





RISPOSTA IMMUNOLOGICA IN CASO DI INFEZIONE DA COVID 19 (SARS-COV-2) O VACCINAZIONE



PRIMA DI INIZIARE

In questo articolo espongo i meccanismi immunologici che si attivano in caso di infezione da Covid19 e li confronto con quelli che si innescano a seguito delle vaccinazioni.

L'infezione viene determinata dal legame del microrganismo con precisi tipi di recettori su cellule specifiche e dalla reazione del sistema immunitario a questo legame. Nel caso del Covid19 il recettore incriminato è principalmente i CD26, presente su differenti tipi di cellule del corpo (cellule nervose, cellule dell'apparato respiratorio, cellule dell'endotelio dei vasi sanguigni, ecc.), ma anche su un determinato tipo di linfociti, i linfociti T-regolatori, che hanno la funzione di ridurre il processo infiammatorio una volta che si è stabilita la risposta immunitaria. Nella prima fase di una infezione si attiva la cosiddetta risposta innata, ossia un processo infiammatorio aspecifico, quindi una risposta dei linfociti T-helper di tipo 1 (TH1) con una ulteriore reazione infiammatoria ed una forte ed intensa azione dei linfociti T-citotossici, e quindi una successiva risposta dei linfociti T-helper di tipo 2 (TH2) con predominanza della risposta anticorpale.

Quando entra in azione il Covid19 la sua proteina di superficie - chiamata proteina S o proteina *spike* - va a legarsi ai recettori CD26 di tutte le cellule che ne sono provviste e determina una risposta molto forte attivando la fase infiammatoria TH1 e poi la TH2. Ma il problema principale è che il legame può inibire l'azione dei linfociti T-regolatori, mantenendo alta la reazione flogistica provocando anche possibili esiti letali. Inoltre la proteina spike ha un mimetismo molecolare che la fa assomigliare alle proteine di membrana di molte cellule dell'organismo, per cui se la risposta flogistica non viene fermata dai linfociti T-regolatori si rimane in uno stato di "infiammazione di basso grado" che nel tempo ed in soggetti predisposti può provocare l'attivazione di malattie autoimmuni.

I vaccini hanno lo scopo di cercare di ridurre la fase infiammatoria TH1, che nel passato era stata una delle principali cause di morte delle malattie infettive, mantenendo attiva solo la TH2. Lo fa attraverso l'inoculazione della proteina spike con diversi vettori: un involucro lipidico che contiene un RNA messaggero che induce la cellula a produrre la proteina (Vaccino Pfizer e Moderna) o un vettore virale nel quale è inserito un pezzo di DNA che ha la funzione di produrre la proteina spike (Regerera, Astrazeneca). Quindi il vaccino fa produrre alle cellule la proteina spike che si andrà a legare ai recettori CD26 e dovrebbe indurre una reazione immunitaria più controllata. Solitamente ci riesce, almeno nel breve periodo, perché riduce la reazione TH1, ma non può controllare che in soggetti predisposti non si possa instaurare una "infiammazione di basso grado" che mantiene le reazioni immunitarie ed anticorpali attive e, in caso di mimetismo molecolare, possa indurre malattie autoimmuni (come d'altronde può fare la malattia).

Quindi fondamentalmente è necessario intervenire riducendo il fenomeno di "infiammazione di basso grado" e stimolando l'azione dei linfociti T-regolatori, che vengono colpiti sia dalla malattia che dalla vaccinazione.

NUOVE METODOLOGIE VACCINALI

PREMESSA

L'articolo che voglio presentarvi è impegnativo, perché spiega nel dettaglio le funzionalità del sistema immunitario, di come agisce l'infezione del Covid 19 e di cosa sono e come funzionano i vaccini. Esprimo dei dati, non delle opinioni.

Per iniziare voglio accennarvi alla fase iniziale dell'infezione e di come avviene la risposta immunitaria di fronte ad un microrganismo, sia esso virale o batterico o altro.

<u>LA FASE INIZIALE DELL'INFEZIONE</u>

Quando un microrganismo entra all'interno del corpo viene subito fagocitato dalle cellule dendritiche (i macrofagi), che distruggono e "smantellano" l'ospite e presentano sulla loro membrana questi frammenti, che diventano degli antigeni. Tali frammenti si legano a recettori specifici dei linfociti T e B che iniziano ad agire:

- 1. i primi regolando la risposta immunitaria in senso infiammatorio (linfociti T-helper e linfociti T-citotossici) o regolatorio (linfociti T-regolatori)
- 2. i secondi producendo anticorpi specifici contro quegli antigeni.

Il sistema infiammatorio-regolatorio dovrebbe essere in equilibrio, ma sovente, per motivazioni che hanno a che fare con l'ereditarietà e/o con lo stato emotivo individuale, può spostarsi nella direzione dell'infiammazione, generando una risposta esagerata e a volte mortale dell'organismo, oppure impedendo che i linfociti T-regolatori riducano l'infiammazione, cosa che potrebbe scatenare successivamente patologie autoimmuni per *mimetismo molecolare*.

Il MIMETISMO MOLECOLARE è quel fenomeno per cui in natura possono essere presenti molecole che hanno la stessa configurazione spaziale (chimicamente possono avere omologie di sequenza) e quindi indurre una risposta immunitaria identica, come se fossero la stessa molecola. Nel caso dell'organismo umano è stato visto che numerose proteine antigeniche di microrganismi o, meno frequentemente, di alimenti, possiedono un mimetismo molecolare con proteine di membrana di differenti cellule dell'organismo umano, per cui, se il processo infiammatorio non si spegne, l'azione immunitaria diretta contro le proteine antigeniche dell'ospite si dirigerà verso le cellule del corpo che possiedono proteine di membrana simili ad esse.

COSA SONO I VACCINI

I vaccini dovrebbero indurre una stimolazione antigenica tale da essere in grado di attivare la risposta immunitaria dei linfociti T citotossici ed helper, e quindi governare una corretta risposta anticorpale guidata dai linfociti B. In altre parole dovrebbero essere in grado di far produrre anticorpi specifici per le proteine di quel determinato tipo di microrganismo, riuscendo però nel contempo a regolare e successivamente a fermare la risposta immunitaria, gestendo la duplice azione dei linfociti T-citotossici (quelli infiammatori) e i T-helper con quella dei linfociti T-regolatori, che - come dice la parola stessa - dovrebbero regolare l'infiammazione e spegnerla quando non è più necessaria.

L'inoculazione del vaccino genera una risposta infiammatoria locale, nel luogo di inoculazione, e sistemica, cioè generale. La reazione locale è facilmente affrontabile, quella sistemica è più complessa, in quanto la mancata gestione del processo infiammatorio è in grado di mantenere la persistenza della risposta immunitaria (infiammazione di basso grado, *Low Grade Inflammation*), che nel tempo e su soggetti predisposti può generare meccanismi di autoimmunità per mimetismo molecolare¹.

Per tale motivo è essenziale comprendere i meccanismi che mantengono il processo infiammatorio e bloccano l'attività dei linfociti T-regolatori.

VACCINO A mRNA

Deriva da tecniche per curare il cancro. Si usano liposomi (LNP - *Lipidic NanoParticles*), ossia involucri lipidici formati da colesterolo e glicole propilenico, che veicolano un mRNA (RNA messaggero) all'interno della cellula cancerosa in modo tale che la stessa produca sostanze antigeniche in grado di attivare i linfociti T-citotossici per distruggerla.

Nel caso del vaccino anti Sars-cov-2 il mRNA codifica per la proteina S (proteina sulla superficie della membrana, nota come *proteina spike*) del coronavirus Covid19. Il liposoma inserisce il mRNA nelle cellule dendritiche che sintetizzano l'antigene e lo presentano ai linfociti T per attivare la risposta immunitaria.

La presenza nelle nanoparticelle lipidiche del *glicole propilenico*, fa sì che si abbia uno stimolo ulteriore al processo di attivazione della risposta immunitaria.

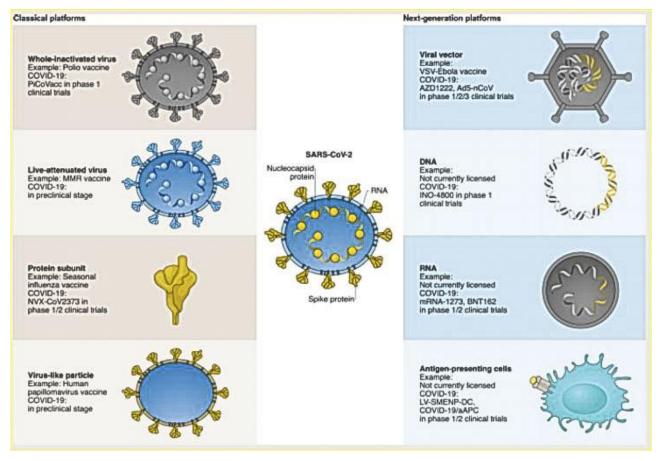
VACCINO A PROTEINA S

Questi vaccini utilizzano tecniche ricombinanti per produrre la proteina S (Virus Like Proteins VLP), che viene inoculata nell'organismo e determina una risposta immunitaria specifica.

¹ Per chiarezza tengo a precisare che lo stesso effetto ci può essere anche nel caso di malattia infettiva e non solo nel vaccino. Nel caso del Covid19, come vedremo oltre, è comprovata la presenza di risposte autoimmuni, che sono quelle che generano le patologie organiche conseguenti. Tuttavia, una volta eliminata la sorgente infiammatoria, la guarigione è in relazione allo spegnimento del processo infiammatorio sotto l'azione dei linfociti T-regolatori

VACCINO A DNA

In questo caso l'agente veicolante è un adenovirus, nel cui DNA viene inserito il frammento che è in grado di costruire la proteina antigenica. Una volta entrato nella cellula, il virus inserisce il proprio DNA in quello dell'ospite, che viene indotto a produrre il DNA virale e contemporaneamente quello che produce la proteina antigenica (nel caso del Covid19 la proteina *spike*).



Tipi di vaccino

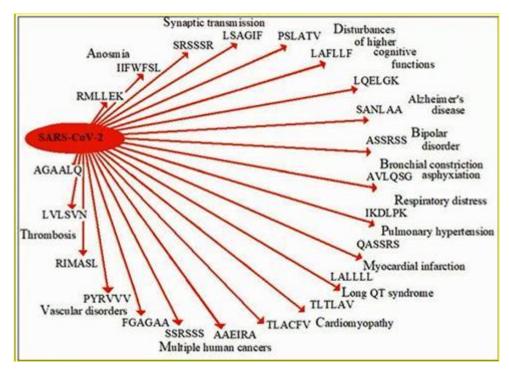
IL VIRUS COVID 19

Si tratta di un virus della famiglia dei coronavirus, perché formato da una corona di proteine - dette *proteine Spike* o *proteine S* - che circondano l'involucro virale, il *capside*. E' della stessa famiglia del virus che ha causato l'influenza spagnola nel 1918, e la SARS o la MERS in Oriente ed in Medio Oriente. In tutti i casi gli effetti più gravi si sono verificati a carico dell'apparato respiratorio ed in particolare degli alveoli polmonari, causando problematiche serie o mortali.

Abbiamo visto che anche il Covid19 ha provocato importanti patologie respiratorie nei soggetti infettati, con la necessità di ricovero ospedaliero ed in alcuni casi con esito letale.

Questo succede perché i meccanismi patogenetici di un microrganismo, ed in particolare del Covid19, avvengono attraverso il mimetismo molecolare. Infatti tale mimetismo induce delle risposte infiammatorie temporanee di autoimmunità, che spiegano la sintomatologia della malattia.

Nella tabella sottostante si vede come la *proteina spike* abbia un mimetismo molecolare con diversi tessuti dell'organismo, il che spiega l'estrema variabilità della sintomatologia della Sars-CoV-2, cioè della malattia indotta dal Covid19



Pepini T. - Introduction of an IFN mediated antiviral response by a self amplifying RNA vaccine design - J. Immunology 2017:198:4012-4024

La vaccinazione, attivando le risposte immunitarie analoghe a quelle del virus, potrebbe indurre lo stesso tipo di malattie autoimmuni se non si riesce a spegnere la risposta e regolarla.

Si è visto che la proteina spike ha omologie di sequenza con proteine di una trentina di cellule dei tessuti umani: tessuti nervosi, endotelio vasale, tessuto bronchiale e polmonare, tessuto cardiaco e nervoso-cardiaco. Si è visto infatti che la malattia può indurre polmoniti interstiziali, vasculiti con formazione di trombi, disturbi nella trasmissione nervosa cardiaca, problematiche nervose dalla semplice anosmia (non sentire odori) e disgeusia (non sentire i gusti), perdita di memoria fino a problematiche neurologiche importanti.

COSA E' UTILE SAPERE

BREVISSIMI CENNI DI IMMUNOLOGIA DEI LINFOCITI

I globuli bianchi (o leucociti) sono cellule del sangue la cui funzione è quella di attuare meccanismi di difesa contro microrganismi patogeni, cellule neoplastiche o corpi estranei penetrati nell'organismo e antigeni di vario genere (ossia sostanze estranee all'organismo che attivano la risposta del sistema immunitario).

