

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Papel de las Micropartículas de Silicio Mesoporoso (MSMPs)
en una nueva vacuna frente al virus SARS-CoV-2

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ana López Gómez

DIRIGIDA POR

Manuel M^a Gómez del Moral Martín-Consuegra
Eduardo Martínez Naves

Madrid

© Ana López Gómez, 2025

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Papel de las Micropartículas de Silicio Mesoporoso
(MSMPs) en una nueva vacuna frente al virus SARS-CoV-2

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADO POR

Ana López Gómez

DIRECTORES

Manuel M^a Gómez del Moral Martín-Consuegra

Eduardo Martínez Naves

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Doctorado en Investigación Biomédica



TESIS DOCTORAL

Papel de las Micropartículas de Silicio Mesoporoso
(MSMPs) en una nueva vacuna frente al virus SARS-CoV-2

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADO POR

Ana López Gómez

DIRECTORES

Manuel M^a Gómez del Moral Martín-Consuegra

Eduardo Martínez Naves

Madrid 2025

Agradecimientos

Por fin llegó el día, el día en el que me convierto en doctora y aún ni me lo creo. Si he llegado hasta aquí ha sido gracias a la gente que me rodea, algunos llevan en mi vida muchos años y otros han ido llegando a ella poco a poco durante esta última etapa, pero que espero que se queden. Los que me conocéis sabéis que no se me da muy bien expresar lo que siento, pero creo que este momento merece el esfuerzo de intentarlo, así que ahí voy.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de tesis **Manolo y Eduardo**, sin vosotros esto no hubiera sido posible. Gracias por guiarme, enseñarme, confiar en mí y permitirme formar parte del grupo de “Molecular”.

Gracias, a los que estáis y a los que estuvisteis, ha sido maravilloso formar parte esta familia. **Irene**, estuviste a mi lado en mis primeros pasos en el laboratorio y en el mundo de la investigación, contigo aprendí mucho de lo que sé de este mundo tan apasionante. Gracias por tu ayuda, tu paciencia, tu disponibilidad y tu alegría. **Bea mayor**, para mí siempre fuiste como una hermana mayor, dándome increíbles consejos tanto fuera como dentro del laboratorio, y aunque no te lo creas gracias a ellos he llegado hasta donde estoy. **Beni**, entramos juntos al departamento y juntos hemos ido dando todos los pasos necesarios para llegar hasta aquí. Ha sido genial compartir esta experiencia contigo. **Bea**, juntas cerramos esta etapa. Tu ya lo lograste Dra. Amorós, enhorabuena, ahora me toca a mí. **Raquel**, llegaste para demostrarnos que éramos un caos y te fuiste para que comprobáramos que te necesitábamos aún más, gracias por tu paciencia y tu ayuda. **Jana y Fran**, habéis llegado en mi última etapa y, aunque no hemos compartido mucho tiempo, seguro que “Molecular” se queda en buenas manos. HASTA SIEMPRE “MOLECULAR”.

Nacho, gracias por todo, por tu ayuda, por tu paciencia y por tus consejos. Junto con **Héctor** os convertisteis en mi día a día, sin ni siquiera saberlo. Parecía imposible que siendo dos personas tan distintas a mí -tanto que parecía que vivíamos en mundos diferentes- nos hayamos convertido en amigos. Gracias por vuestra ayuda, consejos y por los ratitos vividos.

Gracias también a todos mis compañeros de departamento de “inmuno”, a los que estuvisteis en las primeras etapas de esta tesis (Oscar, Marta, Rebe, Tara, Álvaro, Sergio, Laura, Barbara, Dani, Julia, Christian) y a los que entrasteis al final de ella (Lucia, Niko, Iván, Alba, Ángela, Sara, Raquel, Juan, Lara, Marina, Laura, Cris, Ale). Ha sido un placer compartir el día a día con vosotros, las risas, los llantos, los enfados y ... esos “viernes de cervecita”. Una nueva generación de doctores se aproxima, **ÁNIMO**.

Y dentro del departamento, cómo no iban a expresar mi agradecimiento a Carlos y Marta que, junto con Cristina, os habéis convertido en algo más que compañeros de trabajo, os habéis convertido en mis amigos. Gracias por los consejos, las risas, los cafés, los planes improvisados y los viajes. Sin vosotros esta etapa no hubiese sido tan especial. **Carlos**, eres increíble, y aunque la positividad no sea tu fuerte, siempre intentas sacar una sonrisa a la gente que te rodea. **Marta**, eres excelente persona y mejor amiga, y aunque que eres un poco caos, eres mucho más capaz de lo que tú crees. Chicos, aunque ahora parezca que se os “hace bola”, en poco tiempo seréis vosotros lo que os convirtáis en doctores, y ahí estaré yo para verlo. **Cris**, estuviste poco en “inmuno”, pero aun así calaste. Eres de las personas más trabajadoras y perseverantes que conozco y no tengo duda de que conseguirás todo aquello que te propongas. Gracias, a los tres, por todo.

Acompañándome en esta etapa también han estado mis amigas. **Paola y Andrea**, quien nos iba a decir hace unos años que, ese máster y ese confinamiento iban a ser el inicio de nuestra amistad. **Paula, Bea y Marta**, a vosotras os conozco desde hace un poco más de tiempo, juntas pasamos horas y horas en la Universidad Autónoma y nos convertimos en biólogas, y sobre todo en un punto de apoyo mutuo. A todas vosotras gracias.

Edu, no sé en qué momento nos convertimos en amigos, bueno en verdad sí, cuando Sara nos hizo quedar en Madrid, y a pesar de los piques constantes siempre he podido contar con tu apoyo y tus consejos tanto de amigo como de “experto” en biología. Gracias también a **Andrea**, quien, a pesar de vivir a 275 km, desde Zaragoza me ha escuchado y acompañado a lo largo de todas las etapas de mi vida y en esta no iba a ser menos.

María, Ana, Esther, Silvia, Laura y Paula, nos conocemos desde hace 24 años, y juntas desde infantil hemos ido pasando por las diferentes etapas de la vida, alegrándonos de

los logros de cada una y apoyándonos en cada tropiezo. Aunque vosotras muchas veces no hayáis sido conscientes, vuestro apoyo incondicional, las charlas en una terraza - incluso cuando el frío era helador- y las escapadas exprés han sido fundamentales para que yo, hoy, este aquí. Gracias por todo chicas.

Por último, gracias a **mi familia**, a mis tíos y en particular a mis primas, que siempre habéis sido un ejemplo de estudio y esfuerzo; a partir de ahora habrá una doctora más en la familia.

Pero, sobre todo y por encima de todo, gracias a **mis padres**. Me habéis hecho ser la persona que soy, de lo cual me siento tremendamente orgullosa. Gracias por vuestros consejos, vuestro apoyo y vuestra guía. Por saber en cada momento cómo estaba y lo que necesitaba, por enseñarme a ser resiliente y a seguir siempre hacia delante (por decirme tantas veces “eso aumenta la tolerancia a la frustración” cada vez que no me salía un experimento y tenía que volver a empezar). Esta tesis y este título también es vuestro.

