Salomon-Shulman, R.E.; Blacker, G.; Fazel-Zarandi, M.; et al. Systemic and mucosal IgA responses are variably induced in response to SARS-CoV-2 mRNA vaccination and are associated with protection against subsequent infection. *Mucosal. Immunol.* **2022**, *15*, 799–808.

73. Azzi, L.; Dalla Gasperina, D.; Veronesi, G.; Shallak, M.; Ietto, G.; Iovino, D.; Baj, A.; Gianfagna, F.; Maurino, V.; Focosi, D.; et al. Mucosal immune response in BNT162b2 COVID-19 vaccine recipients. *eBioMedicine* **2021**, *75*, 103788, <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103788>.
74. Azzi, L.; Gasperina, D.D.; Veronesi, G.; Shallak, M.; Maurino, V.; Baj, A.; Gianfagna, F.; Cavallo, P.; Dentali, F.; Tettamanti, L.; et al. Mucosal immune response after the booster dose of the BNT162b2 COVID-19 vaccine. *Ebiomedicine* **2023**, *88*, 104435, <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104435>.
75. Ivanova, E.N.; Devlin, J.C.; Buus, T.B.; Koide, A.; Shwetar, J.; Cornelius, A.; Samanovic, M.I.; Herrera, A.; Mimitou, E.P.; Zhang, C.; et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccine elicits a potent adaptive immune response in the absence of IFN-mediated inflammation observed in COVID-19. *medRxiv* **2021**. <https://doi.org/10.1101/2021.04.20.21255677>.
76. Committee, F.A. Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee December 17, 2020 in, Food and Drug Administration. Online. 2020. Available online: web (accessed on 24 July 2022).
77. Moore, M.J. mRNA Platform and Mechanism of Action of mRNA-1273 in, FDA document: Emergency Use Authorization (EUA) Application for mRNA-1273. 2020. Available online: <https://www.fda.gov/media/144583/download> (accessed on 24 July 2022).
78. Plotkin, S.A. Vaccines: The fourth century. *Clin. Vaccine Immunol.* **2009**, *16*, 1709–19.
79. Reif, D.M.; McKinney, B.A.; Motsinger, A.A.; Chanock, S.J.; Edwards, K.M.; Rock, M.T.; Moore, J.H.; Crowe, J.J.E. Genetic Basis for Adverse Events after Smallpox Vaccination. *J. Infect. Dis.* **2008**, *198*, 16–22, <https://doi.org/10.1086/588670>.
80. Poland, G.A.; Kennedy, R.B.; McKinney, B.A.; Ovsyannikova, I.G.; Lambert, N.D.; Jacobson, R.M.; Oberg, A.L. Vaccinomics, adversomics, and the immune response network theory: Individualized vaccinology in the 21st century. *Semin. Immunol.* **2013**, *25*, 89–103, <https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.04.007>.
81. Lin, Y.; He, Y. The ontology of genetic susceptibility factors (OGSF) and its application in modeling genetic susceptibility to vaccine adverse events. *J. Biomed. Semant.* **2014**, *5*, 19–19, <https://doi.org/10.1186/2041-1480-5-19>.
82. Klein, N.P.; Lewis, E.; McDonald, J.; Fireman, B.; Naleway, A.; Glanz, J.; Jackson, L.A.; Donahue, J.G.; Jacobsen, S.J.; Weintraub, E.; et al. Risk factors and familial clustering for fever 7–10 days after the first dose of measles vaccines. *Vaccine* **2017**, *35*, 1615–1621, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.02.013>.
83. Asandei, A.; Mereuta, L.; Schiopu, I.; Park, J.; Seo, C.H.; Park, Y.; Luchian, T. Non-Receptor-Mediated Lipid Membrane Permeabilization by the SARS-CoV-2 Spike Protein S1 Subunit. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 55649–55658.
84. Yonker, L.M.; Swank, Z.; Bartsch, Y.C.; Burns, M.D.; Kane, A.; Boribong, B.P.; Davis, J.P.; Loiselle, M.; Novak, T.; Senussi, Y.; et al. Circulating Spike Protein Detected in Post-COVID-19 mRNA Vaccine Myocarditis. *Circulation* **2023**, *Epub ahead of print* <https://doi.org/10.1161/circulationaha.122.061025>.
85. Verma, A.K.; Lavine, K.J.; Lin, C.-Y. Myocarditis after Covid-19 mRNA Vaccination. *New Engl. J. Med.* **2021**, *385*, 1332–1334, <https://doi.org/10.1056/nejmc2109975>.
86. Krug, A.; Stevenson, J.; Høeg, T.B. BNT162b2 Vaccine-Associated Myo/Pericarditis in Adolescents: A Stratified Risk-Benefit Analysis. *Eur. J. Clin. Invest.* **2022**, *52*, e13759, <https://doi.org/10.1111/eci.13759>.
87. Atalis, A.; Keenum, M.C.; Pandey, B.; Beach, A.; Pradhan, P.; Vantucci, C.; et al. Nanoparticle-delivered TLR4 and RIG-I agonists enhance immune response to SARS-CoV-2 subunit vaccine. *J. Control Release* **2022**, *347*, 476–488.