In generale, i globuli bianchi comprendono:

- granulociti, che si distinguono in neutrofili, basofili ed eosinofili
- monociti, dai quali derivano i macrofagi o fagociti
- *cellule dendritiche*, che a differenza dei macrofagi e dei neutrofili non sono in grado di fagocitare l'antigene, ma lo catturano e lo espongono sulla propria superficie in seguito all'interazione con esso (per questo appartengono al gruppo delle cellule APC, cellule presentanti l'antigene, *antigen presenting cell*)
- *linfociti*, che possono essere di due tipi, ovvero Linfociti B e Linfociti T (i linfociti sono responsabili della memoria immunologica e della regolazione immunitaria).

MATURAZIONE DEI LINFOCITI

I piccoli linfociti o *linfociti vergini o naive*², continuamente immessi nel sangue, avrebbero una durata media estremamente breve, di uno o due giorni; se però incontrano un antigene, una sostanza cioè estranea all'organismo e per esso nociva, verranno stimolati a diventare grandi linfociti.

Le cellule B e T immature sono praticamente uguali. Dopo la loro attivazione diventano grandi linfociti e maturano in *cellule effettrici* (le *plasmacellule* dei linfociti B che producono anticorpi) e *cellule della memoria* (linfociti T citotossici, natural killer, i T helper e i T regolatori).

I grandi linfociti così derivati andrebbero incontro a mitosi, dando origine a una popolazione di linfociti, ciascuna delle quali ha in sé la memoria dell'antigene che ne ha stimolato la formazione, permettendo una rapidissima risposta nel caso di un secondo contatto con l'antigene. Questi sono i *linfociti a vita lunga* o *cellule memoria* o *linfociti memory*, che si localizzerebbero poi nei linfonodi e nella milza.

<u>I LINFOCITI T</u>

I *linfociti T* si chiamano così per via di uno specifico recettore presente sulla loro superficie, chiamato recettore delle cellule T (*T cell receptor o* TCR, la cui simbologia è espressa come CD+). I

² Le cellule B e T immature sono praticamente uguali. Dopo la loro attivazione, maturano in *cellule effettrici* (le *plasmacellule* dei linfociti B che producono anticorpi) e *cellule della memoria* (linfociti T citotossici, natural killer, i T helper e i T regolatori).

linfociti T vengono prodotti nel midollo osseo (così come i linfociti B) e successivamente però migrano nel timo, dove arrivano a maturazione.

I linfociti T identificano l'antigene e attivano la risposta immunitaria per neutralizzarlo, ma sono anche regolatori della stessa. Si distinguono in sottogruppi, che sono:

- Linfociti T Helper o TH CD4 Facilitano la formazione di anticorpi, aiutando i linfociti B e gestiscono la risposta immunitaria in senso più efficace possibile. I loro recettori di membrana sono chiamati CD4
- Linfociti T Suppressor o TS CD8 Esercitano una attività citotossica, ossia di neutralizzazione nei confronti delle cellule nocive per l'organismo e includono: Linfociti Natural Killer, Linfociti T citotossici o effettori CD8 e Linfociti T regolatori. Inizialmente stimolano il processo infiammatorio (con i citotossici e natural killer) e successivamente la riducono con i regolatori.

I recettori dei linfociti T riconoscono soltanto antigeni microbici presentati dall'APC e la loro immunità si rivolge quindi solo contro elementi patogeni intracellulari, ossia che si trovano *già* all'interno delle cellule. Infatti uccidono qualsiasi cellula in cui siano di fatto penetrati agenti infettivi.

Linfociti Natural Killer

I **linfociti natural killer** esprimono la molecola CD56 e CD16 e vengono attivati dall'interferone; attaccano le cellule infettate e le costringono ad apoptosi (morte cellulare programmata).

Sia le cellule natural killer che le T citotossiche riconoscono il complesso MHC (complesso maggiore di istocompatibilità), ovvero una proteina la cui funzione è quella di legarsi a frammenti proteici prodotti dai patogeni e di presentare questi frammenti ai linfociti, in modo che questi possano attuare una strategia per distruggerli.

Molti patogeni hanno la capacità di inattivare le proteine MHC per evitare che presentino l'antigene ai linfociti.

<u>Linfociti T helper e linfociti T citotossici</u>

Tra i linfociti T, quelli che esprimono la molecola CD4 sono i **linfociti T helper**, detti così perché, attraverso la produzione di citochine, aiutano i linfociti B a produrre anticorpi e i fagociti a uccidere i microbi fagocitati.

I **linfociti T citotossici o effettori** esprimono la molecola CD8 e sono i linfociti T che uccidono le cellule infettate.

<u>Linfociti T regolatori</u>

I **linfociti T regolatori** esprimono la molecola CD25 e mediano la risposta dei *linfociti T helper* e dei *linfociti T natural killer* e *citotossici* al fine di modulare la risposta immunitaria, evitando che sia eccessiva e abnorme.

LINFOCITI B

I linfociti B sono le uniche cellule in grado di produrre *anticorpi*, capaci di legarsi all'antigene. Una volta che i linfociti hanno riconosciuto l'antigene, il linfocita T helper CD4 attiva i linfociti B che produrranno l'anticorpo specifico capace di legarsi all'antigene. Un gruppo verrà esposto sulla membrana ed un gruppo verrà rilasciato nel torrente circolatorio come anticorpo solubile. Gli anticorpi possono riconoscere tipi diversi di molecole come proteine, carboidrati e lipidi.

COME AGISCONO

Mentre i linfociti B vengono attivati, oltre che da cellule, anche da antigeni puri circolanti, i linfociti T per essere attivati necessitano di un contatto diretto con una cellula che presenta l'antigene. Tale presentazione deve avvenire attraverso le cellule che presentano l'antigene (APC), le più importanti delle quali sono le *cellule dendritiche*, legando l'antigene stesso a delle proteine di membrana chiamate *complesso maggiore di istocompatibilità* (MHC).

Pertanto se la cellula T incontra un antigene puro non produce alcuna risposta. Per la sua attivazione il linfocita T deve riconoscere l'antigene già legato alle proteine MHC³.

I **linfociti T** sono invece le cellule dell'**immunità cellulare**. I loro recettori riconoscono soltanto antigeni microbici proteici. L'immunità è quindi specifica contro elementi patogeni intracellulari, ossia che si trovano *già* all'interno delle cellule, e, infatti, i linfociti T uccidono qualsiasi cellula in cui siano di fatto penetrati agenti infettivi.

COME DIFENDONO L'ORGANISMO

I meccanismi di difesa messi in atto dall'organismo si distinguono in:

- Immunità innata Si riferisce a meccanismi di prima difesa contro l'invasione microbica. È costituita, in primo luogo, da barriere epiteliali di cute e mucose. Nel momento in cui il patogeno penetra nell'organismo, viene attaccato dai fagociti o macrofagi, dai granulociti neutrofili, dalle cellule dendritiche e dai linfociti natural killer (NK). L'immunità innata ha anche il compito di potenziare la risposta dell'immunità adattativa.
- Immunità adattativa Si riferisce ad una strategia difensiva più specifica nei confronti di patogeni o antigeni di vario genere. Si sviluppa più lentamente rispetto all'immunità innata poiché richiede la differenziazione dei linfociti prima che possa fornire una difesa adeguata. E'opera dei linfociti e dei loro prodotti: gli anticorpi. L'immunità adattativa può essere di due tipi:
 - ✓ **umorale o ematica** A opera dei linfociti B che producono anticorpi. Gli anticorpi così prodotti sono poi in grado di legarsi agli antigeni come virus, batteri e sostanze estranee all'organismo.
 - cellulo-mediata A opera dei linfociti T, delle cellule dendritiche e delle cellule natural killer. Regola il processo infiammatorio e regolatorio di difesa attraverso il rilascio di citochine in risposta all'azione di un antigene.

_

³ I linfociti T sono in grado di riconoscere proteine MHC di un altro soggetto identificandole come MHC proprie legate ad un antigene e, quindi, da attaccare. Ecco perché nei trapianti vengono somministrati farmaci antirigetto.

LA RISPOSTA IMMUNITARIA

Il punto chiave della risposta immunitaria risiede nella presentazione dell'antigene da parte delle APC, ed in particolare delle *cellule dendritiche*, che determina una attivazione sia dei linfociti T-citotossici, sia dei linfociti T-helper.

La risposta immunitaria può essere divisa in due tipologie:

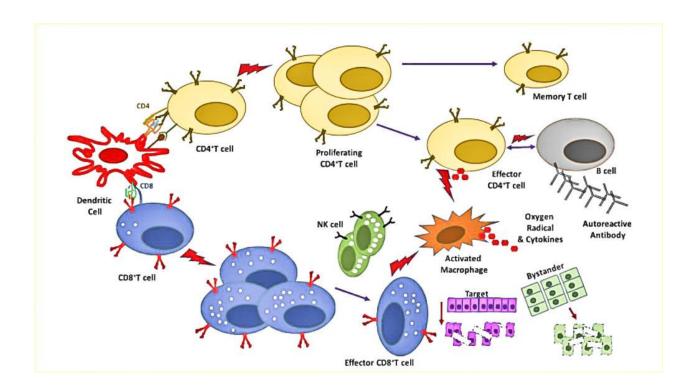
- una iniziale aggressiva legata all'azione dei linfociti T-citotossici (o linfociti T-effettori) che elaborano gli antigeni.
- una modulatoria dei linfociti T-regolatori che gestisce la successiva fase di immunizzazione.

Essa si sviluppa a partire dalla presentazione dell'antigene, sia che provenga dal microrganismo, sia che provenga dal vaccino, da parte delle cellule dendritiche. Il virus (o la consegna del mRNA e DNA virale nel vaccino) entra all'interno della cellula dendritica, la quale opera un processo di frammentazione dell'antigene e lo presenta all'esterno della membrana attraverso le proteine MCH (complesso maggiore di istocompatibilità). Questo consente ai linfociti T, sia le cellule che possiedono recettori di membrana CD4 che CD8, di riconoscere l'antigene,

Sotto l'effetto dell'antigene presentato dalla *cellula dendritica*, i linfociti T citotossici CD8 iniziano a proliferare e a scatenare una risposta immunitaria che si manterrà nella memoria a lungo termine. Compito dei linfociti T regolatori CD25 sarà quello di preservare questa risposta, ma riducendone l'espressione infiammatoria e aggressiva e modulandola. Pertanto l'azione dei due gruppi è fondamentale per avere una risposta efficace in caso di infezione e per mantenerla latente senza reattività quando non è necessario.

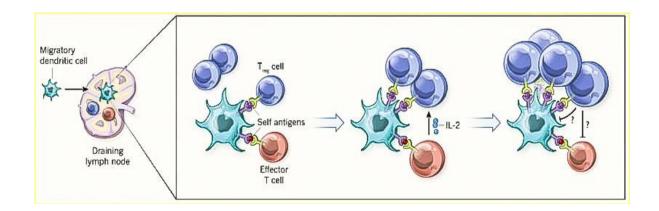
Nelle patologie infettive, ma anche nelle strategie vaccinali, è di fondamentale importanza gestire la risposta immunitaria, potenziando i linfociti T-regolatori, in grado di ridurre e spegnere la risposta infiammatoria e citotossica⁴. La fase infettiva iniziale è sempre aggressiva e infiammatoria, ma è necessario successivamente regolarla per non andare incontro a processi autoimmuni ed allergici per mimetismo molecolare.

⁴ I linfociti T-regolatori sono i veri depositari della risposta immunitaria a lungo termine, non aggressiva.

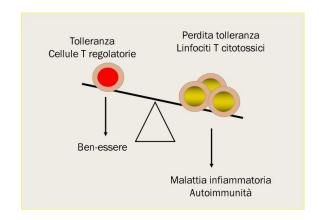


I linfociti T-regolatori sono artefici di una risposta immunitaria non aggressiva ed hanno marcatori specifici sulla membrana denominati CD25 e FOXp3. L'attività infiammatoria dei linfociti T-citotossici e natural killer e dei linfociti T-helper (TH1 e TH2) viene modulata e ridotta quando i linfociti T-regolatori esprimono il CD25 sulla membrana.

Questa competizione tra i due tipi di linfociti può rappresentare il ritorno al benessere, se prevalgono i linfociti T-regolatori, oppure un mantenimento dell'infiammazione e possibili reazioni autoimmunitarie nel caso prevalgano i linfociti T-citotossici o effettori.



Lo stato di benessere è legato ad un equilibrio tra linfociti T citotossici e linfociti T regolatori.



La molecola CD25 presente nei linfociti T-regolatori è in grado di provocare una riduzione dei fattori di trascrizione infiammatoria producendo fattori di crescita e citochine che tendono a spegnerla. Queste sono IL-10 (interleuchina 10) e TGF-β1 (fattore di crescita trasformante i fibroblasti). Si arriva così ad una tolleranza immunitaria gestita dai linfociti T-regolatori.

Una risposta infiammatoria o linfocitaria viene depotenziata da un rimedio omeopatico perché è in grado di stimolare l'attività dei linfociti T-regolatori.

La malattia e i suoi sintomi sono una risposta infiammatoria all'agente infettivo, ma è necessario farmacologicamente orientare la risposta dal punto di vista regolatorio e non citotossico.