ÍNDICE

I.	RESUMEN	1
II.	SUMMARY	5
III.	ABREVIATURAS	9
IV.	INTRODUCCIÓN	15
	1. Adyuvantes en vacunas.	17
	1.1. Características de los adyuvantes.....	18
	1.2. Mecanismo de acción de los adyuvantes.....	19
	1.3. Clasificación de los adyuvantes.	20
	1.4. Adyuvantes autorizados.	21
	1.5. Nuevos adyuvantes inorgánicos.	24
	2. Micropartículas de silicio mesoporoso (MSMPs).	25
	2.1. Silicio como adyuvante.....	25
	2.2. MSMPs inmunoestimuladoras del sistema inmunitario innato.....	26
	2.3. Silicio como adyuvante en vacunas antitumorales.	27
	2.4. MSMPs como adyuvantes para una vacuna viral.	27
	3. SARS-CoV-2 y COVID-19.	28
	3.1. Estructura del SARS-CoV-2.....	30
	3.2. Mecanismo de infección del SARS-CoV-2.....	30
	3.3. Variantes de preocupación (VOCs).	32
	3.4. Desarrollo de vacunas frente al SARS-CoV-2.	33
	4. Sistema inmunitario.	37
	4.1. Neutrófilos.....	37
	4.1.1. Trampas extracelulares de neutrófilos (NETs).....	38
	4.2. Receptores de tipo toll (TLRs).....	39
V.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	43
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	47
	1. Micropartículas de Silicio Mesoporoso (MSMPs).	50
	1.1. Fabricación y funcionalización de las MSMPs.	50
	1.2. Caracterización de MSMPs.	51
	1.3. Marcaje fluorescente de las MSMPs con FITC.....	51
	1.4. Carga de las MSMPs con péptidos y proteínas virales.	51

2. Células mononucleares de sangre periférica (PBMCs).....	52
2.1. Aislamiento de monocitos a partir de la fracción tromboleucocitaria de la sangre.	52
2.2. Diferenciación de monocitos a células dendríticas derivadas de monocitos (moDCs).	52
2.3. Estimulación de PBMCs y moDCs con péptidos virales.....	52
2.4. Estudio de la respuesta T específica frente al SARS-CoV-2.....	53
2.4.1. Citometría de flujo intracelular.	54
3. Células polimorfonucleares de sangre periférica (PMNs).	55
3.1. Aislamiento de neutrófilos por selección negativa.	55
3.2. Estudio de la endocitosis y la formación de NETs.	55
3.2.1. Inmunofluorescencia.	55
3.2.2. Cuantificación de NETs.	56
3.2.2.1. ELISA de mieloperoxidasa (MPO).	56
3.2.2.2. Histona 3 citrulinada (H3cit) mediante citometría de flujo.....	57
4. Animales de experimentación.....	57
4.1. Cepas.	57
4.2. Anestesia.	59
4.3. Inmunización intramuscular (i.m).....	59
4.4. Obtención de suero a través del seno mandibular.....	60
4.5. Sacrificio y obtención de órganos.....	60
5. Respuesta humoral en ratones inmunizados frente al SARS-CoV-2.	61
5.1. Detección de anticuerpos IgG1, IgG2a e IgG total mediante ELISA.	61
5.2. Estudio del porcentaje de neutralización frente a las diferentes variantes del SARS-CoV-2.	62
5.3. Estudio de la correlación entre anticuerpos y neutralización.	62
6. Respuesta celular en ratones inmunizados frente al SARS-CoV-2.....	63
6.1. Aislamiento de esplenocitos.....	63
6.2. Cultivo y estimulación de esplenocitos.	63
6.3. Cuantificación de células B y T del bazo.....	64
6.4. Extracción de ARN de esplenocitos.	64
6.4.1. Lisis celular y extracción de ARN.....	64
6.4.2. Análisis de ARN-seq.	65

7. Ratones k18-hACE2.....	65
7.1. Reto infeccioso con el virus del SARS-CoV-2.	65
7.2. Clinical score.	66
7.3. Análisis de la carga viral en órganos afectados.	68
8. Ratones iDTRMRP8xCRE.	69
8.1. Inyección intraperitoneal (i.p).	69
8.2. Comprobación de la depleción de neutrófilos mediante citometría de flujo.	69
9. Estudio histológico.	70
9.1. Inclusión, corte y fijado de las muestras.	70
9.1.1. Inclusión en parafina.....	70
9.2. Tinción de Hematoxilina/Eosina.....	71
9.3. Inmunohistoquímica.....	72
10. Análisis estadístico.	73
VII. RESULTADOS.....	75
1. Micropartículas de Silicio Mesoporoso (MSMPs).	77
1.1. Caracterización de MSMPs.	77
1.2. Funcionalización de las MSMPs con grupos amino.....	78
1.2.1. Espectroscopía de Infrarrojos por Transformada de Fourier (FTIR).....	78
1.2.2. Análisis químico elemental.	79
2. Estudio de la respuesta inmunitaria frente al complejo MSMPs-S1 en ratones BALB/c.	80
2.1. La respuesta humoral específica frente al virus del SARS-CoV-2, medida mediante la producción de IgG total, IgG1 e IgG2a, mejora en ratones inmunizados con MSMPs-S1.	80
2.2. El suero de ratones inmunizados con MSMPs-S1 muestran un porcentaje de neutralización frente al SARS-CoV-2 comparable a los inmunizados con Al(OH) ₃ -S1.	82
2.2.1. Los ratones inmunizados con MSMPs-S1 muestran una mejor correlación en el tiempo, entre la cantidad de anticuerpos y el porcentaje de neutralización.....	84
2.2.2. Neutralización frente a las distintas variantes de preocupación (VOCs).	85
2.3. Los ratones inmunizados con MSMPs-S1 presentan mayor respuesta celular específica frente al SARS-CoV-2.....	85
2.4. Estudio transcriptómico (ARN-seq) de la expresión de genes del sistema inmunitario en esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados.....	87
2.4.1. MSMPs vs MSMPs-S1.....	89

2.4.2.	Al(OH)3-S1 vs MSMPs-S1.....	91
3.	Protección frente a la infección por SARS-CoV-2 en ratones transgénicos k18-hACE2 inmunizados con MSMPs-S1.....	93
3.1.	Respuesta humoral frente al SARS-CoV-2, medida como producción de IgG1 específica, previa a la infección.....	93
3.2.	Los ratones k18-hACE2 inmunizados con MSMPs-S1 sobreviven a la infección por el virus del SARS-CoV-2.....	94
3.3.	Evaluación de los síntomas clínicos que presentaron los ratones k18-hACE2 inmunizados tras la infección.....	95
3.4.	Menor presencia del SARS-CoV-2 en los órganos de ratones k18-hACE2 inmunizados con el complejo MSMPs-S1.....	96
4.	Estudio in situ del efecto de las MSMPs en la zona de inmunización.....	98
4.1.	Infiltrado de células 4 y 24 horas después de la inoculación de MSMPs.....	98
4.2.	Infiltrado de neutrófilos después de 4 y 24 hora de la inoculación de las MSMPs.....	100
4.2.1.	Formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) tras la inoculación de MSMPs.....	105
4.2.1.1.	Identificación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) a través de la detección de mieloperoxidasa (MPO).....	105
4.2.1.2.	Identificación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) a través de la detección de Histona 3 citrulinada (H3cit).....	107
4.3.	Análisis histológico de la presencia de macrófagos, células B y T en la zona de inyección 24 horas después de la inoculación de MSMPs.....	108
4.3.1.	Detección de macrófagos en el sitio de la inyección 24 horas después de la inoculación de MSMPs.....	108
4.3.2.	Detección de células B en el sitio de inyección 24 horas después de la inoculación de MSMPs.....	110
4.3.3.	Detección de células T en el sitio de inyección 24 horas después de la inoculación de MSMPs.....	111
5.	Estudio in vivo del papel de los neutrófilos en el desarrollo de la respuesta inmunitaria del complejo MSMPs-S1.....	112
5.1.	Depleción de neutrófilos tras una única dosis de toxina diftérica.....	112
5.2.	La respuesta humoral de los ratones inmunizados con el complejo MSMPs-S1 es dependiente de neutrófilos.....	113
5.3.	La respuesta celular de ratones inmunizados con el complejo MSMPs-S1 es dependiente de neutrófilos.....	114

5.4.	Estudio del efecto de la depleción de neutrófilos en las poblaciones de células del bazo de ratones inmunizados con el complejo MSMPs-S1.	116
6.	La estimulación de la respuesta inmunitaria inducida por la MSMPs parece ser dependiente de MyD88.	118
6.1.	Ratones KO MyD88 inmunizados con MSMPs-S1 presentan una respuesta humoral disminuida.....	119
6.2.	Ratones KO MyD88 inmunizados con MSMPs-S1 presentan una respuesta celular disminuida.	119
7.	La estimulación de la respuesta inmunitaria inducida por las MSMPs parece ser independiente de TLR4.	121
7.1.	La respuesta humoral inducida por MSMPs es independiente de TLR4.....	121
7.2.	La respuesta celular inducida por MSMPs es independiente de TLR4.....	122
8.	Estudio in vitro de la respuesta de neutrófilos humanos frente a MSMPs.	124
8.1.	Los neutrófilos humanos endocitan a las MSMPs.....	124
8.2.	Producción de NETs tras la estimulación con MSMPs-FITC.....	127
8.3.	Los neutrófilos humanos estimulados con MSMPs liberan MPO al medio. .	130
8.4.	Los neutrófilos humanos estimulados con MSMPs presentan más Histona 3 citrulinada (H3cit).....	131
9.	Estudio in vitro en humanos de la capacidad inmunoestimuladora de las MSMPs en la respuesta celular frente al virus del SARS-COV-2.	132
VIII.	DISCUSIÓN	135
1.	Las MSMPs conjugadas a la S1 ofrecen protección frente al SARS-CoV-2 y al COVID-19.....	138
2.	Los neutrófilos y la proteína adaptadora MyD88 son fundamentales en el mecanismo de acción de las MSMPs.	146
IX.	CONCLUSIONES.....	155
X.	BIBLIOGRAFÍA.....	159