88. Vervaeke, P.; Borgos, S.; Sanders, N.; Combes, F. Regulatory guidelines and preclinical tools to study the biodistribution of RNA therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2022**, *184*, 114236, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114236>.
89. Di, J.; Du, Z.; Wu, K.; Jin, S.; Wang, X.; Li, T.; Xu, Y. Biodistribution and Non-linear Gene Expression of mRNA LNPs Affected by Delivery Route and Particle Size. *Pharm. Res.* **2022**, *39*, 105–114, <https://doi.org/10.1007/s11095-022-03166-5>.
90. Cognetti, J.S.; Miller, B.L. Monitoring Serum Spike Protein with Disposable Photonic Biosensors Following SARS-CoV-2 Vaccination. *Sensors (Basel)* **2021**, *21*, 5857.
91. Suzuki, Y.J.; Nikolaienko, S.I.; Dibrova, V.A.; Dibrova, Y.V.; Vasylyk, V.M.; Novikov, M.Y.; Shults, N.V.; Gychka, S.G. SARS-CoV-2 spike protein-mediated cell signaling in lung vascular cells. *Vascul. Pharmacol.* **2021**, *137*, 106823.
92. Suzuki, Y.J.; Gychka, S.G. SARS-CoV-2 Spike Protein Elicits Cell Signaling in Human Host Cells: Implications for Possible Consequences of COVID-19 Vaccines. *Vaccines (Basel)* **2021**, *9*, 36.
93. Rhea, E.M.; Logsdon, A.F.; Hansen, K.M.; Williams, L.M.; Reed, M.J.; Baumann, K.K.; Holden, S.J.; Raber, J.; Banks, W.A.; Erickson, M.A. The S1 protein of SARS-CoV-2 crosses the blood-brain barrier in mice. *Nat. Neurosci.* **2021**, *24*, 368–378.
94. Mörz, M. A Case Report: Multifocal Necrotizing Encephalitis and Myocarditis after BNT162b2 mRNA Vaccination against COVID-19. *Vaccines* **2022**, *10*, 1651, <https://doi.org/10.3390/vaccines10101651>.
95. Perico, L.; Morigi, M.; Galbusera, M.; Pezzotta, A.; Gastoldi, S.; Imberti, B.; Perna, A.; Ruggenti, P.; Donadelli, R.; Benigni, A.; Remuzzi, G. SARS-CoV-2 Spike Protein 1 Activates Microvascular Endothelial Cells and Complement System Leading to Platelet Aggregation. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 827146.
96. De Michele, M.; d'Amati, G.; Leopizzi, M.; Iacobucci, M.; Berto, I.; Lorenzano, S.; Mazzuti, L.; Turriziani, O.; Schiavo, O.G.; Toni, D. Evidence of SARS-CoV-2 spike protein on retrieved thrombi from COVID-19 patients. *J. Hematol. Oncol.* **2022**, *15*, 108.
97. Aldén, M.; Olofsson Falla, F.; Yang, D.; Barghouth, M.; Luan, C.; Rasmussen, M.; De Marinis, Y. Intracellular Reverse Transcription of Pfizer BioNTech COVID-19 mRNA Vaccine BNT162b2 In Vitro in Human Liver Cell Line. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2022**, *44*, 1115–1126, <https://doi.org/10.3390/cimb44030073>.
98. Hamming, I.; Timens, W.; Bulthuis, M.L.C.; Lely, A.T.; Navis, G.J.; van Goor, H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J. Pathol.* **2004**, *203*, 631–637, <https://doi.org/10.1002/path.1570>.

99. Al-Zaidan, L.; Mestiri, S.; Raza, A.; Merhi, M.; Inchakalody, V.P.; Fernandes, Q.; Taib, N.; Uddin, S.; Dermime, S. The expression of hACE2 receptor protein and its involvement in SARS-CoV-2 entry, pathogenesis, and its application as potential therapeutic target. *Tumour. Biol.* **2021**, *43*, 177–196.
100. Wu, M.L.; Liu, F.L.; Sun, J.; Li, X.; He, X.Y.; Zheng, H.Y.; Zhou, Y.H.; Yan, Q.; Chen, L.; Yu, G.Y.; et al. SARS-CoV-2-triggered mast cell rapid degranulation induces alveolar epithelial inflammation and lung injury. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2021**, *6*, 428.
101. Nagashima, S.; Dutra, A.A.; Arantes, M.P.; Zeni, R.C.; Klein, C.K.; de Oliveira, F.C.; Piper, G.W.; Brenny, I.D.; Pereira, M.R.C.; Stocco, R.B.; et al. COVID-19 and Lung Mast Cells: The Kallikrein–Kinin Activation Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1714, <https://doi.org/10.3390/ijms23031714>.
102. Caillet-Saguy, C.; Wolff, N. PDZ-Containing Proteins Targeted by the ACE2 Receptor. *Viruses* **2021**, *13*, 2281, <https://doi.org/10.3390/v13112281>.
103. Wang, X.M.; Mannan, R.; Xiao, L.; Abdulfatah, E.; Qiao, Y.; Farver, C.; Myers, J.L.; Zelenka-Wang, S.; McMurry, L.; Su, F.; et al. Characterization of SARS-CoV-2 and host entry factors distribution in a COVID-19 autopsy series. *Commun. Med. (Lond)* **2021**, *1*, 24.