IMMUNOLOGIA DEI VACCINI

<u>INFIAMMAZIONE E REGOLAZIONE</u>

Nella vaccinazione si deve attenuare al massimo il rischio del mantenimento di una attività infiammatoria e quindi tendenzialmente autoimmune, potenziando invece l'attività regolatoria dei linfociti T. Occorre quindi avere una comprensione maggiore dei concetti fondamentali dell'immunologia dei vaccini.

I vaccini utilizzati solitamente sono quelli a virus o microrganismi attenuati o inattivati, ma negli ultimi tempi ci si è orientati verso aspetti più innovativi legati alla biologia e genetica ricombinante, come il vaccino anti epatite B e ultimamente i vaccini anti Sars-Cov-2.

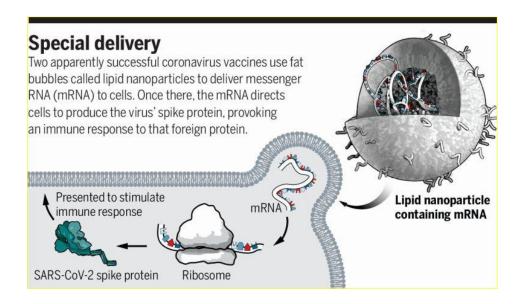
Il grosso problema di una strategia vaccinale è quello di riuscire ad attivare una risposta immunitaria efficace senza mantenere lo stato di attivazione immunologica infiammatoria per lunghi periodi di tempo, quindi gestire l'attività citotossica iniziale e favorire quella regolatoria successivamente.

Le strategie vaccinali dovrebbero essere meno complesse possibile perché se si guarda la storia l'unica malattia realmente eradicata dal vaccino è stata il vaiolo, in quanto il vaccino si è basato su un criterio di similitudine tra il virus del vaiolo di mucca e il virus del vaiolo umano. Addirittura una singola immunizzazione è stata sufficiente per produrre una immunità duratura per tutta la vita. Questo permette di considerare che, attraverso il criterio di similitudine, si riducono i processi infiammatori dei linfociti T-citotossici a vantaggio dell'azione dei linfociti T-regolatori.

Diventa quindi necessario creare una metodologia efficace e soprattutto duratura che si basi su sperimentazioni prolungate per verificare i danni a lungo termine. I danni da vaccino non possono essere valutati solo nel corso dell'immunizzazione o nei pochi giorni successivi, ma dovrebbero essere valutati soprattutto nello studio a lungo termine.

Analizzando i due tipi di vaccino utilizzati per l'epidemia da Covid19 ci si deve chiedere quale tipo di risposta vanno ad attivare e se sono in grado di favorire la successiva attività dei linfociti Tregolatori.

Nel vaccino a mRNA quest'ultimo viene veicolato da vettori lipidici. Viene incapsulato in nanoparticelle lipidiche, che servono a proteggere il materiale nucleico per farlo arrivare e "consegnarlo" alle cellula dendritica che deve essere in grado di utilizzarlo per potere sintetizzare la proteina antigenica virale, in questo caso la proteina spike.



Nel caso del vaccino a DNA, quest'ultimo non può essere veicolato dalle particelle lipidiche, ma deve essere inserito in un segmento di DNA virale e trasportato dal virus stesso. Vengono utilizzati come vettori gli adenovirus AD25 e AD26 e altri D5 e D26. Questa veicolazione di frammenti di DNA deve arrivare nel circolo sanguigno per poter entrare all'interno delle cellule dendritiche. La consegna del materiale nucleico si verifica attraverso l'adenovirus, che deve avere la caratteristica di non essere immunogeno per l'uomo e pertanto deriva da virus presenti nello scimpanzé (vaccino Astrazeneca) e nei gorilla (vaccino Reitera). Il vettore adenovirale deve essere del tutto innocuo e soprattutto del tutto non-immunogeno.

Molte informazioni non sono disponibili vista la grande innovazione di questi vaccini, che per la maggior parte sono stati sperimentati in altri campi, come quello dei tumori⁵ (per attivare una risposta citotossica e non certo regolatoria).

L'intento di questi vaccini è di andare ad immunizzare nei confronti di un virus che cambia di continuo i suoi stimoli antigenici, ma al momento sembrano non essere così efficaci nei confronti delle varianti del virus stesso.

⁵ Fino ad adesso i vaccini a mRNA nei melanomi di quarto stadio o nei carcinomi polmonari a piccole cellule

IL VACCINO PRODUCE SOLO ANTICORPI?

Il vaccino che tipo di risposta induce nel caso di una attivazione antigenica? Sarà più orientata verso una attivazione umorale anticorpale o linfocitaria citotossica e regolatoria?

Sia nella risposta ad un agente infettivo sia nelle strategie vaccinali la risposta immunitaria è rappresentata dall'attività dei linfociti T, che possono indurre a differenti stati di immunizzazione, che possono essere rilevati attraverso gli *anticorpi* (chiamati anche *immunoglobuline* Ig). Questi ultimi sono necessari ma sono insufficienti a valutare il grado di immunizzazione e l'efficacia della risposta. Il fenomeno di produzione di anticorpi è il risultato di una risposta molto più ampia e complessa che coinvolge principalmente i linfociti T. I linfociti B sono quelli che producono anticorpi in risposta ad uno stimolo di differenziazione indotto dall'attività dei linfociti T-helper.

Quando si analizzano gli effetti di una vaccinazione si considerano solo gli anticorpi circolanti, ossia l'attività dei linfociti B, ma non si valuta minimamente quella dei linfociti T, azione molto più complessa e fine, che segnala se l'immunizzazione è stata efficace e duratura e se il processo infiammatorio è stato spento o è ancora presente. Nel caso del mantenimento di un processo infiammatorio non si può dire che il vaccino è stato efficace, perché, se è pur vero che gli anticorpi circolano, è altrettanto verificabile che la "malattia" provocata dal vaccino non si è mai del tutto sopita. Si rischia di cronicizzarla.

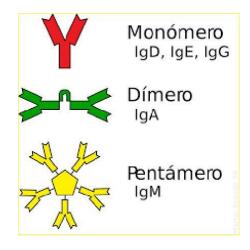
La stessa risposta si può avere anche nei confronti di una malattia naturale, in cui i linfociti T non riescono a spegnere l'infiammazione e la mantengono in uno stato di cronicizzazione con effetti perversi sulla salute individuale.

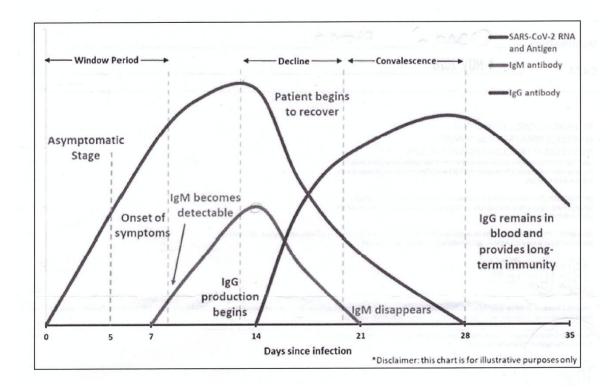
Analizzando gli anticorpi, che sono l'obiettivo della strategia vaccinale, si può verificare, anche in questo caso, il livello di immunizzazione raggiunto.

Gli isotipi anticorpali sono isotipi che tendono a manifestare la loro affinità per l'antigene man mano che la risposta immunitaria procede nel tempo. Una prima risposta da parte del linfocita di fronte ad un immunogeno è rappresentata da una immunoglobulina di tipo M (IgM), successivamente immunoglobuline A (IgA presenti nella mucosa) e come ricaduta finale immunoglobuline G (IgG).

Questa successione di produzione anticorpale non è casuale. Le IgM sono dei pentameri, quindi la riposta iniziale è meno specifica, poi nelle fasi successive si avrà una sempre maggiore affinità per l'antigene prima con le IgA e poi IgG.

Le IgG esprimono il risultato della maggiore affinità per l'antigene ed è una risposta dei linfociti T efficace.





In alcuni casi le strategie vaccinali sono state orientate verso la produzione di immunoglobuline mucosali, cioè presenti nelle mucose, che sono le IgA. Ma gli effetti sono stati poco efficaci e temporanei e soprattutto limitati a produrre una vera immunizzazione.

I potenziali effetti problematici del vaccino possono essere ricondotti a:

- ✓ un'infiammazione locale e sistemica
- ✓ una biodistribuzione dell'immunogeno
- ✓ alla presenza di autoanticorpi, che sono legati al processo di una risposta linfocitaria autoreattiva. La presenza di linfociti autoreattivi è una realtà per effetto della normale possibilità di mimetismo molecolare e sono in grado di innescare patologie autoimmuni.
- ✓ alla persistenza dell'espressione nel tempo dell'immunogeno stesso. Quello espresso attraverso il mRNA o DNA ricombinante potrebbe persistere molto a lungo, proprio perché è legato ad una sintesi proteica da parte delle cellule dendritiche. Ciò suggerirebbe di immunizzare su "determinanti antigenici minimi" (proteine nel virus, ma possibilmente assenti nel corredo cellulare umano).

-

⁶ Un microrganismo può infettare una cellula solo se i suoi determinanti antigenici sono simili alle proteine di membrana delle cellule che infetta. E'quindi probabilmente un fenomeno naturale che durante la fase di maggiore attività immunitaria il sistema esprima degli autoanticorpi, che sono quelli che determinano la sintomatologia dolorosa durante la fase patologica (vedremo che nel caso di infezione del Covid19 sono presenti nel sangue diversi autoanticorpi). Il problema è la persistenza di questo fenomeno, non la sua attivazione.

EFFETTI DELLE NANOTECNOLOGIE

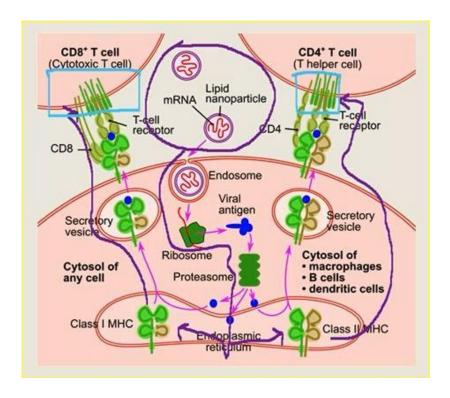
Nella terapia dei tumori è stata individuata una strategia di cura utilizzando l'RNA messaggero. L'mRNA è in grado di sintetizzare una proteina che funge da marcatore, che viene individuata dal sistema immunitario per aggredire la cellula tumorale stessa che lo esprime.

Le nanoparticelle e virus hanno dimensioni molto simili ed entrambi molto piccole e possono accedere all'interno delle cellule in maniera semplice. L'accesso viene reso possibile dalla presenza della membrana lipidica (o dal virus nel caso del DNA).

Le molecole lipidiche si legano alla membrane cellulari della cellule dendritiche del sistema immunitario e vengono inglobate dalla cellula stessa (endocitosi). I lipidi vengono frazionati da enzimi cellulari e si libera il mRNA, che utilizza gli strumenti cellulari per sintetizzare le proteine che servono come marcatori tumorali o marcatori antigenici virali.

L'mRNA utilizza enzimi, le trascriptasi inverse, che permettono di formare una copia di DNA che è in grado di elaborare un nuovo mRNA che produrrà le proteine immunogene.

Gli acidi nucleici possono anche essere consegnati attraverso gli adenovirus.



Nel caso in cui i vettori - le particelle lipidiche o gli adenovirus - subiscano un danno quando sono iniettate o durante lo spostamento nel circolo sanguigno, la liberazione di acidi nucleici produrrà uno stimolo infiammatorio. Questo è stato osservato con il DNA mitocondriale nei casi di morte cellulare. La necrosi delle cellule libera il DNA mitocondriale con conseguente infiammazione.

Pertanto il meteriale nucleico potrebbe rappresentare un fenomeno infiammatorio dalla semplice sintomatologia dolorosa fino alla formazione di trombi a livello vasale.

I vaccini che inoculano i Virus Like Proteins (la proteina S nel caso del Covid19) difficilmente inducono una risposta di tipo citotossico, almeno per le esperienze precedenti.

LA RISPOSTA IMMUNITARIA AL COVID19

Analizzeremo in questo capitolo alcune caratteristiche biochimiche e molecolari del Covid19 e di come queste possano interferire in alcune importanti funzioni biologiche in grado di mantenere alto uno stato infiammatorio e orientare la risposta immunitaria verso sintomatologie complesse e multifattoriali più o meno gravi.

Tali fenomeni sono stati individuati nella capacità del virus di interagire con importanti recettori cellulari del sistema nervoso, del tessuto respiratorio, dell'endotelio vasale e dell'apparato osteo-articolare. Inoltre è stato verificato che, come tutti i virus a RNA, è capace di riattivare risposte immunitarie a virus endogeni già presenti nell'organismo aggravando il quadro clinico.

IL RECETTORE CD26

La proteina spike del Covid19 ha una forte affinità per un recettore di membrana, il CD26 o DPP4 (dipeptidisi4), che è una molecola enzimatica⁷ molto espressa nell'organismo, praticamente da moltissime cellule di differenti tessuti.

Quindi tutte le cellule che possiedono questo recettore sono potenzialmente infettabili dal virus, la cui azione quindi si può esplicare in sintomatologie molto variabili.