I. RESUMEN

Introducción

El descubrimiento de los adyuvantes fue un gran avance en el desarrollo de la vacunología pues permitió mejorar y potenciar la respuesta inmunitaria reduciendo las dosis suministradas y la cantidad de antígeno de cada una de ellas. Sin embargo, desde el descubrimiento del hidróxido de aluminio como adyuvante, hace siete décadas, no se han aprobado más de 10 adyuvantes para uso humano. Este hecho, junto con la baja capacidad de los adyuvantes disponibles para estimular la respuesta celular citotóxica, deja de manifiesto la necesidad de búsqueda de nuevos materiales que puedan ser utilizados como adyuvantes.

En 2020 la sociedad vivió un hito histórico, la primera pandemia del mundo globalizado tal y como lo conocemos ahora. Esta pandemia, que se conoció como la COVID-19, fue causada por el virus del SARS-CoV-2 y obligó a restringir la movilidad de los ciudadanos. Sin embargo, esta pandemia nos permitió vivir otros hechos históricos: la carrera científica por la aprobación de vacunas frente a esta enfermedad, y la aprobación por primera vez de vacunas basadas en la tecnología del ARN mensajero.

Este trabajo se centra en estudiar tanto el potencial como el mecanismo de acción del silicio mesoporoso como adyuvante en una vacuna proteica frente al SARS-CoV-2, usando la subunidad S1 de la proteína de espícula (spike) como antígeno. Previamente, nuestro grupo ya había demostrado el potencial inmunoestimulador de las micropartículas de silicio mesoporoso (MSMPs) en modelos *in vitro*, y su capacidad adyuvante en una vacuna anti-tumoral usando un carbohidrato como antígeno.

Resultados

En primer lugar, se demostró, en modelos *in vivo*, el potencial de las MSMPs conjugadas a la subunidad S1 del SARS-CoV-2 para estimular la respuesta humoral, la capacidad de neutralización y la respuesta celular en un ensayo longitudinal. Además, se comprobó, en ratón, la capacidad de las MSMPs para estimular la respuesta Th1 y su potencial para inducir una respuesta T citotóxica específica frente a la proteína S, corroborándose, con los datos obtenidos *in vitro* en humanos, la capacidad de las MSMPs para aumentar la respuesta T específica de memoria en donantes sanos.

En segundo lugar, se demostró en modelos *in vivo* k18-hACE2 la capacidad de las MSMPs de proteger frente al desarrollo grave y la muerte por COVID-19, así como su capacidad para proteger de la infección por SARS-CoV-2, favoreciendo el aclaramiento viral y evitando la infección de órganos como el cerebro.

Finalmente, se comenzó a esclarecer el mecanismo de acción de este adyuvante demostrándose a través del modelo *in vivo* iDTRMRP8xCRE, el papel crucial de los neutrófilos en la acción adyuvante de las MSMPs y la capacidad de estas para reclutar a los neutrófilos en la zona de inmunización e inducir la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) tanto *in vivo* como *in vitro*. Además, se demostró, mediante el uso del modelo murino KOMyD88, la dependencia de las MSMPs de la proteína adaptadora MyD88 para ejercer su actividad adyuvante.

II. SUMMARY

Introduction

The discovery of adjuvants was a breakthrough in the field of vaccinology, significantly enhancing immune responses while requiring lower doses of antigens. However, since the development of aluminum-based adjuvants seven decades ago, fewer than 10 adjuvants have been approved for human use. The scarcity of adjuvants, combined with their limited ability to stimulate cellular responses, underscores the urgent need to explore and develop new materials that can serve as adjuvants in human vaccines.

In 2020, humanity faced a historic event: the first pandemic in the modern globalized world. This pandemic, widely known as the COVID-19 pandemic, was caused by the SARS-CoV-2 virus and resulted in worldwide lockdowns. Nevertheless, it sparked an unprecedented scientific race to develop vaccines against the disease, culminating in the approval of the first mRNA vaccines.

This work focuses on studying both the potential and the mechanism of mesoporous silicon microparticles (MSMPs) as an adjuvant in a protein-based vaccine against SARS-CoV-2. This vaccine uses the S1 protein as the antigen and MSMPs as the adjuvant. Previously, our group demonstrated the immunostimulatory effect of MSMPs through *in vitro* models and confirmed their adjuvant effect in a cancer vaccine using *in vivo* models.

Results

First of all, we demonstrated the potential of MSMPs-S1 to stimulate and enhance humoral response, neutralization capacity and cellular response in a long-term assay using *in vivo* models. Additionally, we confirmed the ability of MSMPs to stimulate a Th1 response and to enhance the specific cytotoxic response against the S protein. These findings aligned with *in vitro* studies on T cell responses against SARS-CoV-2 in healthy donors.

Secondly, through the k18-hACE2 mice model, we observed the ability of MSMPs to protect against severe forms of COVID-19, as well as their protective role in SARS-CoV-2 infection by promoting viral clearance in certain organs, such as the brain.

Finally, we began studying the mechanism of MSMPs, highlighting the crucial role of neutrophils in their effect, using iDTRMRP8xCRE transgenic mice and demonstrating the

SUMMARY

capacity of MSMPs to stimulate and recruit this cell type. Furthermore, using MyD88 KO mice we demonstrated the dependence of MSMPs on the adaptor protein MyD88 for their adjuvant activity.

III. ABREVIATURAS

A	Amperios
ACE2	Enzima convertidora de angiotensina 2
ACK	Amonio cloruro potasio
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Al(OH) ₃	Hidróxido de aluminio
APCs	Células presentadoras de antígenos
APTS	3-aminopropiltriétoxisilano
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARN-seq	Secuenciación de ARN
ASIA	Síndrome autoinmune/inflamatorio inducido por adyuvante
BAFF	Activador de linfocitos B
BSA	Seroalbumina bovina
BV	De sus siglas en inglés “Brillant Violet”
°C	Grados centígrados
CNIC	Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares
COV	Coronavirus
CT	Ciclo umbral
DAB	Diaminobencidina
DAMP	Patrones moleculares asociados a daño
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DCs	Células dendríticas
DEGs	Genes de expresión diferencial
DTT	Ditiotreitol
DTR	Receptor de la toxina diftérica
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
FBS	Suero fetal bovino
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FTIR	Infrarrojos por transformada de Fourier
G	Fuerza relativa de centrifugación
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
hACE2	Enzima convertidora de angiotensina 2 humana
HCL	Ácido clorhídrico
H/E	Hematoxilina/eosina
HLA	Sistema del antígeno leucocitario humano
HRP	Peroxidasa de rábano
H3cit	Histona 3 citrulinada
Idtr	Receptor de la toxina diftérica inducible

ABREVIATURAS

IFN γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
i.m.	Inyección intramuscular
INIA	Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria
i.p.	Inyección intraperitoneal
k18	Queratina 18
KEGGs	Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto
KO	Knock-out
LPS	Lipopolisacárido
M1/M2	Macrófagos
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MERS	Síndrome respiratorio de oriente medio
MFI	Intensidad media de fluorescencia
moDCs	Células dendríticas derivadas de monocitos
MPO	Mieloperoxidasa
MRP8	Proteína 8 relacionada con mieloides
MSMPs	Micropartículas de silicio mesoporoso
MSN	Nanopartículas de sílice mesoporosas
MyD88	Diferenciación mieloide 88
NE	Neutrófilo elastasa
NETs	Trampas extracelulares de neutrófilos
NH ₃	Nitrógeno
NK cells	Células asesinas naturales (natural killers)
NLRP3	Receptor de la familia NOD con dominio pirina 3
OD	Densidad óptica
OMS	Organización mundial de la salud
o/n	De sus siglas en inglés "over night"
PAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
PBLs	Linfocitos de sangre periférica
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PCLG	Fosfolipasa C gamma
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldehído
PFU	Unidad formadora de placas
PMA	Ácido fosfomolibdico
PMNs	Leucocitos polimorfonucleados

PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
qPCR	PCR cuantitativa
R ²	Coefficiente de Pearson
RAGE	Receptor de productos finales de glicación avanzada
RBD	Dominio de unión al receptor
Rh	Recombinante humano
Rm	recombinante murino
Rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	De sus siglas en inglés “Roswell Park Memorial Institute”
RTq-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa Cuantitativa
S	Proteína Spike o espícula
S1	Subunidad 1 de la proteína S
SARS	Síndrome respiratorio agudo
SD	Desviación estándar
SEM	Microscopio electrónico de barrido
SiOH	Silanol
TA	Temperatura ambiente
Th	Células T colaboradoras
TIR	Receptor Toll/IL-1
TLRs	Receptores de tipo Toll
TMB	3,3',5,5' tetrametilbenzidina
TMPRSS2	Proteasa transmembrana serina 2
TNF	Factor de Necrosis tumoral
TRIF	Interferón beta inductor del adaptador que contiene un dominio TIR
U	Unidades internacionales
UAM	Universidad Autónoma de Madrid
UV	Ultravioleta
VOCs	Variantes de interés, de sus siglas en ingles “variants of concern”
W	Vatios
WT	De sus siglas en ingles “Wild type”
µm	Micrómetros
∅	Diámetro

IV. INTRODUCCIÓN

1. Adyuvantes en vacunas.

Edwar Jenner fue el primero en demostrar científicamente el efecto de la protección tras la vacunación, creando en 1796 la primera vacuna efectiva contra la viruela. A partir de este momento, la vacunación ha permitido reducir la incidencia de enfermedades con alta morbilidad y mortalidad, permitiendo erradicar por completo una de las enfermedades más mortales, la viruela¹. Las primeras vacunas estaban formadas por patógenos vivos atenuados, lo que generaba una respuesta inmunitaria potente pero una gran cantidad de efectos adversos, como la reversión de la virulencia². Para evitar estos efectos adversos y aumentar la confianza de la población en la vacunación, se cambió la composición de las vacunas, pasando a estar formadas por subunidades del patógeno capaces de inducir una respuesta inmunitaria³, reduciendo así los efectos secundarios, pero también la duración de la inmunidad y la eficacia de la respuesta⁴. Estas subunidades es lo que hoy se conoce como antígenos³ y los inconvenientes derivados de su uso se resolvieron al usarse adyuvantes junto a ellos⁴.

Actualmente una vacuna está compuesta por un antígeno y un adyuvante (del latín *adjuvare*, «ayudar»). Los antígenos son proteínas, carbohidratos u otras moléculas provenientes del patógeno, de las cuales se espera que desencadenen una respuesta inmunitaria. Los adyuvantes son sustancias de distinta naturaleza que se añaden a las vacunas, o tratamientos, para mejorar su magnitud, su durabilidad y su efecto⁵. Sin embargo, en muchos casos, aunque mejoren la respuesta inmunitaria son los responsables de los principales efectos secundarios del complejo vacunal del que forman parte⁵. Normalmente estos efectos adversos son transitorios, pero en algunos casos los adyuvantes desencadenan efectos secundarios mucho más severos como la autoinmunidad, a esto se le conoce como síndrome autoinmune/inflamatorio inducido por adyuvante (ASIA). Por ejemplo, los depósitos de aluminio pueden generar a una activación crónica de la respuesta Th2⁶.

La terminología adyuvante fue acuñada por primera vez en 1920 por el veterinario Gastón Ramón, quien descubrió que los caballos vacunados contra la difteria que presentaban abscesos en la zona de inmunización tenían un mayor título de anticuerpos. Además, demostró cómo añadiendo diversas sustancias, como el almidón, a la toxina se generaba una mayor producción de anticuerpos⁴. Prácticamente de forma simultánea,

en 1925, Thomas Glenny descubrió las propiedades del aluminio, y es a partir de este momento cuando se empezaron a utilizar las sales de aluminio como adyuvante en vacunas⁵. Posteriormente, se descubrió el adyuvante incompleto de Freund, una emulsión de aceites minerales en agua, que fue desestimada para su uso en humanos debido a su efecto reactivo tras un uso continuado⁷.

Durante décadas se han ido estudiando diferentes compuestos con potencial para ser utilizados como adyuvantes. En muchos casos, se ha demostrado su efecto y eficacia en modelos preclínicos, pero muy pocos de ellos han conseguido llegar a ensayos clínicos al no poderse asegurar su seguridad y tolerabilidad. Esto ha provocado que desde 1925 existan muy pocos adyuvantes aprobados para uso humano, siendo uno de ellos el hidróxido de aluminio^{5,7}. Actualmente, los adyuvantes se utilizan con dos objetivos claros: aumentar la magnitud de la respuesta inmunitaria al antígeno, medida como producción de anticuerpos y protección frente a nuevas infecciones, y producir una respuesta adaptativa más eficaz para cada patógeno⁸.

1.1. Características de los adyuvantes.

Para que un compuesto químico sea considerado adyuvante tiene que cumplir una serie de características⁸ y posteriormente, tiene que cumplir otras características para ser considerado como ideal⁹ (**Tabla I1**).

A pesar de que han pasado 100 años desde de la utilización del primer adyuvante, ninguno de los disponibles para uso humano ha sido considerado como ideal. Esto demuestra la necesidad de buscar nuevos materiales y compuestos que, además de cumplir con las características básicas de los adyuvantes cumplan con el mayor número de características para llegar a ser considerados como ideales.

CARACTERÍSTICAS ADYUVANTES	GENERALES	CARACTERÍSTICAS ADYUVANTES IDEALES
Aumentar la inmunogenicidad de las vacunas.		Seguro.
Reducir la cantidad de antígeno usado en el complejo vacunal.		Bien definido químicamente.
Permitir la inmunización con el menor número de dosis.		Biodegradable.
Asegurar la inmunización de individuos inmunocomprometidos.		Mecanismo de acción bien definido.
Aumentar la generación de células de memoria.		Químicamente estable en su almacenamiento.
Aumentar la velocidad de la respuesta inicial.		Elevada eficacia frente a cualquier antígeno.
Aumentar la especificidad, afinidad y amplitud de la respuesta.		Capaz de desarrollar respuestas inmunitarias efectivas.
		Fácil de preparar.
		Bajo coste.

Tabla I1: Características generales que han de presentar todos los adyuvantes y las características que tienen que presentar los adyuvantes para que sean considerados ideales.

1.2. Mecanismo de acción de los adyuvantes.

El principal papel de los adyuvantes es la mejora de la respuesta adaptativa, y esto lo consiguen mediante la estimulación de la respuesta innata. Para ello, los adyuvantes pueden actuar sobre distintos pasos (**Figura I1**):

- Interacción del adyuvante con los receptores de tipo Toll (TLRs): la interacción de los adyuvantes con estos receptores va a inducir la activación y maduración de las células presentadoras de antígeno (APCs) mejorando la respuesta inmunitaria adaptativa⁹.
- Presentación antigénica: se puede deber al efecto depósito, el cual se caracteriza por una liberación prolongada y lenta del antígeno, o el aumento de expresión de moléculas co-estimuladoras, como CD80 o CD86, las cuales son fundamentales para la presentación antigénica^{7,9}.

- Liberación de citoquinas: los adyuvantes inducen la liberación de citoquinas inflamatorias en células innatas como células dendríticas, macrófagos y neutrófilos. Esta liberación de citoquinas tiene dos efectos, por un lado, atraer a más células de la respuesta innata y por el otro, aumentar la expresión de moléculas co-estimuladoras facilitando en ambos casos la presentación antigénica^{7,9}.
- Polarización de la respuesta T: depende de las citoquinas liberadas por las células innatas al interactuar con el adyuvante. Esta polarización de la respuesta va a condicionar el efecto del adyuvante⁹.