104. Bellavite, P. Renin-Angiotensin System, SARS-CoV-2 and Hypotheses about Adverse Effects Following Vaccination. *EC Pharmacol. Toxicol.* **2021**, *9*, 1–10.
105. Lu, J.; Sun, P.D. High affinity binding of SARS-CoV-2 spike protein enhances ACE2 carboxypeptidase activity. *J. Biol. Chem.* **2020**, *295*, 18579–18588.
106. Grant, O.C.; Montgomery, D.; Ito, K.; Woods, R.J. Analysis of the SARS-CoV-2 spike protein glycan shield: Implications for immune recognition. *BioRxiv* **2020**, <https://doi.org/10.1101/2020.04.07.030445>.
107. Robles, J.P.; Zamora, M.; Adan-Castro, E.; Siqueiros-Marquez, L.; Martinez de la Escalera, G.; Clapp, C. The spike protein of SARS-CoV-2 induces endothelial inflammation through integrin alpha5beta1 and NF-kappaB signaling. *J. Biol. Chem.* **2022**, *298*, 101695.
108. Aleksova, A.; Gagno, G.; Sinagra, G.; Beltrami, A.P.; Janjusevic, M.; Ippolito, G.; Zumla, A.; Fluca, A.L.; Ferro, F. Effects of SARS-CoV-2 on Cardiovascular System: The Dual Role of Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) as the Virus Receptor and Homeostasis Regulator-Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 4526.
109. Zamai, L. Upregulation of the Renin-Angiotensin System Pathways and SARS-CoV-2 Infection: The Rationale for the Administration of Zinc-Chelating Agents in COVID-19 Patients. *Cells* **2021**, *10*, 506.
110. Ni, W.; Yang, X.; Yang, D.; Bao, J.; Li, R.; Xiao, Y.; Hou, C.; Wang, H.; Liu, J.; Yang, D.; et al. Role of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in COVID-19. *Crit. Care* **2020**, *24*, 422, <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03120-0>.
111. Bourgonje, A.R.; Abdulle, A.E.; Timens, W.; Hillebrands, J.L.; Navis, G.J.; Gordijn, S.J.; Bolling, M.C.; Dijkstra, G.; Voors, A.A.; Osterhaus, A.D.; et al. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), SARS-CoV-2 and the pathophysiology of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *J. Pathol.* **2020**, *251*, 228–248.
112. Angeli, F.; Reboldi, G.; Trapasso, M.; Zappa, M.; Spanevello, A.; Verdecchia, P. COVID-19, vaccines and deficiency of ACE2 and other angiotensinases. Closing the loop on the “Spike effect”. *Eur. J. Intern. Med.* **2022**, *103*, 23–28, <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2022.06.015>.
113. Rahman, M.M.; Hasan, M.; Ahmed, A. Potential detrimental role of soluble ACE2 in severe COVID-19 comorbid patients. *Rev. Med. Virol.* **2021**, *31*, 1–12, <https://doi.org/10.1002/rmv.2213>.
114. Lambert, D.W.; Yarski, M.; Warner, F.J.; Thornhill, P.; Parkin, E.T.; Smith, A.I.; Hooper, N.M.; Turner, A.J. Tumor Necrosis Factor- α Convertase (ADAM17) Mediates Regulated Ectodomain Shedding of the Severe-acute Respiratory Syndrome-Coronavirus (SARS-CoV) Receptor, Angiotensin-converting Enzyme-2 (ACE2). *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 30113–30119, <https://doi.org/10.1074/jbc.m505111200>.
115. Mariappan, V.; Ranganadin, P.; Shanmugam, L.; Rao, S.; Pillai, A.B. Early shedding of membrane-bounded ACE2 could be an indicator for disease severity in SARS-CoV-2. *Biochimie* **2022**, *201*, 139–147, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.06.005>.
116. Zhang, S.; Liu, Y.; Wang, X.; Yang, L.; Li, H.; Wang, Y.; Liu, M.; Zhao, X.; Xie, Y.; Yang, Y.; et al. SARS-CoV-2 binds platelet ACE2 to enhance thrombosis in COVID-19. *J. Hematol. Oncol.* **2020**, *13*, 120, <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00954-7>.
117. Letarov, A.V.; Babenko, V.V.; Kulikov, E.E. Free SARS-CoV-2 Spike Protein S1 Particles May Play a Role in the Pathogenesis of COVID-19 Infection. *Biochemistry (Mosc)* **2021**, *86*, 257–261.
118. Wang, S.; Guo, F.; Liu, K.; Wang, H.; Rao, S.; Yang, P.; Jiang, C. Endocytosis of the receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein together with virus receptor ACE2. *Virus Res.* **2008**, *136*, 8–15.
119. Costa, L.B.; Perez, L.G.; Palmeira, V.A.; Cordeiro, M.E.; Ribeiro, V.T.; Lanza, K.; Simões E Silva, A.C. Insights on SARS-CoV-2 Molecular Interactions With the Renin-Angiotensin System. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 559841.