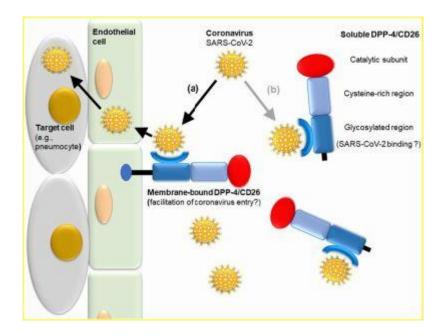
Molti autori pensano che il recettore principale della Sars-Cov-2 sia l'ACE2, ma in realtà è il CD26, che viene utilizzato in grande quantità nelle fasi iniziali dell'infezione. Nel caso di infezione si ha l'iniziale consumo di CD26 e poi l'utilizzo delle ACE2, che viene utilizzato dal virus solo dopo che sono stati consumati dall'infezione (o dalla vaccinazione) tutti i recettori precedenti. Si deve tenere presente in questo caso che il recettore CD26 è molto più diffuso nelle cellule dell'organismo rispetto all'ACE2, determinando quindi risposte molto più ubiquitarie in caso di legame con proteina spike del virus rispetto al secondo.

Il recettore CD26 è in grado di regolare la risposta immunitaria. Durante la maturazione nel timo dei linfociti T, questi vanno a differenziarsi da cellule vergini a cellule effettrici citotossiche o regolatorie attraverso espressione o no di questa glicoproteina di membrana CD26. Ad esempio i citotossici non hanno CD26 come marcatore di membrana, cosa che invece hanno le cellule T regolatorie. Quindi il coronavirus va a legarsi alle cellule T-regolatorie bloccandone l'espressione⁸.

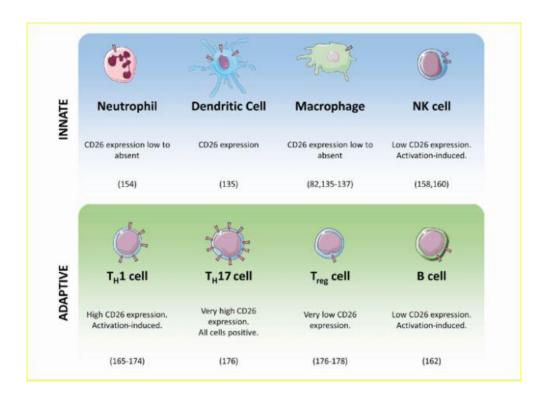
Il CD26 si può esprimere sia nella forma legata alla membrana, sia in forma solubile. Nella forma legata a membrana ha una sua funzione dimerica (esercita la sua funzione con due molecole appaiate), quindi si può legare a diverse molecole quali Neuropeptide-Y (un neurotrasmettitore), fibronectina, ADA, ecc. La forma libera è presente nel plasma, nelle urine, nel liquido spermatico, nel liquido cerebrospinale e nel liquido sinoviale. Questa forma è liberata dalle membrane e mantiene integralmente la sua attività enzimatica.

⁷ Il CD26 è una proteasi che scinde le proteine con una attività enzimatica intensa, andando a riconoscere la prolina e alanina (aminoacidi) nelle seconde posizioni della parte N terminale delle catene N polipeptidiche.

⁸ L'anticorpo monoclonale anti-CD26, o Begelomab, è stato utilizzato nei rigetti da trapianto che non rispondevano al cortisone e nelle infezioni da Covid19.



Durante l'infezione o la vaccinazione si ha un depauperamento del CD26, e questo può comportare una attività anti-CD26.



Il recettore è fortemente presente nei Linfociti T-memory, ossia in quelli legati alla memoria immunologica.

<u>EFFETTI DELLA PROTEINA SPIKE DEL COVID 19</u> <u>SULL'INFIAMMAZIONE</u>

A seguito dell'infezione da coronavirus le risposte possono essere di natura innata infiammatoria o adattativa anticorpale. La risposta innata può avere delle risposte neurologiche importanti, in quanto la proteina *spike*, tende a legarsi ai recettori CD26, ai recettori ACE2, ma può anche legarsi ai recettori nicotinici dell'acetilcolina (nAChR).

Questi legami possono provocare alterazioni biologiche, che andiamo adesso a descrivere.

- 1. La proteina spike è in grado di legarsi a recettori di *neurotrasmettitori*, ed in particolare di quelli *nicotinici* di tipo α7 e α9. Questo legame determina una inattivazione del recettore stesso, bloccando la risposta nervosa sotto lo stimolo della nicotina endogena. La stimolazione nicotinica a livello intestinale e polmonare è antiinfiammatoria, per cui questo legame inibisce il circuito antiinfiammatorio. Il risultato è uno stato di infiammazione immediata.
- 2. L'elevato consumo di CD26 comporta una riduzione drastica della *adenosina*, che agisce da antinfiammatorio. Facciamo un passo indietro. Il recettore CD26 serve anche a legarsi ad un altro enzima, chiamato *ADA* (*Adenosina deaminasi*) che scinde l'adenosina e ne determina una sua inattivazione. Se c'è legame spike-CD26, l'ADA non può più legarsi al recettore e si hanno due effetti:
 - l'impossibilità di orientare i linfociti T verso i T-regolatori, e quindi agire in senso regolatorio;
 - un aumento dell'ADA circolante con una conseguente inattivazione della adenosina stessa, con un aumento dello stimolo infiammatorio.
- 3. Il CD26 può glicolisarsi ed assumere forme differenti, e quindi legarsi a molecole diverse. Questa variazione morfologica dipende dall'*acido sialico*. Nell'invecchiamento, nelle infezioni da virus, nelle malattie autoimmuni il contenuto di acido sialico nel CD26 è molto alto, determinando un consumo elevato di CD26 (per legami differenti) e quindi una ulteriore riduzione dei linfociti T-regolatori.
- 4. Anche la proteina spike si lega all'acido sialico del CD26, ma anche l'*idrossiclorochina* (una molecola usata per la cura della malaria) usa lo stesso legame. Pertanto quest'ultima ha un ruolo di competizione con la proteina spike sia nel senso della riduzione della risposta immunitaria, sia impedendo il legame stesso.
- 5. Il CD 26 è espresso in molte cellule dei tessuti, soprattutto *immunitarie*, ed anche nella *milza*, che non è solo il luogo dove si ha la distruzione dei globuli rossi, ma è un organo che partecipa in modo attivo allo stato infiammatorio.
- 6. Il CD26 è in grado di legarsi anche ad altre sostanze come *neuropeptidi, neurotrasmettitori,* ormoni gastrointestinali, fattori di crescita, chemiochine. Una importante è un ormone coinvolto nel diabete (glucoprotein-like1). Quindi l'azione su questo recettore comporta una

serie di effetti importanti a livello nervoso, immunitario e sistemico.

- 7. Il consumo di CD26 può comportare anche altre conseguenze. Lo si può capire dagli effetti avversi provocati dai farmaci inibitori del DDP4/CD26 e cioè le *gliptine*. Sono stati descritti effetti importanti che possono arrivare ad inibire la differenziazione dei linfociti T-regolatori ed anche quella dei linfociti B-regolatori, la cui funzione è molto simile e permette al sistema immunitario di esprimere una attività protettiva e contemporaneamente di tolleranza immunologica.
- 8. Il CD26 sui linfociti T va ad interagire in maniera diretta con le *Cellule Presentanti Antigene* (APC) e soprattutto con le cellule dendritiche tramite una molecola, la *caveolina-1*, in grado di aumentare la sinapsi immunologica. Quindi il virus inibisce o altera le risposte immunologiche.

OMOLOGIE DI SEQUENZA E AUTOANTICORPI

Il coronavirus Covid 19 presenta omologie di sequenza con numerose proteine umane e, proprio grazie a questo tipo di mimetismo, si può sviluppare una sintomatologia variegata che va dai sintomi neurologici minimi, come anosmia e disgeusia, fino ad arrivare a cefalea marcata e manifestazioni neurologiche molto più importanti anche a livello psichiatrico. Lo stesso si può valutare relativamente alla componente vascolar, e che può andare dalle vasculiti fino alle trombosi. Può determinare patologie polmonari per mimetismo molecolare con le cellule polmonari.

In corso di malattia infettiva acuta è stata segnalata da indagini cliniche la presenza di auto-anticorpi assenti in precedenza, quali ANA (autoanticorpi anti-nucleo), anti-SSA (anti-ENA, autoanticorpi specifici del Lupus, che sembrano attivarsi con il virus della mononucleosi), ACA (anti-cardiolipina, un antifosfolipide presente nel Lupus o artrite reumatoide, in connessione con ripresentazione antigenica da citomegalovirus), anti-β2 glicoproteina 1 (può determinare processi trombotici), anti-IFN (interferone), anti-MDA5 (anti-melanoma differentiation associated gene 5, nei casi molto gravi associati alla rara dermatomiosite amiopatica), p-ANCA e c-ANCA, anti-eparina PF4 complex, anti-GD1b, anti-annexina, anti-fosfatidilserina, anti-protrombina, anti-eritrociti (anti-RBC), ma anche autoanticorpi contro i gangliosidi delle cellule nervose (che possono essere responsabili delle conseguenze neurologiche di infezione).

Il problema quindi si pone se la presenza dell'immunogeno persiste, e quindi mantiene attiva la risposta generando malattie autoimmuni.

La presenza di autoanticorpi dopo una fase infettiva acuta (innesco infettivo) tende a permanere per predisposizione immunogenetica. In questo caso l'immunità eterologa (cioè provocata da un agente esterno) tende a divenire un elemento scatenante di autoimmunità, attivata dalla riattivazione di ripresentazione antigenica di virus endogeni, soprattutto erpetici.

Nel caso di vaccinazione gli autoanticorpi non vengono ricercati, né lo saranno in futuro...

INFIAMMAZIONE A LUNGO TERMINE

Abbiamo visto che la proteina spike del Covid19 è in grado di legarsi al CD26 e ad altri recettori, aumentando lo stato infiammatorio ed alterando il processo di risposta immunitaria corretta, diminuendo drasticamente l'attività dei linfociti T-regolatori ed addirittura interferendo con essi attraverso lo stesso recettore CD26.

Questo processo attiva uno stimolo infiammatorio importante che può permanere nel tempo e riattivare risposte immunitarie già presenti relativamente a virus endogeni e mantenere la risposta immunitaria, orientandola nel senso autoimmune per mimetismo molecolare.

Come abbiamo visto nel paragrafo precedente, nell'infezione naturale da Covid19 è stata segnalata la presenza di autoanticorpi che erano assenti in precedenza. Lo stesso vale per le infezioni naturali di altro genere e dipende in parte da una predisposizione (immuno)genetica. Infatti **la presentazione dell'antigene è un elemento cruciale nella risposta immunitaria,** perché questo avviene per opera delle APC cells (Cellule Presentanti Antigene), in modo particolare dalle cellule dendritiche, che sono le cellule più efficienti e fondamentali. La presentazione dell'antigene può indurre la riattivazione di risposte ad antigeni già presenti nel corpo legati a vecchie infezioni. E questo per il Covid19 può accadere per soggetti con determinati tipi di impronta genetica (tecnicamente hanno un HLA con polimorfismi DR1-15, DQB1-06, B-27).

<u>VIRUS A RNA E RIATTIVAZIONE DI ANTICHE MALATTIE</u> <u>VIRALI</u>

Il recettore CD26 è fortemente presente nei Linfociti T-memory, ossia in quelli legati alla memoria immunologica, che hanno registrato la prima volta una risultante antigenica e l'hanno registrata, pronti a riattivarsi all'occorrenza. Pertanto il Covid19, come tutti i virus a RNA, è in grado di riattivare la memoria immunologica presente legata a preesistenti infezioni virali.

Ci può infatti essere una riattivazione patologica per **ripresentazione degli antigeni** dei virus persistenti a DNA (virus endogeni), come l'Herpes o il Citomegalovirus, che causano una ulteriore attivazione infiammatoria che si sovrappone a quella già esistente per il coronavirus.

La presentazione dell'antigene non è solo il risultato di una sequenza di aminoacidi, ma come abbiamo visto precedentemente è una configurazione spaziale di tipo geometrico, per cui ci possono essere configurazioni simili tra virus a RNA e virus a DNA già presenti nell'individuo.

Quindi, oltre al mimetismo molecolare legato alle cellule dell'individuo (già visto per l'autoimmunità), si attiva un mimetismo molecolare legato alla somiglianza di sequenze dell'antigene dei virus a RNA (in questo caso il Covid19) con quelle dei virus endogeni.

Questa è una "immunità eterologa" attivata dal virus a RNA (e quindi anche dalla vaccinazione a RNA) che deve essere considerata in un processo di strategia vaccinale, perché può produrre delle forti risposte attraverso citochine infiammatorie come interferone di tipo 1 o IL-6 che possono contemporaneamente attivare stati di autoimmunità.