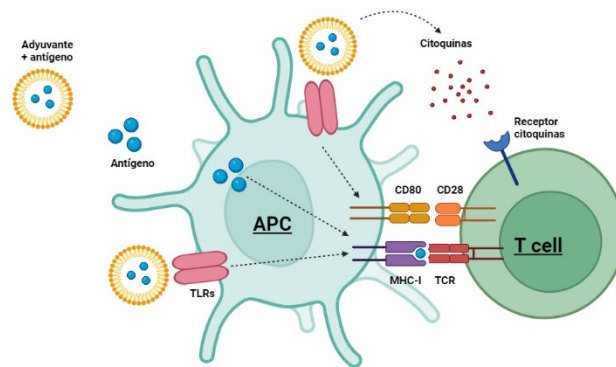


Figura 11: Mecanismos de acción de los adyuvantes en cuanto a la estimulación del sistema inmunitario. Imagen realizada en Biorender.

1.3. Clasificación de los adyuvantes.

Durante años se han ido haciendo múltiples clasificaciones en función de diversos parámetros. Una de las primeras clasificaciones, la cual ya está en desuso, fue determinada por Edelman R. (1992)¹⁰, y clasificaba a los adyuvantes en tres grupos: adyuvantes tipo vehículo, proteínas portadoras e inmunoestimulantes activos. Dentro de las clasificaciones que encontramos actualmente tenemos aquella que divide a los adyuvantes según su naturaleza o bien aquella que los divide en función de su mecanismo de acción^{11,12}.

Según su mecanismo de acción los adyuvantes se pueden clasificar en inmunoestimulantes y en sistemas de administración. El primer caso, se basa en la actuación del adyuvante como PAMP o DAMP lo que conlleva su interacción con los PRRs provocando la activación y maduración de las APCs^{7,13}. En el segundo caso, los adyuvantes se encargan de aumentar las señales del antígeno que estén presentando a

las células dendríticas. Esto lo consigue mediante el aumento de la biodisponibilidad del antígeno, como es el caso de MF59¹⁴, la liberación prolongada del antígeno, como es el caso del hidróxido de aluminio¹⁵, o la formación de un nicho inmunitario, de manera que se prolonga la retención del antígeno atrayéndose más cantidad de células inmunitarias, y, es lo que se conoce como efecto depósito¹⁶.

1.4. Adyuvantes autorizados.

Salas de aluminio

El hidróxido de aluminio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) es el adyuvante más utilizado. Se caracteriza por inducir respuesta de anticuerpos y respuesta de células T CD4+ de tipo Th2^{17,18}. El principal inconveniente que tiene este adyuvante, desde el punto de vista inmunológico, es su incapacidad de producir una respuesta celular robusta y duradera⁷. Se ha visto que su respuesta es independiente de TLR¹⁹, y que su actividad se ejerce a través de la activación de la vía del inflamasoma (NLRP3) en macrófagos y células dendríticas^{8,20,21}.

En un principio se pensó que el papel del aluminio venía dado por su capacidad para inducir un efecto depósito en la zona de inmunización^{8,22}, sin embargo, hoy se sabe que este no es el principal mecanismo por el cual el hidróxido de aluminio ejerce su función. Se ha demostrado como la inmunización con aluminio genera un reclutamiento de células del sistema inmunitario, como neutrófilos, los cuales se activan pudiendo inducir la liberación de NETs²³, que podrían ser responsables del efecto del hidróxido de aluminio. Sin embargo, no hay evidencias científicas del papel de los NETs en la acción adyuvante del aluminio. Parece ser que el mecanismo de acción del aluminio es complejo, interviniendo en él diversos factores que todavía se desconocen. A pesar de ser uno de los adyuvantes más estudiados y utilizados, a día de hoy siguen existiendo controversia en relación a su uso⁸. Uno de los principales inconvenientes del hidróxido de aluminio es su toxicidad debido a su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y a su baja degradabilidad, provocando respuestas inflamatorias exacerbadas¹. Se ha demostrado la presencia del aluminio en el organismo hasta once años después de la vacunación, y esto junto con la exposición prolongada a este material, al encontrarse en muchos alimentos y cosméticos, podría provocar una hiperactivación del sistema inmunológico con su correspondiente inflamación²⁴.

MF59

Es una emulsión de aceite en agua que se utilizó por primera vez como adyuvante en 1997 en una vacuna trivalente inactivada contra la gripe estacional. Está compuesto por escualeno, un aceite biodegradable y biocompatible que se encuentra de forma natural en nuestro organismo²⁵. Fue el primer adyuvante aprobado para uso humano que no contenía aluminio⁷. Es el adyuvante más utilizado después del aluminio y tiene su base en el adyuvante de Freund²⁶.

Cuando se suministra intramuscularmente genera una activación de las células dendríticas y macrófagos en el músculo, las cuales liberan diversas citoquinas, como IL-8, que se encargan del reclutamiento de más células del sistema inmunitario innato como neutrófilos o monocitos²⁷. Posteriormente estas células migran a los ganglios linfáticos donde activan a células B y T. Este adyuvante, al igual que el hidróxido de aluminio, induce una respuesta de tipo Th2⁷, pero presenta ciertas diferencias con él, principalmente en relación a su mecanismo de acción y es que, MF59 es capaz de activar MyD88, de forma independiente a los TLRs, en lugar de activar a la vía NLRP3²⁸. Además, favorece el reclutamiento de células dendríticas en la zona de inmunización de forma más eficaz que el hidróxido de aluminio²⁹.

Matrix-M

Es un adyuvante basado en saponinas, formado por la mezcla de dos saponinas distintas. Induce un reclutamiento, en la zona de inmunización, de células inmunitarias innatas, pero sin inducir un efecto depósito³⁰. Además, induce la liberación de citoquinas proinflamatorias que intervienen en la diferenciación de las células T hacia fenotipo Th1³¹. Aunque no se conoce mucho el mecanismo de acción de este adyuvante, sí que se ha visto que es capaz de activar el inflamasoma³² y a células presentadoras capaces, a su vez, de activar a las células T CD4+ a través del MHC-II^{30,33}.

CpG108

Es un oligonucleótido no metilado que es capaz de activar las células T CD4+ hacia una respuesta de tipo Th1, las células B y las células NK³⁴. Estos oligonucleótidos se encuentran habitualmente en organismos procarióticos pero no en eucarióticos³⁵. El mecanismo de acción de este adyuvante se basa en la activación de TLR9 a través de

MyD88³⁴. Estos oligonucleótidos favorecen la maduración de las células dendríticas que expresan TLR9, siendo la mayoría de los estudios en ratón, pero solo las plasmacitoides en humanos^{35,36}.

Adyuvantes lipídicos

Las nanopartículas de lípidos (LNPs), con diámetros medios de 70nm, mejoran la encapsulación de los ácidos nucleicos como el ARN, facilita la entrada en las células y mejora la estabilidad del propio material genético³⁷.

Complejo ASO

Son una combinación de adyuvantes clásicos. Están compuestos por aluminio y lípidos⁵, actualmente solo tres están disponibles para uso humano AS04, AS03 y AS01 y su mecanismo de acción depende de sus componentes. Por ejemplo, AS04 se basa en una forma inactivada de LPS en sales de aluminio que activa la vía de TLR4³⁸, mientras que, AS03 lo hace en una emulsión de aceite de escualeno junto con vitamina E y su mecanismo de acción se basa en la liberación de citoquinas en los ganglios y en la zona de inmunización que atrae a células del sistema inmunitario innato³⁹. Se ha aprobado el uso de este tipo de adyuvantes en vacunas contra la hepatitis B (AS04), el papiloma humano (AS04), virus de la gripe humana (AS03)⁴⁰ y el virus de varicela zoster (AS01)⁴¹.

ADYUVANTE	MECANISMO DE ACCIÓN	CÉLULAS T	RESPUESTA
Sales de aluminio	NLRP3	CD4+	Th2
Matrix M	Dependiente de MyD88	CD4+	Th2
CpG108	TLR9	CD4+	Th1
Adyuvantes lipídicos	TLR7, TLR8	CD4+	Th1
Complejo ASO	TLR4 y otros	CD4+	

Tabla 12: Principales adyuvantes aprobados actualmente para uso humano junto con su mecanismo de acción, las células T a las que estimula y el fenotipo de la respuesta que desencadena.