120. McCarthy, C.G.; Wilczynski, S.; Wenceslau, C.F.; Webb, R.C. A new storm on the horizon in COVID-19: Bradykinin-induced vascular complications. *Vasc. Pharmacol.* **2020**, *137*, 106826–106826, <https://doi.org/10.1016/j.vph.2020.106826>.
121. Garvin, M.R.; Alvarez, C.; Miller, J.I.; Prates, E.T.; Walker, A.M.; Amos, B.K.; Mast, A.E.; Justice, A.; Aronow, B.; Jacobson, D.A. A mechanistic model and therapeutic interventions for COVID-19 involving a RAS-mediated bradykinin storm. *eLife* **2020**, *9*, e59177, <https://doi.org/10.7554/eLife.59177>.
122. Oz, M.; Lorke, D.E. Multifunctional angiotensin converting enzyme 2, the SARS-CoV-2 entry receptor, and critical appraisal of its role in acute lung injury. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, *136*, 111193–111193, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111193>.

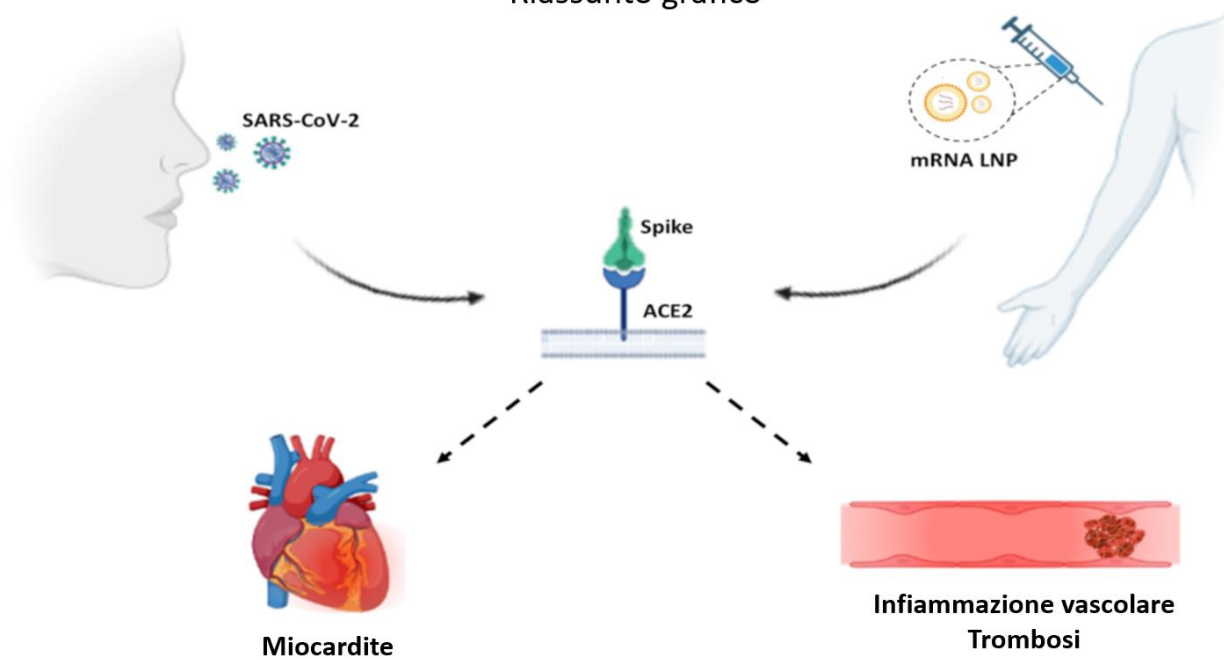
123. Sidarta-Oliveira, D.; Jara, C.P.; Ferruzzi, A.J.; Skaf, M.S.; Velander, W.H.; Araujo, E.P.; Velloso, L.A. SARS-CoV-2 receptor is co-expressed with elements of the kinin-kallikrein, renin-angiotensin and coagulation systems in alveolar cells. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 19522.
124. Roche, J.A.; Roche, R. A hypothesized role for dysregulated bradykinin signaling in COVID-19 respiratory complications. *FASEB J.* **2020**, *34*, 7265–7269, <https://doi.org/10.1096/fj.202000967>.
125. Consolaro, E.; Suter, F.; Rubis, N.; Pedroni, S.; Moroni, C.; Pastò, E.; Paganini, M.V.; Pravettoni, G.; Cantarelli, U.; Perico, N.; et al. A Home-Treatment Algorithm Based on Anti-inflammatory Drugs to Prevent Hospitalization of Patients With Early COVID-19: A Matched-Cohort Study (COVER 2). *Front. Med.* **2022**, *9*, 785785, <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.785785>.
126. Petrone, L.; Petruccioli, E.; Vanini, V.; Cuzzi, G.; Fard, S.N.; Alonzi, T.; Castilletti, C.; Palmieri, F.; Gualano, G.; Vittozzi, P.; et al. A whole blood test to measure SARS-CoV-2-specific response in COVID-19 patients. *Clin. Microbiol. Infect.* **2020**, *27*, 286.e7–286.e13, <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.09.051>.
127. Angeli, F.; Reboldi, G.; Trapasso, M.; Verdecchia, P. Hypertension after COVID-19 vaccination. *G. Ital. Cardiol. (Rome)* **2022**, *23*, 10–14.