Il ruolo della ripresentazione antigenica è molto importante perché ci permette di capire che cosa succede durante la malattia acuta ed in corso delle infezioni intermittenti. Vecchie infezioni di virus erpetici, infezioni virali, Papillomavirus, Parvovirus B19, Citomegalovirus sono legate all'innesco infettivo che genera lo sviluppo di una malattia cronica di tipo autoimmunitario e di ripresentazione

antigenica. Infatti uno degli effetti della ripresentazione di antigeni già presenti nell'organismo determina una diminuzione dell'attività dei linfociti T-regolatori ed una espressione maggiore dei linfociti T-citotossici. E man mano che si va avanti con l'età questa diminuzione dei T-regolatori diventa sempre più marcata con fenomeni infiammatori più o meno latenti di tipo cronico.

Lo stimolo infiammatorio che si determina è importante e tende ad esaltare l'azione citotossica a spese di quella regolatoria ed è aggravato dal rilascio di RNA in circolo.

RUOLO DELLA ADA (ADENOSINA DEAMINASI)

Questo enzima è importante perchè l'adenosina ha un effetto antiinfiammatorio. Il legame tra ADA e il recettore CD26 si esprime non solo con i recettori di membrana cellulare, ma anche nel torrente circolatorio legandosi alle forme solubili, assicurando la degradazione dell'adenosina ed inducendo la proliferazione delle cellule T.

Se questo legame è occupato dalla proteina spike del Covid19, la mancata degradazione dell'adenosina comporta un aumento del rilascio di citochine infiammatorie, soprattutto di IL-6, e la riduzione dei linfociti T-regolatori.

L'ADA, inoltre, si lega negli stessi siti del CD26 dove si legherebbe la proteina spike del Covid19 diventandone antagonista.

<u>RECETTORI NICOTINICI E IMPLICAZIONI</u> <u>NEUROLOGICHE</u>

Abbiamo visto che il Covid19 utilizza i recettori CD26 almeno nelle fasi iniziali dell'infezione, e ACE2⁹ nelle fasi successive, a seguito del consumo dei CD26.

E' stato osservato che c'è forte antagonismo tra la nicotina e la proteina spike nei confronti del **recettore nicotinico dell'acetilcolina** (nAChR). Questo antagonismo è risultato evidente studiando i pazienti fumatori, che sono quelli che vanno incontro in misura minore alle conseguenze dell'infezione. L'acetilcolina è un neurotrasmettitore che stimola l'attività del Nervo Vago, il quale ha una importante azione sul circuito antiinfiammatorio.

Il Covid19, quindi, può interagire con i siti neurologici dell'acetilcolina determinando un blocco dell'attività antiinfiammatoria ma anche creando importanti effetti neurologici.

La via antinfiammatoria colinergica è un tassello importante che determina una regolazione della risposta infiammatoria. I suoi effetti sono mediati principalmente dal Nervo Vago e dai recettori nicotinici dell'acetilcolina (α -7 e α -9), che agiscono sulla risposta immunitaria innata, cioè la fase iniziale. Il blocco dell'attività antiinfiammatoria determina quindi il quadro clinico grave del Covid19.

L'inibizione del circuito antiinfiammatorio colinergico nella fase infettiva è un evento importante.

٠

⁹ Chi fa uso di inibitori dell'ACE2, come ad esempio i pazienti ipertesi, ha un vantaggio rispetto all'infezione da coronavirus.

Esso può essere provocato, oltre che dalla proteina spike, anche per via farmacologica attraverso alcuni farmaci (colina, vareniclina, galantamina), ma anche neurotossine come le α -neurotossine.

I recettori nicotinici sono stati osservati anche sulle cellule immunitarie, ed in particolare sui macrofagi e altre cellule, e la loro inibizione è presente nella sepsi o setticemia e nella sindrome di distress respiratorio acuto.

Relativamente agli effetti neurologici è stato osservato che il 40% dei pazienti infetti da Covid19 può sviluppare sintomi come encefalopatie ipossiche ischemiche, forme cerebrovascolari (mediate dalla ripresentazione antigenica di forme endogene già presenti come il citomegalovirus), disturbi dello stato di coscienza (che possono rimanere anche quando il quadro clinico è stato ripristinato), forme cerebrovascolari acute come ictus, necrotizzazione emorragiche acute, stati di agitazione e di confusione, segni nel tratto cerebrospinale.

Anomalie neurologiche meno gravi sono comunque presenti e vanno dal mal di testa alle vertigini, convulsioni fino ad arrivare a fenomeni un po' più gravi come perdita del gusto e dell'olfatto, che sono condizioni cliniche in decorso lieve della malattia stessa.

I sintomi neurologici più gravi come riduzione dello stato di coscienza, sviluppo di crisi epilettiche o ictus sono prevalenti nelle fasi terminali dell'infezione stessa e sono responsabili dei decessi dei pazienti gravi.

EFFETTI SUI CANALI DEL SODIO

E' stata osservata un'importante omologia tra sequenze di aminoacidi presenti nella proteina spike e il dominio extracellulare dei canali epiteliali del sodio (ENaC-a), che permettono l'entrata del sodio nella cellula assieme all'acqua, permettendo la regolazione dei volumi fluidi cellulari sotto il controllo del sistema Renina-Angiotensina-Aldosterone.

La funzione di questi canali del sodio può essere compromessa in corso di infezione e provocare un problema nel riassorbimento dei liquidi. E' quello che si verifica nelle fasi finali della polmonite interstiziale, in cui l'edema polmonare assume caratteristiche importanti

I canali ionici chiamati ENaC sono sensibili alla variazione del pH in senso acido. Quando c'è acidosi questi canali vengono attivati e questo comporta una stimolazione in senso infiammatorio. La *clorochina* e l'*idrossiclorochina*, così come il *chinino* (China) sono in grado di attivare questi canali ionici ed entrare quindi in competizione con la proteina spike. La sperimentazione pura di China mostra tantissimi sintomi che segnano infiammazione.

IL VACCINO ANTICOVID E LE RISPOSTE IMMUNITARIE

I vaccini hanno lo scopo di fare esprimere la proteina spike, cercando di far rispondere il sistema immunitario in senso protettivo. Come nella malattia, anche nella vaccinazione l'elemento importante è il consumo dei recettori CD26.

RISPOSTE TH1 E TH2

Partendo dai linfociti T-vergini o naive, il sistema immunitario crea i linfociti T-helper che attivano due tipi di risposte: quelle di tipo TH1 e le risposte di tipo TH2.

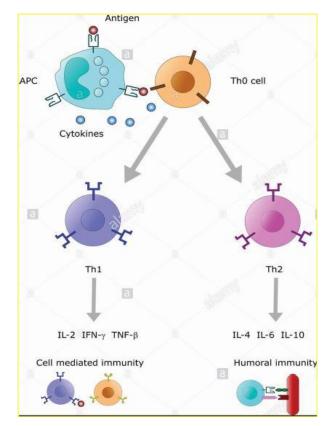
La risposta TH1 è orientata in senso citotossico nei confronti di virus e batteri. È sostenuta dall'interferone (IFN-y, che attiva la produzione di radicali liberi, come il monossido di azoto da parte dei macrofagi e inibisce la risposta TH2) e dall'interleuchina (IL-12, che stimola le cellule Natural killer a produrre IFN-γ). In questa risposta prevale la fagocitosi, ossia la distruzione fisica delle cellule malate o infettate. E' solitamente la risposta iniziale ad ogni fase infettiva¹⁰, cui segue la fase TH2.

La risposta TH2 è orientata in senso anticorpale, cioè successiva alla fase TH1. Essa si manifesta attraverso la produzione di anticorpi. Teoricamente questa fase dovrebbe seguire la TH1, ma l'uso delle vaccinazioni fa sì che si esprima subito la TH2. Quindi la presenza di anticorpi circolanti, generati da questa risposta nella prima fase infettiva, favorisce la comparsa di malattie allergiche o autoimmuni. La fase TH2 è sostenuta dall'interleuchina 4 (IL-4, che attiva i linfociti B e la produzione di IgE), dall'interleuchina-5 (IL-5, che recluta granulociti eosinofili in presenza di parassiti), dall'interleuchina 3 e 10 (IL-13 e IL-10, che sono citochine antinfiammatorie e bloccano l'azione di quelle infiammatorie¹¹ come l'IL-3, l'IL-5, l'IL-12, la produzione di IFN-γ e inibiscono la risposta TH1).

In condizioni normali è la natura dell'antigene a determinare il tipo di risposta, ma l'uso abbondante delle vaccinazioni tende ad orientarla verso la risposta TH2. Tendenzialmente i virus dovrebbero provocare una risposta di tipo TH1, ma in alcuni casi, come i virus dell'influenza, del morbillo e del Covid19, si ha una soppressione della risposta TH1. Il vaccino contro questi virus, in soggetti predisposti o in condizioni di sistema immunitario ancora immaturo come nei bambini di pochi mesi, può squilibrare fortemente la risposta nel senso TH2, aumentando i rischi di allergia e autoimmunità.

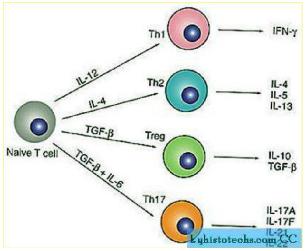
¹⁰ In passato, prima dell'avvento delle vaccinazioni, questo tipo di risposta era prevalente. I meccanismi fortemente infiammatori di questo tipo di risposta potevano provocare sintomatologie severe fino alla morte. Con le vaccinazioni si è inibito questo tipo di risposta ed a anche i suoi rischi, ma si sono create altre problematiche come allergie ed

¹¹ Queste interleuchine bloccano l'azione infiammatoria della fase TH1, ma agiscono da fattori infiammatori nelle risposte anticorpali TH2 e quindi anche nei processi allergici o autoimmuni.



Nel corso di infezione da Covid19 dalle cellule linfocitarie T vergini o naive si differenziano differenti tipi:

- i linfociti TH1 che vanno nel senso infiammatorio fagocitario, che in questo caso si esprimono poco
- i linfociti TH2 più aggressivi che si sviluppano in grande quantità
- pochi vanno verso la differenziazione a linfociti T-regolatori
- altri vanno verso la formazione di linfociti TH17, che è un sottogruppo di linfociti CD4 che provoca la secrezione di citochine infiammatorie



Chi fa le spese sono i T-regolatori¹².

-

¹² L'identificazione dei T-regolatori è basata sull'espressione del recettore di membrana CD25. Questo recettore deve essere presente nel corso di malattie infettive o vaccinazione, perché la sua scomparsa indica l'inattivazione dei linfociti T-regolatori ed il rischio conseguente di malattie autoimmuni.

<u>LE PROTEZIONI E I RISCHI DEL VACCINO</u>

Come abbiamo già affermato precedentemente, i vantaggi del vaccino sono quelle dell'inibizione della risposta TH1, estremamente infiammatoria e rischiosa, che è stata quella che ha causato i morti durante le pandemie del passato, anche se necessaria nelle fasi iniziali di una qualsiasi malattia infettiva. Lo scopo della vaccinazione, infatti, dovrebbe essere quello di ridurre al minimo i rischi della fase di risposta TH1 ed attivare quella TH2, molto meno rischiosa nella situazione acuta (ma che rischia di cronicizzare)¹³.

Abbiamo visto che il virus Covid19 tende a bloccare le risposte di tipo TH1 ed una vaccinazione in questo caso, che dovrebbe *controllare* questa risposta, rischia di bloccarla.

Il legame della proteina spike con il CD26 infatti inibisce l'espressione dei linfociti TH1 e costringe il sistema immunitario ad aderire all'unica risposta disponibile, che è quella del TH2. E' proprio questo squilibrio, che porta a saltare la fase TH1, ad aumentare i rischi di risposte anticorpali eccessive in grado di provocare allergie e, in soggetti predisposti, patologie autoimmuni a carico dell'endotelio vasale, del sistema nervoso, polmonare e scheletrico. Questa tendenza è presente nella fase infettiva acuta ovviamente, ma può esprimersi anche a seguito della vaccinazione.

Questo effetto deve essere almeno ipotizzato in qualunque attività terapeutica che riguardi il Covid19.

Le conseguenze della diminuzione dell'attività del CD26 in corso di infezione/vaccinazione non si possono valutare direttamente, ma lo si è fatto osservando l'azione di farmaci che inibiscono l'attività di questo recettore: le *gliptine*, che sono usate come farmaci antidiabetici. Si è osservato che quando diminuiscono i livelli di attività del CD26, questo può determinare un aggravamento dell'artrite reumatoide, ma anche della psoriasi e della dermatite atopica ed anche della tiroidite di Hashimoto¹⁴. In corso di vaccinazione, quindi, la presenza di malattie autoimmuni deve essere considerata, e si deve mantenere basso il livello di infiammazione. Una diminuzione di CD26 è stata osservata nell'artrite reumatoide, nella sclerosi multipla, nel lupus eritematoso (LES) e nelle malattie infiammatorie croniche dell'intestino.

Gli studi che derivano dall'analogia dell'azione farmacologica delle gliptine si possono in parte sovrapporre agli effetti nel corso di infezione o vaccinazione per Covid19. Tendono ad inibire la proliferazione dei linfociti T-regolatori, provocando un aumento dell'incidenza delle infiammazioni e infezioni e, nei soggetti immunologicamente predisposti, possono essere fattore scatenanti di malattie autoimmuni o malattie infiammatorie dell'intestino (colite ulcerosa, morbo di Chron, diverticolosi) e pemfigoide bolloso.