Como se ha podido observar, ningún adyuvante para uso humano es capaz de estimular a las células T CD8+, fundamentales para el desarrollo de la respuesta adaptativa. Únicamente las vacunas de ARNm, las cuales utilizan adyuvantes lipídicos, son capaces de inducir esta respuesta, ya que permiten la producción de péptidos virales de manera

endógena, los cuales son reconocidos por MHC-I y presentados, posteriormente, a las células T CD8⁺^{5,8}.

La generación de respuestas T CD8⁺ por parte de los adyuvantes es uno de los principales retos a los que se enfrenta la sociedad científica. La ausencia de adyuvantes capaces de estimular a estas poblaciones de células deja de manifiesto la necesidad de búsqueda de nuevos materiales que sí que sean capaces de ello, y que cumplan las condiciones necesarias para ser utilizados en el ser humano, pudiéndose asegurar tanto su seguridad como su tolerabilidad.

1.5. Nuevos adyuvantes inorgánicos.

La encapsulación de proteínas recombinantes en micro y nanopartículas biocompatibles y biodegradables está en auge, debido a la capacidad de estas partículas de activar a las células presentadoras y otras células del sistema inmunitario^{42,43}.

Actualmente se están investigando nuevos materiales inorgánicos para ser usados como adyuvantes. Uno de los más investigados es el oro, en forma de nanopartículas, debido a sus propiedades fisicoquímicas como su tamaño, morfología, carga superficial, ect⁴⁴. Sin embargo, este material no es biodegradable, lo que supone un gran inconveniente para su uso en humanos, al poder generar cierta toxicidad en el organismo⁴⁵. Diversos estudios han demostrado como las nanopartículas de oro son capaces de activar la vía de NLRP3, provocando la liberación de citoquinas que favorecen la polarización de la respuesta hacia fenotipo Th2⁴⁶. De hecho, ensayos de infectividad frente al SARS-CoV-2 demostraron como este adyuvante no era capaz de generar una respuesta celular potente⁴⁷. Además de las nanopartículas de oro también se está investigando el uso del carbono o del silicio como adyuvantes. Algunas ventajas de estos materiales son su biocompatibilidad, su biodegradabilidad, su morfología y la posibilidad de elaborar una capa porosa sobre ellos^{45,48}.

El silicio mesoporoso fue descubierto en 1992 por la compañía Mobil Corporation⁴⁹ y desde ese momento no se han dejado de estudiar sus propiedades fisicoquímicas, que hacen de este material un candidato ideal, no solo para el transporte de fármacos, sino también para ser utilizado como adyuvante en vacunas⁵⁰.

2. Micropartículas de silicio mesoporoso (MSMPs).

2.1. Silicio como adyuvante.

El silicio se caracteriza por ser biocompatible y biodegradable⁵¹. Presenta múltiples propiedades fisicoquímicas beneficiosas para su uso como adyuvante, como son la elevada tensión superficial (de hasta 1500 cm²/g), el elevado volumen de poro en su superficie (≈ 1 cm³/g), la estructura porosa modulable y la facilidad de ser funcionalizado⁵². La funcionalización consiste en la adición de grupos de distinta naturaleza que aumenten la interacción y la unión del silicio con el compuesto a transportar. Este material también se caracteriza por la presencia de grupos silanol (Si-OH) que permiten modificar sus propiedades fácilmente⁵¹. Además, se puede generar sobre su superficie, de forma sencilla, una capa mesoporosa, con poros de entre 2-250nm, de manera que se aumente su utilidad a la hora de transportar antígenos o fármacos^{53,54}.

La primera vez que se utilizó el silicio como material para la administración de fármacos fue en 2001, donde Vallet-Regi et al. utilizaron nanopartículas de este material para transportar ibuprofeno, el cual fue liberado de forma prolongada y pausada⁵⁵. A partir de este momento se han diseñado partículas de silicio de diversos tamaños y formas, entre las que destacamos las nanopartículas de sílice mesoporosas (MSN) y las micropartículas de silicio mesoporoso (MSMPs). En ambos casos se ha demostrado su capacidad para transportar proteínas en el interior de sus poros o unidas químicamente a su superficie⁵⁶⁻⁵⁸. Actualmente, las nanopartículas de sílice mesoporoso se encuentra en ensayos de inmunización en ratones para estudiar su capacidad adyuvante frente a distintas enfermedades⁵⁹. En estas nanopartículas, al igual que en las micropartículas del mismo material, se puede variar el tamaño del poro lo que permite cargar moléculas de distinto tamaño, siendo proporcional el tamaño de la molécula, el tamaño del poro y la velocidad de liberación⁵⁸.

Las partículas de silicio mesoporoso se producen principalmente mediante dos métodos, utilizándose en la mayoría de los casos un método de condensación en dos pasos que acaba generando una estructura porosa y ordenada⁶⁰. Sin embargo, en otras ocasiones, como es el caso de las micropartículas de silicio mesoporoso que se han utilizado en este

trabajo, el adyuvante se obtiene a partir de una oblea de silicio a la cual, mediante un método electroquímico, se le genera una capa mesoporosa, con tamaño de poro ajustable, y la cual se tamiza y machaca para obtener el tamaño de partícula deseado⁶¹. Este procedimiento se explicará más adelante, en el apartado de métodos.

La presencia de poros en la superficie, junto con la funcionalización hacen de las micropartículas de silicio un material ideal en el que cargar antígenos de distinta naturaleza como péptidos o carbohidratos. Con respecto a la liberación de la carga, las MSMPs inducen una liberación lenta y paulatina⁶², en el caso de los péptidos virales se libera alrededor de un 30% de la carga original, porcentaje suficiente para inducir una potente respuesta inmunitaria, como ya se ha demostrado en estudios previos⁵⁰.

2.2. MSMPs inmunoestimuladoras del sistema inmunitario innato.

Experimentos *in vitro* en nuestro laboratorio han permitido demostrar como las MSMPs son capaces de inducir la maduración y activación de células presentadoras como células dendríticas humanas, observándose un aumento de expresión de marcadores como HLA I, HLA II, CD80 y CD86^{50,63}. Además, tienen un gran potencial activando a células T vírgenes, lo que es fundamental para el desarrollo de una respuesta inmunitaria adecuada⁶⁴.

Las MSMPs presentan una elevada capacidad inmunoestimuladora, activando de forma más eficiente a las células dendríticas cuando se conjugan con péptidos virales⁵⁰. Al inducir la maduración de las células presentadoras, se comprobó como las MSMPs conjugadas con péptidos eran capaces de mejorar la actividad citotóxica de los linfocitos⁵⁰. La alta eficiencia de las MSMPs en activar a células dendríticas y favorecer la presentación cruzada, se debe, en parte, a la hidrólisis de las MSMPs en los endosomas de las células dendríticas y a la liberación paulatina de los péptidos que se encuentran conjugados a ellas^{63,65,66}. Aparte de activar e inducir la maduración de las células dendríticas, las MSMPs son capaces de activar otras células inmunitarias como macrófagos y neutrófilos⁶³. Las células epiteliales también son capaces de endocitar a las MSMPs, siendo este proceso fundamental para el desarrollo de la actividad adyuvante del silicio^{67,68}.

2.3. Silicio como adyuvante en vacunas antitumorales.

Como precedente de las micropartículas como adyuvantes en vacunas antitumorales encontramos diversos estudios sobre el uso de nanopartículas en vacunas terapéuticas frente a diferentes tipos de tumores. Ensayos *in vivo* demostraron como la inoculación de nanopartículas de silicio conjugadas a péptidos tumorales retrasaba el crecimiento tumoral en ratones con cáncer de mama, llegando incluso a provocar la remisión gracias al infiltrado de células T que llegaba al tumor tras la inoculación de las nanopartículas⁶⁹.

En los últimos años nuestro grupo se centró en el desarrollo de una vacuna antitumoral, usando como antígeno un carbohidrato tumoral y como adyuvante las MSMPs. En modelos de ratón demostramos como las MSMPs conjugadas con el carbohidrato eran capaces de inducir una potente respuesta humoral y celular siendo mayor a la generada por el antígeno solo. Sin embargo, no solo se demostró la capacidad de las MSMPs para estimular la respuesta adaptativa, sino que también se vio como los ratones inmunizados con MSMPs junto con el antígeno estaban protegidos frente al desarrollo tumoral, favoreciéndose su supervivencia tras la inoculación de las células tumorales⁶³.