128. Liu, P.P.; Blet, A.; Smyth, D.; Li, H. The Science Underlying COVID-19: Implications for the Cardiovascular System. *Circulation* **2020**, *142*, 68–78.
129. Lozada-Martínez, I.D.; Rodríguez-Gutiérrez, M.M.; Ospina-Rios, J.; Ortega-Sierra, M.G.; González-Herazo, M.A.; Ortiz-Roncallo, L.M.; Martínez-Imbett, R.; Llamas-Nieves, A.E.; Janjua, T.; Moscote-Salazar, L.R. Neurogenic pulmonary edema in subarachnoid hemorrhage: Relevant clinical concepts. *Egypt. J. Neurosurg.* **2021**, *36*, 27, <https://doi.org/10.1186/s41984-021-00124-y>.
130. Kanduc, D.; Shoenfeld, Y. Molecular mimicry between SARS-CoV-2 spike glycoprotein and mammalian proteomes: Implications for the vaccine. *Immunol. Res.* **2020**, *68*, 310–313.
131. Horwitz, D.A.; Fahmy, T.M.; Piccirillo, C.A.; La Cava, A. Rebalancing Immune Homeostasis to Treat Autoimmune Diseases. *Trends Immunol.* **2019**, *40*, 888–908, <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.08.003>.
132. Jerne, N.K.; Cocteau, J. Idiotypic Networks and Other Preconceived Ideas. *Immunol. Rev.* **1984**, *79*, 5–24, <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.1984.tb00484.x>.
133. Arthur, J.M.; Forrest, J.C.; Boehme, K.W.; Kennedy, J.L.; Owens, S.; Herzog, C.; Liu, J.; Harville, T.O. Development of ACE2 autoantibodies after SARS-CoV-2 infection. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0257016, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257016>.
134. Murphy, W.J.; Longo, D.L. A Possible Role for Anti-idiotypic Antibodies in SARS-CoV-2 Infection and Vaccination. *N. Engl. J. Med.* **2022**, *386*, 394–396.
135. Moutal, A.; Martin, L.F.; Boinon, L.; Gomez, K.; Ran, D.; Zhou, Y.; Stratton, H.J.; Cai, S.; Luo, S.; Gonzalez, K.B.; et al. SARS-CoV-2 spike protein co-opts VEGF-A/neuropilin-1 receptor signaling to induce analgesia. *Pain* **2021**, *162*, 243–252.
136. De Maria, A. Anti-idiotypic Antibodies in SARS-CoV-2 Infection and Vaccination. *N. Engl. J. Med.* **2022**, *386*, 897–898.
137. Tercan, H.; Riksen, N.P.; Joosten, L.A.B.; Netea, M.G.; Bekkering, S. Trained Immunity: Long-Term Adaptation in Innate Immune Responses. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2021**, *41*, 55–61.
138. Dominguez-Andres, J.; Netea, M.G. Long-term reprogramming of the innate immune system. *J. Leukoc. Biol.* **2019**, *105*, 329–338, <https://doi.org/10.1002/jlb.mr0318-104r>.
139. Iv, C.D.; Saaoud, F.; Shao, Y.; Sun, Y.; Xu, K.; Lu, Y.; Ni, D.; Atar, D.; Jiang, X.; Wang, H.; et al. Trained Immunity and Reactivity of Macrophages and Endothelial Cells. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **2021**, *41*, 1032–1046, <https://doi.org/10.1161/atvbaha.120.315452>.
140. van der Meer, J.W.; Joosten, L.A.; Riksen, N.; Netea, M.G. Trained immunity: A smart way to enhance innate immune defence. *Mol. Immunol.* **2015**, *68*, 40–44, <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.06.019>.
141. Shao, Y.; Saredy, J.; Xu, K.; Sun, Y.; Saaoud, F.; Drummer, C.I.; Lu, Y.; Luo, J.J.; Lopez-Pastrana, J.; Choi, E.T.; et al. Endothelial Immunity Trained by Coronavirus Infections, DAMP Stimulations and Regulated by Anti-Oxidant NRF2 May Contribute to Inflammations, Myelopoiesis, COVID-19 Cytokine Storms and Thromboembolism. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 653110, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.653110>.
142. Lacy, M.; Atzler, D.; Liu, R.; de Winther, M.; Weber, C.; Lutgens, E. Interactions between dyslipidemia and the immune system and their relevance as putative therapeutic targets in atherosclerosis. *Pharmacol. Ther.* **2019**, *193*, 50–62, <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.08.012>.
143. Diani, S.; Leonardi, E.; Cavezzi, A.; Ferrari, S.; Iacono, O.; Limoli, A.; Bouslenko, Z.; Natalini, D.; Conti, S.; Mantovani, M.; et al. SARS-CoV-2-The Role of Natural Immunity: A Narrative Review. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 6272.
144. Azzarone, B.; Veneziani, I.; Moretta, L.; Maggi, E. Pathogenic Mechanisms of Vaccine-Induced Immune Thrombotic Thrombocytopenia in People Receiving Anti-COVID-19 Adenoviral-Based Vaccines: A Proposal. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 728513, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.728513>.