I rischi di autoimmunità quindi sono presenti nello stato che risulta da una diminuzione dei CD26 e quindi dei linfociti T-regolatori.

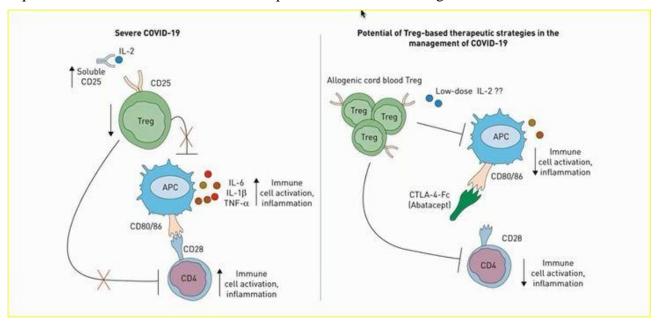
Pazienti che hanno avuto il Covid19 e sono convalescenti hanno una popolazione di linfociti T-memory instabile e la presenza di anticorpi IgG non si mantiene stabile nel tempo. L'iperattivazione delle cellule T e il loro successivo esaurimento è legato ad una riduzione importante e significativa dei T-regolatori in corso di infezione.

Nelle patologie più gravi si ha un aumento significativo delle citochine infiammatorie (tipo IL-6),

¹⁴ Tiroidite di Hashimoto e pemfigoide bolloso sono significativamente aumentati nei pazienti diabetici trattati con gliptine.

¹³ Nel corso dell'invecchiamento è stato osservato che le risposte di tipo TH1 vanno diminuendo, mentre aumentano quelle TH2, forse per fattori di memorie immunologiche acquisite durante l'esistenza.

ma questo si associa ad una diminuzione importante dei linfociti T-regolatori¹⁵.



VACCINI AD ACIDI NUCLEICI E LINFOCITI T-REGOLATORI

Questi vaccini sono stati sperimentati maggiormente nelle forme tumorali e non nelle vaccinazioni. In questi casi si dovevano andare a stimolare non la tolleranza immunitaria, i Tregolatori, ma i linfociti T-effettori, ossia i citotossici, i quali una volta evidenziato un marcatore sulla membrana della cellula neoplastica la attaccano per distruggerla.

E' chiaro che la strategia vaccinale nei confronti di una malattia infettiva debba mirare ad una attività immunitaria in senso regolatorio, mentre fino ad ora la profilassi vaccinale sta ottenendo l'effetto di diminuire l'attività dei linfociti T-regolatori.

Utilizzando un vaccino a DNA per la malaria è stata osservata una diminuzione significativa dei recettori CD25, presenti sulla membrana dei linfociti T-regolatori.

Lo stesso è stato osservato per i vaccini contro l'epatite-B, i quali hanno testimoniato una riduzione marcata dei linfociti T-regolatori.

.

¹⁵ I linfociti T-regolatori hanno i recettori di membrana marcati come CD25 ed anche FOXp3, mentre i linfociti ti T-citotossici marcati con CD4. I linfociti T-helper invece hanno come recettori i CD8.

AZIONE TERAPEUTICA

COME PREVENZIONE

Si usa l'anti-CD26 ogni volta che si è a rischio di contagio. L'azione è di antagonismo con la proteina spike sul CD26.

SUL SISTEMA NERVOSO

Come detto precedentemente è stata osservata l'inibizione dell'acetilcolina per effetto dell'antagonismo dalla proteina spike della Sars-Cov-2 con il recettore nicotinico (azione anticolinergica, ossia blocco dell'azione dell'acetilcolina).

Alcuni farmaci omeopatici hanno una azione *anticolinergica* attraverso il recettore *muscarinico* come Belladonna, Atropina, Stramonium, Hyosciamus, Calcarea carbonica e possono quindi essere usati attraverso il principio di similitudine.

L'infezione da Covid19 invece risulta provocare una situazione *anticolinergica nicotinica*. Un farmaco essenziale è rappresentato dalla *Spigelia*, nelle fasi iniziali dell'infezione, poichè è in grado di ripristinare il circuito antinfiammatorio colinergico. Si può usare con efficacia nei disturbi neurologici in corso di infezione, come ad esempio l'anosmia (perdita olfatto) e la disgeusia (perdita gusto). Quindi la Spigelia ha una azione anticolinergica a livello nicotinico perché antagonizza questi recettori nicotinici

La neurofarmacologia quando è associata alla immunofarmacologia omeopatica può risolvere molti problemi. Infatti è proprio l'immunologia, attraverso il "braccio effettore" neurologico, che si esprime attraverso i sintomi.

Il rimedio omeopatico è in grado di lavorare su due livelli:

- 1. sul livello immunologico, cambiando l'assetto della risposta immunitaria. Ci si ammala quando si risponde. Ma l'omeopatia deve spostare la risposta da citotossica a regolatoria. Questa risposta potenzia la funzione dei linfociti T-regolatori ed è di fondamentale importanza per il ristabilimento della salute
- 2. sul livello neurofarmacologico per ridurre l'intensità delle risposte neurologiche e quindi dei sintomi

SUI SINTOMI DOLORIFICI

I canali ionici chiamati ENaC sono sensibili alla variazione del pH in senso acido. Quando c'è acidosi questi canali vengono attivati e questo comporta una stimolazione in senso infiammatorio. La *clorochina* e l'*idrossiclorochina*, così come il *chinino* (China) sono in grado di attivare questi canali ionici. La sperimentazione pura di *China* mostra tantissimi sintomi che segnano infiammazione.

Un altro esempio è *Veratrum album*, perché la *vetratridina* contenuta nella pianta è in grado di attivare i canali del sodio nella neurotrasmissione dolorifica. I recettori nervosi dell'acido glutammico e dell'acetilcolina vengono attivati in maniera irreversibile dalla veratridina. Quindi Veratrum, oltre ad essere utile per i problemi intestinali, come è indicato in letteratura, è un rimedio chiave per i dolori deai denti, per i dolori da nervo scoperto, cioè per i dolori acuti sui nervi.

Merita una brevissima nota come si utilizza l'omeopatia. Sfrutta il principio di similitudine, ossia si usa un rimedio che provoca gli stessi sintomi della malattia in un individuo sano. Per questo motivo tutti i rimedi omeopatici vengono preparati da sostanze che hanno delle tossine.

La difficoltà nell'individuazione di un rimedio risiede nel fatto che nella Materia Medica si descrivono sia gli effetti tossicologici, che gli effetti legati alla reazione individuale alla sostanza. Hahnemann aveva il vizio di descrivere tutti gli effetti che potevano comparire durante una sperimentazione, ma per capire un rimedio si deve fare attenzione principalmente agli effetti tossicologici.

Nel caso di infezione da Sars-Cov-2 o vaccinazione e conseguente infiammazione, sono molto importanti l'idrossiclorochina, l'azitromicina e il betametasone, che sono farmaci immunosoppressivi che tendono quindi a spegnere il fuoco infiammatorio. Sia l'*idrossiclorochina* che l'*azitromicina* hanno una azione simil-omeopatica. In corso di infezione, quando i sintomi cominciano ad essere importanti, non si deve perdere tempo associandoli eventualmente al *betametasone* - un cortisonico - come immunosoppressore.

A livello omeopatico l'azione dell'idrossiclorochina viene mutuata dall'*Eupatorium perfoliatum*, che è quindi efficace perché l'idrossiclorochina entra in competizione con la proteina spike sui siti della CD-26.

SULL'INFIAMMAZIONE

Nel caso in cui si vengano a determinare delle conseguenze immediate per quanto riguarda la somministrazione del vaccino (febbre, disturbi digestivi, dolori muscolari, mal di testa o altro), si usa il *Sulfur*, che lavora sulla componente infiammatoria di base, che è l'immunità innata. Si può usare il rimedio alla 5 o 30CH alternandoli nel corso della giornata fino a che persiste il sintomo. Oppure si possono usare diluizioni 200-1000-1000CH-K come dosi uniche (che sono le più vantaggiose) in associazione con gli altri rimedi.

Sulfur può essere usato efficacemente anche nella fase iniziale di malattia, per ridurre il grado di infiammazione, ma anche associato ad altri rimedi nelle fasi successive.

Sulfur è un rimedio importantissimo nell'immunità innata, cioè nelle manifestazioni acute iniziali di una malattia.

Calcarea carbonica invece è essenziale per l'immunità adattativa, cioè nelle malattie croniche in generale.

L'infezione naturale comporta delle riattivazioni delle risposte immunitarie per ripresentazione

antigenica di *virus endogeni* già presenti e persistenti nell'organismo per immunità eterologa. In questi casi *anti-CD13* è il rimedio principe, in corso di manifestazione clinica nelle fasi inziali.

Per la <u>prevenzione</u> anti-CD26, per la <u>sintomatologia</u> anti-CD13. Anche nelle varianti.

Le varianti virali sono nella natura stessa del coronavirus, così come quelle da influenza. Le mutazioni puntiformi che tutti i coronavirus sono in grado di fare sono il motivo per il quale le metodiche diagnostiche attuali sono insufficienti. Il tampone che viene fatto ricercando la proteina S (spike), non è sempre efficace perché questa muta facilmente. Bisognerebbe eseguirlo ricercando la proteina N e/o la proteina E del virus che sono molto più invarianti.

<u>SUL POTENZIAMENTO DEI LINFOCITI T-REGOLATORI (ANTAGONISMO CON CD-26)</u>

E' importante l'uso dell'autoanticorpo monoclonale anti-CD26, dal primo giorno della <u>vaccinazione</u>, perché è il CD26 il recettore al quale si va a legare la proteina spike del Covid19 o prodotto dal vaccino.

Nel caso di vaccini a mRNA (Pfizer, Moderna) la seconda dose di vaccino viene effettuata a distanza di circa 3-4 settimane. In questo caso utilizzare *anti-CD26* per due mesi con 06-018-030LM dal primo giorno della vaccinazione fino ad ultimare i due mesi di assunzione.

Nel caso in cui si abbiano persone con malattie autoimmuni (o patologie infiammatorie croniche e continuative per motivi immunomediati) si devono potenziare i linfociti T-regolatori con l'utilizzo degli *anti-CD25*¹⁶ in associazione all'anti-CD26.

Nel caso in cui la vaccinazione venga effettuata attraverso i vettori virali (Astrazeneca, Reitera, Sputnik, Johnson&Johnson ed altri), la seconda dose viene effettuata tra i due e tre mesi dalla prima dose. In questo caso usare gli stessi rimedi, ma con una differenza nella somministrazione. Dalla prima dose del vaccino per un mese prendere anti-CD26 (ed eventualmente anche anti-CD25). Poi smettere e riprendere dalla seconda dose.

Nel caso in cui si vengano a determinare delle conseguenze immediate per quanto riguarda la somministrazione del vaccino (febbre, disturbi digestivi, dolori muscolari, mal di testa o altro) si usa il *Sulfur*, già dal giorno stesso della vaccinazione, soprattutto in presenza di sintomi infiammatori¹⁷. Stesso discorso nel caso di malattia infettiva naturale Sars-Cov-2.

Nel caso in cui ci sia la malattia da Covid19 si sconsiglia di assumere l'anti-CD26, basta assumere l'anti-CD13. Quest'ultimo è un rimedio importante anche perché è una molecola importante non soltanto nel citomegalovirus, ma anche come molecola antiinfiammatoria. Il CD13 è una glicoproteina ad attività enzimatica molto simile alla CD26, perché scinde le molecole peptidiche. Somministrandoli contemporaneamente si rischia che si antidotino l'uno con l'altro. Se si devono

¹⁷ Se i sintomi compaiono dopo una settimana sono legati al punto di inoculazione per cui non serve Sulfur, ma è una problematica traumatica legata all'inoculazione stessa. Se c'è mRNA la liberazione del materiale nucleico può indurre infiammazione nel punto di inoculazione.

¹⁶ L'anti-CD25 non va dato in caso di patologia tumorale, ma solo autoimmune. Chi ha un tumore e fa il vaccino deve prendere solo anti-Cd26, che entra in competizione con la proteina spike.

prendere, mai nella stessa giornata. L'anti-CD13 ha un'azione antiinfiammatoria.

Con AntiCD26 e anti-CD13 (da assumere in modo che non si antidotino) in caso di malattia, si ha una negativizzazione in 10 giorni.

PRIMA DEL VACCINO

Tutti i danni vaccinali sono in relazione ad una diminuzione dell'attività dei T-regolatori a vantaggio dei T-citotossici con una riduzione del CD26.

Il *Sulfur* è in grado di agire in maniera antiinfiammatoria basale riducendo la produzione di citochine infiammatorie. E' il rimedio più importante per le vaccinazioni, meglio di *Thuya*. Quest'ultimo è un rimedio importantissimo per il vaccino antivaioloso da vaiolo di mucca, ma non può essere estrapolato per tutti i vaccini.

Un altro rimedio che si può utilizzare è Silicea.

Qualunque rimedio omeopatico attiva la funzione T-regolatori risolvendo la problematica clinica.