2.4. MSMPs como adyuvantes para una vacuna viral.

Actualmente las vacunas virales se centran en generar una potente inmunidad celular intentando potenciar el componente citotóxico de esta⁷⁰, además de potenciar la respuesta humoral. Para que se produzca una activación de los linfocitos T citotóxicos es necesario que las células dendríticas presenten péptidos virales a través de su MHC-I a los linfocitos T CD8+; a este proceso se le conoce como presentación cruzada⁷¹, y es fundamental para que se desencadene la respuesta celular que las nuevas vacunas virales están buscando.

Las vacunas virales suelen estar basadas en péptidos del propio virus, estos péptidos son seleccionados normalmente por ser los más inmunogénicos dentro de la proteína de interés, es decir, son los que más van a activar al sistema inmunitario. Muchas vacunas suelen contener varios epítomos capaces de ser reconocidos y presentados por varios HLA con el objetivo de activar tanto células T citotóxicas como foliculares. Sin embargo, estas vacunas presentan una gran cantidad de inconvenientes en cuanto a su producción y seguridad⁷⁰ debido a la mayor inestabilidad de los péptidos en comparación con las

proteínas completas⁷². El uso de adyuvantes porosos permite solventar este problema, ya que los péptidos se cargan en el interior de los poros reduciéndose así el riesgo asociado a la inestabilidad mencionada previamente⁷³.

Tras la inmunización frente a la hepatitis B de ratones BALB/c con un complejo vacunal basado en nanopartículas de silicio, se demostró como estos ratones presentaban una elevada respuesta humoral muy similar a la generada en ratones inmunizados con el complejo vacunal basado en hidróxido de aluminio. Además, se demostró como las nanopartículas de silicio estimulaban la producción de IgG2a favoreciéndose una polarización de la respuesta hacia fenotipo Th1⁷⁴.

De manera independiente, ensayos realizados por Adam et al. (2022) demostraron como micropartículas de silicio poroso modificadas con CpG (ligando de TLR9) unidas la región RBD del SARS-CoV-2 eran capaces de inducir una liberación prolongada y duradera del antígeno estimulando a las células dendríticas y generando una robusta respuesta de tipo Th1⁷⁵.

A pesar de todo el potencial, que, tras años de investigación, se ha visto que poseen los adyuvantes basados en silicio, todavía no se ha aprobado ningún ensayo clínico con este material, ni en su versión terapéutica ni en su versión de adyuvante⁷³. Además, tampoco se conoce el mecanismo de acción de este adyuvante, lo cual es fundamental para su aprobación. Esto demuestra la necesidad de continuar con la investigación en torno a este material con el objetivo de conocer más a fondo su mecanismo de acción, su trazabilidad y su papel sobre el sistema inmunitario.

Este trabajo trata de estudiar el papel del silicio, en forma de micropartículas de silicio mesoporoso (MSMPs) para estimular la respuesta inmunitaria adaptativa aumentando la protección frente a la infección. Además, pretende indagar sobre el mecanismo de acción de este material, mediante su reconocimiento a través de TLRs y su interacción con diversas células del sistema inmunitario innato.

3. SARS-CoV-2 y COVID-19.

Los coronavirus son un grupo diverso de virus que pueden infectar tanto animales como personas causando en ellos una enfermedad respiratoria leve, produciendo en la mayoría de los casos lo que conocemos como resfriado común. Sin embargo, en

determinadas ocasiones estos virus han sido responsables de enfermedades bastantes más graves que un simple resfriado^{76,77}, como por ejemplo la enfermedad de COVID-19 (enfermedad por coronavirus 2019). El COVID-19 es una enfermedad infecciosa causada por el virus del SARS-CoV-2 (coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo 2) que provoca una neumonía viral bastante inusual⁷⁸.

El virus del SARS-CoV-2 es un virus de ARN de cadena simple, de aproximadamente 30kb⁷⁹, que forma parte de la familia de los beta-coronavirus⁸⁰, que se caracterizan por presentar una única hebra de ARN envuelta y de sentido positivo⁸¹. Dentro de esta familia encontramos siete tipos de coronavirus capaces de causar enfermedades al ser humano, de los que tres de ellos han tenido una gran repercusión social y económica: SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2⁸². Los tres tienen un origen zoonótico, siendo su principal reservorio el murciélago y necesitando un hospedador intermedio para infectar a los humanos, el cual fue la civeta y el dromedario en el caso del SARS-CoV y del MERS-CoV respectivamente. En el caso del SARS-CoV-2 en un primer momento se pensó que el pangolín podía ser el hospedador intermedio aunque actualmente está prácticamente descartado⁸⁰.

Filogenéticamente se ha demostrado que el virus del SARS-CoV-2 comparte un genoma idéntico al 80% con el virus del SARS-CoV y al 50% con el virus del MERS-CoV. Estos dos tipos de coronavirus causaban neumonías graves con una elevada tasa de mortalidad, siendo la elevada letalidad la razón por la cual no consiguieron diseminarse y se quedaron restringidos en sus zonas de origen, China y Arabia Saudita respectivamente. Sin embargo, el SARS-CoV-2, a pesar de causar también una neumonía grave, tiene una letalidad menor, lo que le ha permitido diseminarse fácilmente por el planeta, causando la pandemia de COVID-19^{78,83}.

El primer brote, de lo que hoy conocemos como COVID-19, fue reportado a la Organización Mundial de la Salud (OMS) por China en diciembre de 2019, pero no fue hasta el 11 de marzo de 2020 cuando la OMS declaró el estado de pandemia⁸³. Desde que se declaró el estado de pandemia, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se han registrado 316 millones de casos a nivel mundial, de los cuales un 4,4% se han registrado en nuestro país⁸⁴.

3.1. Estructura del SARS-CoV-2.

El SARS-CoV-2 consta de cuatro proteínas estructurales que son fundamentales para su propagación e infección y ocho proteínas no estructurales, como la ARN polimerasa, fundamental para la replicación viral, además de distintas proteasas⁸⁵. Las cuatro proteínas estructurales son las siguientes:

Proteína espícula (S): más conocida por su nombre en inglés Spike. Esta proteína es considerada la más importante desde el punto de vista inmunológico, debido a que es la responsable de la entrada del virus al organismo, la principal diana de las vacunas aprobadas hasta el momento y la diana de los anticuerpos neutralizantes. La proteína S consta de dos subunidades bien diferenciadas, S1 y S2, las cuales están separadas por un dominio de furina. La subunidad S1 es la encargada de reconocer al receptor de angiotensina humana (ACE2), presente en muchas de nuestras células, y de unirse a él. Este reconocimiento se produce gracias a una región muy concreta, el dominio RBD, siendo este dominio la principal diana de los anticuerpos neutralizantes y, por lo tanto, la región más afectada por mutaciones en las distintas variantes⁸⁶. La subunidad S2 es la responsable de la fusión del virus con la membrana de las células favoreciéndose así la entrada del virus^{87,88}. Además, la proteína S determina el tropismo del virus⁸⁵.

Proteína de membrana (M): juega un papel importante en el ensamblaje del virus con las células humanas⁸⁹.

Proteína de la nucleocápside (N): es la responsable de la envoltura de la hebra monocatenaria de ARN. No se conoce muy bien su función, pero se piensa que puede estar relacionada con la replicación viral dentro de las células⁸⁹.

Proteína de la envoltura (E): se encarga de formar canales iónicos y participa en el ensamblaje del virus⁹⁰.

3.2. Mecanismo de infección del SARS-CoV-2.

El virus del SARS-CoV-2 es un virus respiratorio por lo que su principal vía de transmisión es por aerosoles. También se ha demostrado la presencia de partículas virales en las heces y orina de personas infectadas, lo que sugiere la vía fecal-oral como vía de transmisión secundaria⁹¹.

Como se ha mencionado previamente, el SARS-CoV-2 es capaz de reconocer y de unirse al receptor de angiotensina humana (ACE2), a través del dominio RBD. El receptor de angiotensina humana es una proteína transmembrana que se encuentra en múltiples células de diferentes tejidos y órganos como el corazón, los pulmones, el intestino o los riñones y tiene un papel importante en la homeostasis y la respuesta inflamatoria. En el tejido pulmonar se encuentra principalmente en las células alveolares de tipo 2, además de en macrófagos y células endoteliales. Debido a la elevada presencia del receptor en el pulmón, este órgano es el principal afectado durante la infección por SARS-CoV-2, observándose en él un infiltrado masivo de linfocitos y macrófagos, lo que conlleva a una liberación masiva de citoquinas proinflamatorias generando una tormenta de citoquinas, la cual puede llegar a producir la muerte del paciente^{92,93}.