145. Ropa, J.; Cooper, S.; Capitano, M.L.; Van't Hof, W.; Broxmeyer, H.E. Human Hematopoietic Stem, Progenitor, and Immune Cells Respond Ex Vivo to SARS-CoV-2 Spike Protein. *Stem. Cell Rev. Rep.* **2021**, *17*, 253–265.
146. Colunga Biancatelli, R.M.L.; Solopov, P.A.; Sharlow, E.R.; Lazo, J.S.; Marik, P.E.; Catravas, J.D. The SARS-CoV-2 spike protein subunit S1 induces COVID-19-like acute lung injury in Kappa18-hACE2 transgenic mice and barrier dysfunction in human endothelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2021**, *321*, L477–L484.
147. Khaddaj-Mallat, R.; Aldib, N.; Bernard, M.; Paquette, A.S.; Ferreira, A.; Lecordier, S.; et al. SARS-CoV-2 deregulates the vascular and immune functions of brain pericytes via Spike protein. *Neurobiol. Dis.* **2021**, *161*, 105561.
148. Lei, Y.; Zhang, J.; Schiavon, C.R.; He, M.; Chen, L.; Shen, H.; Zhang, Y.; Yin, Q.; Cho, Y.; Andrade, L.; et al. SARS-CoV-2 Spike Protein Impairs Endothelial Function via Downregulation of ACE 2. *Circ. Res.* **2021**, *128*, 1323–1326.

149. Sui, Y.; Li, J.; Venzon, D.J.; Berzofsky, J.A. SARS-CoV-2 Spike Protein Suppresses ACE2 and Type I Interferon Expression in Primary Cells From Macaque Lung Bronchoalveolar Lavage. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 658428.
150. Nuovo, G.J.; Magro, C.; Shaffer, T.; Awad, H.; Suster, D.; Mikhail, S.; He, B.; Michaille, J.-J.; Liechty, B.; Tili, E. Endothelial cell damage is the central part of COVID-19 and a mouse model induced by injection of the S1 subunit of the spike protein. *Ann. Diagn. Pathol.* **2020**, *51*, 151682–151682, <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2020.151682>.
151. Yamamoto, T.; Koyama, Y.; Imai, Y.; Sawada, E.; Kishimoto, N.; Seo, K. SARS-CoV-2 recombinant proteins-induced degeneration of taste buds in rat circumvallate papillae. *J. Dent. Sci.* **2022**, *17*, 1450–1453.
152. Buzhdygan, T.P.; DeOre, B.J.; Baldwin-Leclair, A.; Bullock, T.A.; McGary, H.M.; Khan, J.A.; Razmpour, R.; Hale, J.F.; Galie, P.A.; Potula, R.; et al. The SARS-CoV-2 spike protein alters barrier function in 2D static and 3D microfluidic in-vitro models of the human blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* **2020**, *146*, 105131.
153. Kim, E.S.; Jeon, M.T.; Kim, K.S.; Lee, S.; Kim, S.; Kim, D.G. Spike Proteins of SARS-CoV-2 Induce Pathological Changes in Molecular Delivery and Metabolic Function in the Brain Endothelial Cells. *Viruses* **2021**, *13*, 2021.
154. Suprewicz, L.; Tran, K.A.; Piktel, E.; Fiedoruk, K.; Janmey, P.A.; Galie, P.A.; Bucki, R. Recombinant human plasma gelsolin reverses increased permeability of the blood-brain barrier induced by the spike protein of the SARS-CoV-2 virus. *J. Neuroinflammation* **2022**, *19*, 282.
155. Oldfield, P.R.; Hibberd, J.; Bridle, B.W. How Does Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2 Affect the Brain and Its Implications for the Vaccines Currently in Use. *Vaccines* **2021**, *10*, 1, <https://doi.org/10.3390/vaccines10010001>.
156. Jana, S.; Heaven, M.R.; Alayash, A.I. Cell-Free Hemoglobin Does Not Attenuate the Effects of SARS-CoV-2 Spike Protein S1 Subunit in Pulmonary Endothelial Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9041.
157. Avolio, E.; Carrabba, M.; Milligan, R.; Kavanagh Williamson, M.; Beltrami, A.P.; Gupta, K.; Elvers, K.T.; Gamez, M.; Foster, R.R.; Gillespie, K.; et al. The SARS-CoV-2 Spike protein disrupts human cardiac pericytes function through CD147 receptor-mediated signalling: A potential non-infective mechanism of COVID-19 microvascular disease. *Clin. Sci. (Lond)* **2021**, *135*, 2667–2689.
158. Maugeri, N.; De Lorenzo, R.; Clementi, N.; Antonia Diotti, R.; Criscuolo, E.; Godino, C.; Tresoldi, C.; Angels For Covid-BioB Study Group B, Bonini, C.; Clementi, M.; et al. Unconventional CD147-dependent platelet activation elicited by SARS-CoV-2 in COVID-19. *J. Thromb. Haemost.* **2022**, *20*, 434–448.
159. Antonopoulou, S.; Petsini, F.; Detopoulou, M.; Theoharides, T.C.; Demopoulos, C.A. Is there an interplay between the SARS-CoV-2 spike protein and Platelet-Activating factor? *Biofactors* **2022**, *48*, 1271–1283, <https://doi.org/10.1002/biof.1877>.