Il ruolo del potenziamento dei linfociti T-regolatori è dato dal farmaco omeopatico in generale. Ad esempio *Nitricum acidum* ha una azione importante a livello delle *Clamydie* in generale e il suo tipo di azione è in grado di risolvere problematiche genitourinarie attraverso la regolazione della risposta immunitaria. Ci si ammala quando si risponde. Il rimedio fa passare i sintomi. E questo accade perchè mentre prima ci potevano essere disturbi legati all'attività citotossica dei linfociti T che noi percepiamo attraverso la produzione di anticorpi a livello sierologico, a seguito dell'assunzione del rimedio la stessa risposta è diventata di tipo regolatorio. Lo stesso linfocita assume le caratteristiche del linfocita T-regolatore.

L'effetto di *Calcarea carbonica* è altrettanto illuminante. Se la si prescrive perché ci sono disturbi come ad esempio febbri ricorrenti in bambino con *titolo antistreptolisinico* alto, il rimedio va a ridurre il titolo. Non lo inattiva, ma lo riduce. Quando questo titolo rientra nella curva normale il bambino mantiene la risposta, ma migliorando i suoi disturbi infiammatori ha permesso allo stesso linfocita che produce il titolo antistreptolisinico a diventare il Tregolatore, sviluppando un'attività regolatoria.

INTERPRETAZIONE E RISPOSTE ALL'ANALISI SIERIOLOGICA DEI MALATI DI COVID GUARITI

Spesso quando si analizza la presenza di infezione virale nella ricerca anticorpale si osserva che le IgM sono presenti mentre le IgG assenti. I pazienti che hanno questa situazione clinica hanno sviluppato una *immunità crociata* relativa a differenti altri microrganismi già presenti. Il coronavirus può essere simile al virus dell'influenza; i Beta-coronavirus possono essere simili ai Papillomavirus ad alto rischio. Quindi si ha contemporaneamente la risposta al Covid19 e agli altri microrganismi.

In questo caso le IgM non rappresentano atro che un sistema di reattività crociata che si spegne

facilmente con il Sulfur.

Nel caso in cui si abbiano tamponi molecolari ancora positivi dopo la guarigione clinica, questo può derivare da una presentazione antigenica ancora presente da parte delle cellule dendritiche o altre Cellule Presentanti Antigene (APC) o dalla formazione degli esosomi, che sono nanoparticelle presentanti antigene.

Il tampone che perdura positivo si può negativizzare facilmente tramite l'*anti-CD13*.

Nel caso in cui le IgG si mantengano alte dopo la guarigione clinica e le IgM assenti, si è raggiunto uno stato di immunizzazione che dovrebbe permettere al paziente almeno per alcuni mesi di non riprendere la malattia.

Tuttavia le metodiche diagnostiche sono comunque obsolete e non completamente affidabili.

BIBLIOGRAFIA

- Juno JA, et al. Humoral and Circulating Follicular Helper T Cell Responses in Recovered Patients with COVID-19. Nat Med 2020; 26: 1428–1434.
- Lin Q, et al. Duration of Serum Neutralizing Antibodies for SARS-CoV-2: Lessons from SARS-CoV Infection. J Microbiol Immunol Infect 2020; 53: 821.
- Pepini T, et al. Induction of an IFN-mediated antiviral response by a self-amplifying RNA vaccine: implications for vaccine design. *J Immunol* 2017; 198: 4012–4024.
- Kanduc D. From Anti-SARS-CoV-2 immune responses to COVID-19 via molecular mimicry. *Antibodies* (Basel) 2020 Sep; 9(3): 33.
- Kanduc D, Shoenfeld Y. On the molecular determinants of the SARS-CoV-2 attack. *Clin Immunol* 2020; 215: 108426.
- Kostoff RN. Vaccine- and natural infection-induced mechanisms that could modulate vaccine safety. *Toxicol Rep* 2020; 7: 1448-58.
- * Zhao Y. CD26 in autoimmune diseases: the other side of "moonlight protein". *Int Immunopharm* 2019 Oct; 75: 105757.
- Klemann C. et al. Cut to the chase: a review of CD26/dipeptidyl peptidase.4's (DPP4) entanglement in the immune system. *Clin Exp Immunol* 2016 Jul; 185(1): 1-21.
- Liu Y, et al. CD26 expression is down-regulaterd on CD8+ T cells in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Int Immunopharmacol* 2018 Jan; 54: 280-85.
 - Stancíková M, et al. Dipeptidyl peptidase IV in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 1992; 10: 381-385.
- Tejera-Alhambra M, et al. Low DPP4 expression and activity in multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2014; 150: 170-183.
 - De Candia P, et al. T Cells: warriors of SARS-CoV-2 infection. Trends Immunol 202• Jan; 42(1): 18-30.
- Rouse BT, Sehrawat S. Immunity and Immunopathology to Viruses: What Decides the Outcome? Nat RevImmunol 2010; 10: 514–526.
- Juno JA, et al. Humoral and Circulating Follicular Helper T Cell Responses in Recovered Patients with COVID-19. Nat Med 2020; 26: 1428–1434.
- Chung YH, et al. COVID-19 vaccine frontrunners and their nanotechnology design. ACS Nano 2020 Oct 27; 14(10): 12522-37.
- Micozzi A. Molecular similarity, in: Homeopathy, immunological metaphor and monoclonal antibodies. *Galeno Editore*, Rome 2020: 167.
 - Dudas RA, Karron RA. Respiratory Syncytial Virus Vaccines. Clin. Microbiol. Rev. 1998, 11, 430–439.
- * Zhang L, et al. Effect of Vaccine Administration Modality on Immunogenicity and Efficacy. *Expert Rev Vaccines* 2015; 14: 1509–1523.
- Zhang Y, et al. New Understanding of the Damage of SARS-CoV-2 Infection Outside the Respiratory System. Biomed Pharmacother 2020; 127: 110195.
- Lin Q, et al. Duration of Serum Neutralizing Antibodies for SARS-CoV-2: Lessons from SARS-CoV Infection. J Microbiol Immunol Infect 2020; 53: 821.
- Sahin U, Kariko K, Tureci O. mRNA-based therapeutics—developing a new class of drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2014;13(10):759–780. doi: 10.1038/nrd4278.
 - Pardi N, et al. mRNA vaccines—a new era in vaccinology. Nat Rev Drug Discov 2018;17(4):261–279. doi:

- 10.1038/nrd.2017.243.
- Jackson LA, et al. An MRNA Vaccine against SARS-CoV-2 Preliminary Report. N Engl J Med 2020; 0, null.10.1056/NEJMoa2022483.
- Zhu F-C et al. Immunogenicity and Safety of a Recombinant Adenovirus Type-5-Vectored COVID-19 Vaccine in Healthy Adults Aged 18 Years or Older: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 2 Trial. *Lancet* 2020; 396: 479–88.
- Clinical Stage Pipeline Novavax Creating Tomorrow's Vaccines Today. Novavax.com . https://novavax.com/our-pipeline#nvx-cov2373 (accessed 2020-08-14).
- Keech C, et al. Phase 1–2 trial of a SARS-CoV-2 recombinant spike protein nanoparticle vaccine. *N Engl J Med* 2020doi: 10.1056/NEJMoa2026920.
- Folegatti PM, et al. Safety and immunogenicity of the ChAdOx• nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary
- report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. Lancet 2020;396(10249):467–478. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31604-4.
 - * ReiThera announces GRAd-CoV2 COVID-19 vaccine candidate. www.reithera.com
- *Smith TRF, et al. Immunogenicity of a DNA vaccine candidate for COVID-19. *Nat Commun* 2020;11(1):2601. doi: 10.1038/s41467-020-16505-0.
- Coffman RL, et al. Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. *Immunity* 2010; 33: 492–503. 10.1016/j.immuni.2010.10.002.
 - ^o Cueni LN, Detmar M. The Lymphatic System in Health and Disease. Lymphatic Res Biol 2008; 6: 109–122.
- Vandakari N, Wilce JA. Emerging Wuhan (COVID-19) coronavirus: glycan shield and structure prediction of spike glycoprotein and its interaction with human CD26. *J Emerg Micr Infect* 2020 Mar 17; 9(1): 601-04.
- Radzikowska U. et al. Distribution of ACE2, CD147, CD26, and other SARS-CoV-2 associated molecules in tissues and immune cells in health and in asthma, COPD, obesity, hypertension, and COVID-19 risk factors. *Allergy* 2020; 75: 2829–45.
- Raha AA, et al. Investigation of CD26, a potential SARS-CoV-2 receptor, as a biomarker of age and pathology. *Biosci Rep* 2020 Dec 23; 40(12): BSR20203092.
- Wrapp D, at al. Cryo-EM Structure of the 2019-NCoV Spike in the Prefusion Conformation. *Science* 2020; 367: 1260–1263.
 - Richner J, et al. Modified MRNA Vaccines Protect against Zika Virus Infection. Cell 2017, 168, 1114–1125.
- Karikó K, et al. Incorporation of Pseudouridine into MRNA Yields Superior Nonimmunogenic Vector with Increased Translational Capacity and Biological Stability. *Mol Ther* 2008; 16: 1833–1840.
 - Benteyn D, et al. mRNA-based dendritic cell vaccines. Expert Rev Vaccines 2014; 14: 161-76.
- Christensen D, et al. Liposome-based cationic adjuvant formulations (CAF): Past, present, and future. *J Liposome Res* 2009; 19: 2–11.
- Sun X, et al. Transcutaneous delivery of DNA/mRNA for cancer therapeutic vaccination. *J Gene Med* 2019; 21: e3089.
- Kauffman KJ, et al. Materials for non-viral intracellular delivery of messenger RNA therapeutics. *J ControlRelease* 2016; 240: 227–34.
- Sun X, et al. Transcutaneous delivery of DNA/mRNA for cancer therapeutic vaccination. *J Gene Med* 2019; 21: e3089.
- Edwards DK, et al. Adjuvant effects of a sequence-engineered mRNA vaccine: translational profiling demonstrates similar human and murine innate response. *J Transl Med* 2017; 15:1.
- Pepini T, et al. Induction of an IFN-mediated antiviral response by a self-amplifying RNA vaccine: implications for vaccine design. *J Immunol* 2017; 198: 4012–4024.

- Fischer S, et al. Extracellular RNA mediates endothelial-cell permeability via vascular endothelial growth factor. *Blood* 2007; 110: 2457–65.
- Kannemeier C, et al. Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 6388–93.
- Cameron MJ, et al. Human immunopathogenesis of severe acute respiratory syndrome (SARS). *Virus Res* 2008; 13: 13-19.
- Tseng CT, et al. Immunization with SARS coronavirus vaccines leads to pulmonary immunopathology onchallenge with the SARS virus. *PLoS ONE* 2012; 7: e35421.
- Yasui F, et al. Prior immunization with severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus (SARS-CoV) nucleocapsid protein causes severe pneumoniae in mice infected with SARS-CoV. *J Immunol* 2008; 181: 6337-48.
- Agrawal AS, et al. Immunization with inactivated Middle East Respiratory Syndrome coronavirus vaccine leads to lung immunopathology on challenge with live virus. *Hum Vaccin Immunother* 2016, 12: 2351-56.
- Deming D, et al. Vaccine efficacy in senescent mice challenged with recombinant SARS-Cov bearing epidemic and zoonotic spike variant. *PLoS ONE Med* 2006: 3: 2359-75.
- Kanduc D. From Anti-SARS-CoV-2 immune responses to COVID-19 via molecular mimicry. *Antibodies* (Basel) 2020 Sep; 9(3): 33.
- * Kanduc D, Shoenfeld Y. On the molecular determinants of the SARS-CoV-2 attack. *Clin Immunol* 2020; 215: 108426.
 - Icenogle T. COVID-19: infection or autoimmunity. Front Immunol 2020 Sep 11; 11: 2055.
 - Halpert G, Shoenfeld Y. SARS-CoV-2, the autoimmune virus. Autoimmun Rev 2020 Dec; 19(12): 102695.
- Novelli A. HLA allele frequencies and susceptibility to COVID-19 in a group o 99 italian patients. *HLA* 2020 Nov; 96(5): 610-14.
- Segal Y, Shoenfeld Y. Vaccine-induced autoimmunity: the role of molecular mimicry and immunecrossreaction. *Cell Mol Immunol* 2018 Jun;15(6): 586–594.
- Kanduc D, Shoenfeld Y. Molecular mimicry between SARS-CoV-2 spike glycoprotein and mammalian proteomes: implications for the vaccine. *Immunol Res* 2020 Oct; 68(5): 310-13.
 - Kostoff RN. Vaccine- and natural infection-induced mechanisms that could modulate vaccine safety. *Toxicol Rep* 2020; 7: 1448-58.
- Kanduc D, Shoenfeld Y. Medical, genomic, and evolutionary aspects of the peptide sharing between pathogens, primates, and humans. *Global Med Genet* 2020;07(02): 064–067.
 - Kanduc D. Self-nonself" peptides in the design of vaccines. Curr Pharm Des 2009;15(28): 3283–3289.
 - Kostoff RN, et al. [Comment] COVID-19 vaccine safety. Int J Mol Med 2020; (Sept 18) (Epub ahead of print).
- Agmon-Levin N, Paz Z, Israeli E, Shoenfeld Y. Vaccines and autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol* 2009; 5:648–652. doi: 10.1038/nrrheum.2009.196.
 - Kostoff RN. Under-reporting of Adverse Events in the Biomedical Literature. J Data Inf Sci 2017;1: 10–32.
 - Geng LI, et al. Coronavirus infections and immune responses. J Med Virol 2020 Jan:https://doi.org/10.1002/jmv.25685.
- Galimberti S, et al. The CoV-2 outbreak: how hematologists could help to fight Covid-19. *Pharmacol Res* 2020 Jul; 157: 104866.
- Stalin Ray V, et al. Receptor of the emerging human coronavirus-EMC. *Nature* 2013 Mar 14; 495(7440(: 251-54. Vandakari N, Wilce JA. Emerging Wuhan (COVID-19) coronavirus: glycan shield and structure prediction of spike glycoprotein and its interaction with human CD26. *J Emerg Micr Infect* 2020 Mar 17; 9(1): 601-04.
- Lambeir AM, et al. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2003; 40: 209-294.