160. Singh, A.; Nguyen, L.; Everest, S.; Afzal, S.; Shim, A. Acute Pericarditis Post mRNA-1273 COVID Vaccine Booster. *Cureus* **2022**, *14*, e22148, <https://doi.org/10.7759/cureus.22148>.
161. Bozkurt, B.; Kamat, I.; Hotez, P.J. Myocarditis With COVID-19 mRNA Vaccines. *Circulation* **2021**, *144*, 471–484, <https://doi.org/10.1161/circulationaha.121.056135>.
162. Kurtulmus, N.; Kayikci, K. Subacute Thyroiditis Following SARS-CoV-2 Vaccines: Six Cases Report and Review of the Literature. *Horm. Metab. Res.* **2022**, *54*, 556–561.
163. Passariello, M.; Vetrei, C.; Amato, F.; De Lorenzo, C. Interactions of Spike-RBD of SARS-CoV-2 and Platelet Factor 4: New Insights in the Etiopathogenesis of Thrombosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 8562.
164. Iba, T.; Levy, J.H. The roles of platelets in COVID-19-associated coagulopathy and vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia. *Trends Cardiovasc. Med.* **2022**, *32*, 1–9, <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2021.08.012>.
165. Iba, T.; Levy, J.H. Thrombosis and thrombocytopenia in COVID-19 and after COVID-19 vaccination. *Trends Cardiovasc. Med.* **2022**, *32*, 249–256, <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2022.02.008>.
166. Altman, N.L.; Berning, A.A.; Saxon, C.E.; Adamek, K.E.; Wagner, J.A.; Slavov, D.; Quaipe, R.A.; Gill, E.A.; Minobe, W.A.; Jonas, E.R.; et al. Myocardial Injury and Altered Gene Expression Associated With SARS-CoV-2 Infection or mRNA Vaccination. *JACC: Basic Transl. Sci.* **2022**, *in press*, <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2022.08.005>.
167. Zhao, Y.; Kuang, M.; Li, J.; Zhu, L.; Jia, Z.; Guo, X.; Hu, Y.; Kong, J.; Yin, H.; Wang, X.; et al. SARS-CoV-2 spike protein interacts with and activates TLR41. *Cell Res.* **2021**, *31*, 818–820.
168. Delgado, J.F.; Vidal-Pla, M.; Moya, M.C.; Espasa, M.; Casabella, A.; Seda, M.; Calvet, J.; Gratacós, J.; Serrano, R.M.; Peña, P. SARS-CoV-2 Spike Protein Vaccine-Induced Immune Imprinting Reduces Nucleocapsid Protein Antibody Response in SARS-CoV-2 Infection. *J. Immunol. Res.* **2022**, *2022*, 8287087.
169. Heidecker, B.; Dagan, N.; Balicer, R.; Eriksson, U.; Rosano, G.; Coats, A.; Tschöpe, C.; Kelle, S.; Poland, G.A.; Frustaci, A.; et al. Myocarditis following COVID-19 vaccine: Incidence, presentation, diagnosis, pathophysiology, therapy, and outcomes put into perspective. A clinical consensus document supported by the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology (ESC) and the ESC Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur. J. Hear. Fail.* **2022**, *24*, 2000–2018, <https://doi.org/10.1002/ehfj.2669>.
170. Kiblboeck, D.; Klingel, K.; Genger, M.; Traxler, S.; Braunsteiner, N.; Steinwender, C.; Kellermair, J. Myocarditis following mRNA COVID-19 vaccination: Call for endomyocardial biopsy. *ESC Hear. Fail.* **2022**, *9*, 1996–2002, <https://doi.org/10.1002/ehf2.13791>.
171. WHO. *Causality Assessment of an Adverse Event Following Immunization (AEFI): User Manual for the Revised WHO Classification*, 2nd ed.; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2018.
172. Puliyl, J.; Naik, P. Revised World Health Organization (WHO)'s causality assessment of adverse events following immunization—a critique. *F1000Res* **2018**, *7*, 243.

173. Thomas, S.J.; Moreira, E.D., Jr.; Kitchin, N.; Absalon, J.; Gurtman, A.; Lockhart, S.; Perez, J.L.; Pérez Marc, G.; Polack, F.P.; Zerbini, C.; et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine through 6 Months. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *385*, 1761–1773, <https://doi.org/10.1056/nejmoa2110345>.
174. Poland, G.A.; Ovsyannikova, I.G.; Kennedy, R.B. Personalized vaccinology: A review. *Vaccine* **2018**, *36*, 5350–5357, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.07.062>.
175. Ferraresi, A.; Isidoro, C. Will Omics Biotechnologies Save Us from Future Pandemics? Lessons from COVID-19 for Vaccinomics and Adversomics. *Biomedicines* **2022**, *11*, 52, <https://doi.org/10.3390/biomedicines11010052>.
176. Poland, G.A.; Ovsyannikova, I.G.; Jacobson, R. Adversomics: The Emerging Field of Vaccine Adverse Event Immunogenetics. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2009**, *28*, 431–432, <https://doi.org/10.1097/inf.0b013e3181a6a511>.