- Klemann C, et al. Cut the chase: a review of CD26/dipeptidyl peptidase-4'6 (DPP4) entanglement in the immune system. *Clin Exp Immunol* 2016 Jul; 185(1): 1-21.
- Chung KM, et al. The dimeric transmembrane domain of prolyl dipeptidase DPP-IV contributes to its quaternary structure and enzymatic activities. *Protein Sci* 2010; 19: 1627-38.
- Lambeir AM, et al. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of enzyme DPP IV. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2003; 40: 209-94.
- Aertgeerts K. Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV in complex with a decapeptide reveals details on substrate specificity and tetrahedral intermediate formation. *Protein Sci* 2004; 13: 412-21.
- Fan H, et al. Domain-specific N-glycosylation of ther membrane glycoprotein dipeptitylpeptidase IV (CD26) influences its subcellular trafficking, biological stability, enzyme activity and protein folding. *Eur J Biochem* 1997;246: 243-51.
- Smith RE, et al. The significance of hypersialylation of dipeptidyl peptidase IV (CD26) in the inhibition of its activity by Tat and other cationic peptides. CD26: a subverted adhesion molecule for HIV peptide binding. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998; 14:851–68.
- Cuchacovich M, et al. Characterization of human serum dipeptidyl peptidase IV (CD26) and analysis of its autoantibodies in patients with rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Clin Exp Rheumatol* 2001; 19:673–80.
- Fantini J, et al. Structural and molecular modelling studies reveal a new mechanism of action of chloroquine and hydroxychloroquine against SARS-CoV-2 infection. *Int J Antimicrob Agents* 2020 May; 55(5): 105960.
- Gorrell MD, et al. Expression of the rat CD26 Antigen (dipeptidyl peptidase IV) on subpopulations of rat lymphocytes. *Cell Immunol* 1991; 134: 205-215.
- Satoskar SA, Rajagopala S. A potential role for dendritic cell/macrophage-expressing DPP4 in obesity-induced visceral inflammation. *Diabetes* 20213; 62: 149-157.
- Lambeir A-M, et al. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2003; 40: 209–94.
- Lambeir A-M, et al. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2003; 40: 209–94.
- Dang NH, et al. (CD26): a marker of thymic maturation involved in the differential regulation of the CD3 and CD2 pathways of human thymocyte activation. *J Immunol* 1991; 147: 2825–32.
- Ibegbu CC, et al. Differential expression of CD26 on virus-specific CD8(+) T cells during active, latent and resolved infection. *Immunology* 2009; 126: 346–53.
- KitagawaN, et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors have adverse effects for the proliferation of human T cells. *J Clin Biochem Nutr* 2018: 17-64.
- Reinhold D, et al. Dipeptidyl peptidase IV (CD26): role in T cell activation and autoimmune disease. *Adv Exp Med Biol* 200; 477: 155-160.
- Klemann C, eta al. CD26/dipeptidyl peptidase 4-deficiency alters thymic emigration patterns and leukcocyte subsets in F344-rats age-dependently. *Clin Exp Immunol* 2009; 155: 357-365.
- Ohnuma K, et al. T-cell activation via CD26 and caveolin-• in rheumatoid synovium. *Mod Rheumatol* 2006; 16: 3–13.
- Ohnuma K, et al. Blockade of CD26-mediated T cell costimulation with soluble caveolin-1-Ig fusion protein induces anergy in CD4+T cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 386: 327–32.
- Ohnuma K, et al. T-cell activation via CD26 and caveolin-• in rheumatoid synovium. *Mod Rheumatol* 2006; 16: 3–13.
- Yazbeck R, et al. Dipeptidyl peptidase inhibitors, an emerging drug class for inflammatory disease? *Trends Pharmacol Sci* 2009; 30: 600–7.
 - Gorrell MD, et al. CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activatedlymphocytes.

- Scand J Immunol 2001; 54: 249-64.
- Röhrborn E, et al. Shedding of dipeptidyl peptidase IV is mediated by metalloproteases and upregulated by hypoxia in human adipocytes and vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 2014; 588: 3870–7.
- Smith RE, et al. The significance of hypersialylation of dipeptidyl peptidase IV (CD26) in the inhibition of its activity by Tat and other cationic peptides. CD26: a subverted adhesion molecule for HIV peptide binding. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998; 14: 851–68.
- Kobayashi H, et al. Reduction of serum, soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV enzyme activity and its correlation with disease activity in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2002; 29: 1858-66.
- Ruiz P, et al. CD26 expression and dipeptidyl peptidase IV activity in an aggressive hepatosplenic T-cell lymphoma. *Cytometry* 1998; 34: 30–5.
- Bauvois B, et al. Constitutive expression of CD26/dipeptidylpeptidase IV on peripheral blood B lymphocytes of patients with B chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Cancer* 1999; 79: 1042–8.
- Boonacker E, Van Noorden CJ. The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV. *Eur J Cell Biol* 2003; 82: 53–73.
- Ginés S, et al. Regulation of epithelial and lymphocyte cell adhesion by adenosine deaminase–CD26 interaction. *Biochem J* 2002; 361: 203–9.
- Pacheco R, et al. CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 9583–88.
 - Van Damme J, et al. The role of CD26/DPP IV in chemokine processing. Chem Immunol 1999; 72: 42-56.
- Richard E, et al. The binding site of human adenosine deaminase for CD26/Dipeptidyl peptidase IV: the Arg142Gln mutation impairs binding to CD26 but does not cause immune deficiency. *J Exp Med* 2000 Nov 6; 192(9): 1223-36.
 - Le TT, et al. Purinergic segnaling in pulmonary inflammation. Front Immunol 2019 Jul 16; 10: 1633.
- Raj VS. Adenosine deaminase acts as a natural antagonist for dipeptidyl peptidase 4-mediated entry of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J Virol* 2014 Feb; 88(3): 1834-38.
 - Lu G, et al. Molecular basis of binding between novel human coronavirus MERS-CoV and its receptor CD26. *Nature* 2013 Aug 8; 500(7461): 227-31.
- Roncati L, et al. Signals of Th2 immune response from COVID-19 patients requiring intensive care. *AnnHematol* 2020; 99(6): 1419–1420.
 - * Roncati L, et al. Type 3 hypersensitivity in COVID-19 vasculitis. Clin Immunol 2020; 217.
- *Li Y, et al. The MERS-CoV receptor DPP4 as a candidate binding target of the SARS-CoV-2 spike. *Science* 2020;23(6).
- Cuchacovich M, et al. Characterization of human serum dipeptidyl peptidase IV (CD26) and analysis of its autoantibodies in patients with rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Clin Exp Rheumatol* 2001; 19:673–80.
- Bock O, et al. Expression of dipeptidyl-peptidase IV (CD26) on CD8+ T cells is significantly decreased in patients with psoriasis vulgaris and atopic dermatitis. *Exp Dermatol* 2001; 10: 414–9.
- * Zhao Y. CD26 in autoimmune diseases: the other side of "moonlight protein". *Int Immunopharm* 2019 Oct; 75: 105757.
- Klemann C. et al. Cut to the chase: a review of CD26/dipeptidyl peptidase.4's (DPP4) entanglement in the immune system. *Clin Exp Immunol* 2016 Jul; 185(1): 1-21.
- Liu Y, et al. CD26 expression is down-regulaterd on CD8+ T cells in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Int Immunopharmacol* 2018 Jan; 54: 280-85.
- Liu Y, et al. CD26 expression is down-regulated on CD8+ T cells in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Int Immunopharmacol* 2018: 280-285.

- * Tasanen K, et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor-associated bullous pemphigoid. Front Immunol 2019 Jun 4; 10: 1238.
- Cordero OJ, et al. Serum interleukin-12, interleukin-15, soluble CD26, and adenosine deaminase in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2001; 21: 69-74.
 - Stancíková M, et al. Dipeptidyl peptidase IV in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 1992; 10: 381-385.
- Tejera-Alhambra M, et al. Low DPP4 expression and activity in multiple sclerosis. Clin Immunol 2014; 150: 170-183
- Varljen J, et al. Clinical relevance of the serum dipeptidyl peptidase IV (DPP IV/CD26) activity in adult patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Croat Chem Acta* 2005; 78: 427-432.
 - Long Q.X. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. Nat Med 2020; 26: 845–848.
- Ni L. Detection of SARS-CoV-2-specific humoral and cellular immunity in COVID-19 convalescent individuals. *Immunity* 2020; 52: 971–977.
 - Gallais F. Intrafamilial exposure to SARS-CoV-2 induces cellular immune response without sero conversion. *medRxiv* 2020 doi: 10.1101/2020.06.21.20132449.
- Sekine T. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. Cell 2020; 183: 158–168.
 - Kim K.D. Adaptive immune cells temper initial innate responses. Nat Med 2007; 13: 248–1252.
- Zhou Y. Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patients. *Natl Sci Rev* 2020; 7: 998–1002.
- Song J.W. Immunological and inflammatory profiles in mild and severe cases of COVID-19. *Nat Commun* 2020; 11: 3410.
- Mazzoni A. Impaired immune cell cytotoxicity in severe COVID-19 is IL-6 dependent. J Clin Invest 2020; 130: 4694–4703.
- Qin C. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clin Infect Dis* 2020; 71: 762–768.
- Belkaid Y., Tarbell K. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions. *Annu RevImmunol* 2009; 27: 551–589.
 - De Candia P, et al. T Cells: warriors of SARS-CoV-2 infection. Trends Immunol 202• Jan; 42(1): 18-30.
- Xu Z, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med* 2020; 8: 420–2.
- Du R, Zhao H, Yan F, Li H. IL-17+Foxp3+ T cells: an intermediate differentiation stage between Th17 cells and regulatory T cells. J Leukoc Biol 2014; 96: 39–48.
- Coleman MM, et al. The immunoregulatory role of CD4⁺ FoxP3⁺ CD25⁻ regulatory T cells in lungs of mice infected with Bordetella pertussis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012; 64: 413–24.
- Wang F, Nie J, Wang H, Zhao Q, Xiong Y, Deng L, et al. Characteristics of peripheral lymphocyte subset alteration in COVID-19 pneumonia. *J Infect Dis* 2020; 221.
- Parsons E, et al. Decrease in circulating CD25(hi)Foxp3(3) regulatory T cells following vaccination with the candidate malaria vaccine RTS,S. *Vaccine* 2016 Aug 31; 34(8): 4618-25.
- Xiaogang D, et al. Astragalus polysaccharides enhance immune response of HBV DNA vaccination via promoting the dendritic cell maturation and suppressing Treg frequency in mice. *Int Immunopharmacol* 2012 Dec; 14(4): 463-70.
- Farsalinos K, et al. Nicotinic cholinergic system and COVID-19: in silico identification and interaction between SARS-CoV-2 and nicotinic receptors with potential therapeutic targeting implications. *Int J Mol Sci* 2020 Aug 13; 21(16): 5807.

- Tracey K.J. The inflammatory reflex. Nature 2002; 420: 853–859.
- Fujii T, et al. Expression and Function of the Cholinergic System in Immune Cells. *Front Immunol* 2017; 8: 1085. Farsalinos K, et al. Editorial: Nicotine and SARS-CoV-2: COVID-19 may be a disease of the nicotinic cholinergic system. *Toxicol Rep* 2020; 7: 658–663.
- De Felice F G, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and the central nervous system. *Trend Neurosci* 2020; 43(6): 355–357.
- Netland J, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection causes neuronal death in the absence of encephalitis in mice transgenic for human ACE2. *J Virol* 2008; 82(15): 7264–7275.
- Li K, et al. Middle east respiratory syndrome coronavirus causes multiple organ damage and lethal disease in mice transgenic for human dipeptidyl peptidase 4. *J Inf Dis* 2016; 213(5): 712–722.
- Zhou J, et al. Active replication of Middle East respiratory syndrome coronavirus and aberrant induction of inflammatory cytokines and chemokines in human macrophages: Implications for pathogenesis. *J Inf Dis* 2014; 209(9): 1331–1342.
- Vonck K, et al. Neurological manifestations and neuro-invasive mechanisms of the severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2. *Eur J Neurol* 2020; 27(8): 1578–1587.
- Mao L, et al. Neurologic manifestations of hospitalized patients with coronavirus disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurol* 2020; 77(6): 683.
- Praveen A, et al. SARS-CoV-2 strategically mimics proteolytic activation of human ENaC. *Elife* 2020 May 26; 9: e58603.