177. Whitaker, J.A.; Ovsyannikova, I.G.; Poland, G.A. Adversomics: A new paradigm for vaccine safety and design. *Expert Rev. Vaccines* **2015**, *14*, 935–947, <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.1038249>.
178. Kennedy, R.B.; Poland, G.A.; Ovsyannikova, I.G.; Oberg, A.L.; Asmann, Y.W.; Grill, D.E.; Vierkant, R.A.; Jacobson, R.M. Impaired innate, humoral, and cellular immunity despite a take in smallpox vaccine recipients. *Vaccine* **2016**, *34*, 3283–3290, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.05.005>.
179. Simon, W.L.; Salk, H.M.; Ovsyannikova, I.G.; Kennedy, R.B.; Poland, G.A. Cytokine production associated with smallpox vaccine responses. *Immunotherapy* **2014**, *6*, 1097–1112, <https://doi.org/10.2217/imt.14.72>.
180. Ovsyannikova, I.G.; Pankratz, V.S.; Salk, H.M.; Kennedy, R.B.; Poland, G.A. HLA alleles associated with the adaptive immune response to smallpox vaccine: A replication study. *Hum. Genet.* **2014**, *133*, 1083–1092, <https://doi.org/10.1007/s00439-014-1449-x>.
181. Ovsyannikova, I.G.; Haralambieva, I.H.; Kennedy, R.B.; O'Byrne, M.M.; Pankratz, V.S.; Poland, G.A. Genetic variation in IL18R1 and IL18 genes and Interferon gamma ELISPOT response to smallpox vaccination: An unexpected relationship. *J. Infect. Dis.* **2013**, *208*, 1422–1430.
182. Lippi, G.; Lavie, C.J.; Henry, B.M.; Sanchis-Gomar, F. Do genetic polymorphisms in angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) gene play a role in coronavirus disease 2019 (COVID-19)? *Clin. Chem. Lab. Med.* **2020**, *58*, 1415–1422.
183. Cao, Z.; Zhao, M.; Xu, C.; Zhang, T.; Jia, Y.; Wang, T.; Zhu, B. Diagnostic Roles of Postmortem cTn I and cTn T in Cardiac Death with Special Regard to Myocardial Infarction: A Systematic Literature Review and Meta-Analysis. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3351, <https://doi.org/10.3390/ijms20133351>.
184. Pandey, P.; Rane, J.S.; Chatterjee, A.; Kumar, A.; Khan, R.; Prakash, A.; Ray, S. Targeting SARS-CoV-2 spike protein of COVID-19 with naturally occurring phytochemicals: An *in silico* study for drug development. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2020**, *39*, 6306–6316, <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1796811>.
185. Mahdian, S.; Ebrahim-Habibi, A.; Zarrabi, M. Drug repurposing using computational methods to identify therapeutic options for COVID-19. *J. Diabetes Metab. Disord.* **2020**, *19*, 691–699, <https://doi.org/10.1007/s40200-020-00546-9>.
186. Muchtaridi, M.; Fauzi, M.; Khairul Ikram, N.K.; Mohd, G.A.; Wahab, H.A. Natural Flavonoids as Potential Angiotensin-Converting Enzyme 2 Inhibitors for Anti-SARS-CoV-2. *Molecules* **2020**, *25*, 3980.
187. Wang, X.; Yang, C.; Sun, Y.; Sui, X.; Zhu, T.; Wang, Q.; et al. A novel screening strategy of anti-SARS-CoV-2 drugs via blocking interaction between Spike RBD and ACE2. *Environ. Int.* **2020**, *147*, 106361.
188. Prasansuklab, A.; Theerasri, A.; Rangsinth, P.; Sillapachaiyaporn, C.; Chuchawankul, S.; Tencomnao, T. Anti-COVID-19 drug candidates: A review on potential biological activities of natural products in the management of new coronavirus infection. *J. Tradit. Complement. Med.* **2020**, *11*, 144–157, <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2020.12.001>.
189. Basu, A.; Sarkar, A.; Maulik, U. Molecular docking study of potential phytochemicals and their effects on the complex of SARS-CoV2 spike protein and human ACE2. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 17699.
190. Bellavite, P.; Donzelli, A. Hesperidin and SARS-CoV-2: New Light on the Healthy Function of Citrus Fruits. *Antioxidants (Basel)* **2020**, *9*, 742.
191. Vidoni, C.; Fuzimoto, A.; Ferraresi, A.; Isidoro, C. Targeting autophagy with natural products to prevent SARS-CoV-2 infection. *J. Tradit. Complement. Med.* **2022**, *12*, 55–68, <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2021.10.003>.

Dichiarazione di non responsabilità/Nota dell'editore: Le affermazioni, le opinioni e i dati contenuti in tutte le pubblicazioni sono esclusivamente quelli dei singoli autori e contributori e non di MDPI e/o dell'editore. MDPI e/o gli editori declinano ogni responsabilità per eventuali danni a persone o proprietà derivanti da idee, metodi, istruzioni o prodotti a cui si fa riferimento nel contenuto.

Riassunto grafico



Bellavite Ferraresi Isodoro (2023) <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020451>