Al igual que muchos otros virus, el SARS-CoV-2 necesita la maquinaria del huésped para comenzar su replicación e infección. En primer lugar, se necesita un procesamiento proteolítico de la proteína S, para ello, el virus va a utilizar las distintas proteasas del huésped como la proteasa transmembrana serina 2 (TMPRSS2) para escindir la proteína S a través de su dominio furina, dando lugar a las dos subunidades⁹⁴. Una vez el virus ha liberado su material genético al interior de las células, este comienza a replicarse. En este momento se produce la activación de la respuesta inmunitaria innata, cuyas células son capaces de reconocer a las células infectadas y desencadenar una cascada de señalización, basada en la liberación de interferones (IFN) de tipo 1 y 2, cuyo objetivo final es evitar y detener la replicación del virus. A su vez, los antígenos virales son endocitados por células fagocíticas como células dendríticas, y presentados a los linfocitos T a través de los complejos mayores de histocompatibilidad (MHC) desencadenándose así la respuesta adaptativa. Simultáneamente a estos procesos, se produce la liberación de citoquinas proinflamatorias con el objetivo de atraer a un mayor número de células que participen en la respuesta inmunitaria⁸¹ (**Figura I2**).

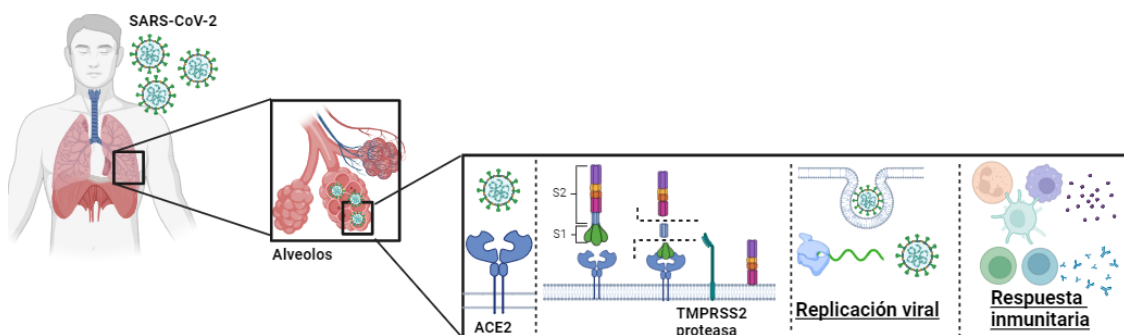


Figura 12: Mecanismo de infección por SARS-CoV-2 y respuesta inmunitaria a la infección. Imagen realizada en Biorender.

3.3. Variantes de preocupación (VOCs).

Las variantes ocurren debido a cambios en los nucleótidos durante la replicación, que es lo que se conoce como mutaciones. La tasa de mutación de los virus de ARN es mayor que la de los virus de ADN, por eso, el virus del SARS-CoV-2 presentan múltiples variantes⁹⁵, algunas de las cuales son consideradas de interés debido a su elevada capacidad de propagación. Otra consecuencia de las mutaciones, además de su alta tasa de propagación, es su capacidad para evadir al sistema inmunitario, esto ocurre cuando las alteraciones que se producen provocan que el virus ya no sea reconocido por el sistema inmunitario y escape a él⁹⁶. Dentro de las variantes del SARS-CoV-2 encontramos variantes de interés, variantes de preocupación y variantes de baja transmisión. Las variantes de preocupación (VOCs) presentan una o más de las siguientes características: aumento de la transmisibilidad, aumento de la virulencia y/o disminución de la efectividad de las técnicas usadas para el diagnóstico y tratamiento⁹⁵.

En el caso del virus del SARS-CoV-2 existen cinco variantes que han sido consideradas variantes de preocupación (VOCs). Estas variantes presentan mutaciones en la proteína S que provocan una mayor transmisibilidad, una mayor unión de la proteína S al receptor ACE2 y una ausencia de reconocimiento por parte de los anticuerpos generados ya sean gracias a la vacunación o a una infección previa^{97,98}. Las cinco variantes de preocupación son:

Alpha B.1.1.7: se detectó en septiembre 2020 y fue predominante en Reino Unido. Presenta 17 mutaciones de las cuales 9 afectan la proteína S⁹⁹, lo que genera un aumento

en su tasa de transmisibilidad y una mayor virulencia. Dentro de las mutaciones destaca la mutación N501Y, la cual mejora la unión con ACE2 y la adhesión celular¹⁰⁰.

Beta B.1.351: se detectó en octubre de 2020 y fue predominante en Sudáfrica. Presenta 10 mutaciones en la proteína S⁹⁹, de las cuales 3 de ellas se encuentran en el dominio RBD. Al igual que en el caso anterior se mejora la unión con ACE2, aumentándose la trasmisibilidad¹⁰¹.

Delta B.1.617.2: se detectó en diciembre de 2020 y causó grandes olas infectivas en India, Estados Unidos y Europa. Presenta 8 mutaciones en la proteína S, algunas en común con las variantes anteriores⁹⁹. Tiene una mayor capacidad de replicación provocando una mayor transmisión e infección^{102,103}.

Ómicron B1.1.529: se detectó en enero de 2021 y rápidamente se extendió por todo el planeta. Es la que más mutaciones presenta en la proteína S, concretamente 27, muchas de ellas en la región RBD⁹⁹. Este alto número de mutaciones hace que esta cepa tenga un enorme potencial de escape inmunológico y una elevada trasmisibilidad¹⁰². Seis de las mutaciones están relacionadas con la mejora de la afinidad a ACE2 y otras siete con la reducción de la neutralización¹⁰⁴. Los estudios demostraron como esta variante era más contagiosa, con mayor capacidad de replicación y con mayor reducción de la neutralización, pero con menor gravedad que las variantes anteriores^{105,106}.

3.4. Desarrollo de vacunas frente al SARS-CoV-2.

Aunque existen diferentes terapias para paliar y disminuir los efectos del SARS-CoV-2, la mejor estrategia para disminuir su incidencia o al menos reducir su letalidad es la vacunación preventiva de la población. La base de la vacunación es la inducción de una respuesta inmunitaria capaz de proteger al individuo contra infecciones y de reducir o eliminar el riesgo de contraer la enfermedad². Durante la pandemia se vivió un momento histórico, donde científicos de todo el mundo colaboraron para diseñar vacunas eficaces que pudieran estar disponibles para toda la población. Además, se aprobaron por primera vez las vacunas de ARN mensajero (ARNm).

Con los meses se demostró como las vacunas frente al SARS-CoV-2 eran efectivas frente al desarrollo de la enfermedad grave, la muerte e incluso el desarrollo sintomático de la enfermedad, pero no contra la infección¹⁰⁷. El problema principal que se encontró en

estas vacunas fue la disminución de la inmunidad y la protección con el paso de los meses. Ensayos epidemiológicos demostraron como el nivel de anticuerpos disminuía a partir de los seis meses y eso provocaba que las personas fueran de nuevo susceptibles a la infección y al desarrollo grave de la enfermedad^{108,109}. Desde que comenzó la campaña de vacunación se han administrado 13.640 millones de dosis obteniéndose una vacunación primaria completa (dos dosis) en el 67% de la población mundial, mientras que, solo un 32% de esta población ha recibido una dosis de recuerdo. En el caso de España, el 79% de la población recibió la pauta completa y el 70% de la población recibió al menos una dosis de refuerzo. El porcentaje de vacunación observado en España, el cual está por encima de la media si tenemos en cuenta las dosis de recuerdo, explica la disminución de la mortalidad a causa del COVID-19 observada en este país en los últimos años⁸⁴.

Las vacunas de administración intramuscular generan una respuesta humoral pero no son capaces de generar una respuesta local, mientras que, las vacunas administradas de forma intranasal generan una inmunidad local potente dependiente de IgA, pero una menor inmunidad sistémica. Además, las vacunas de administración nasal son capaces de generar una potente inmunidad de mucosas, fundamental para evitar la entrada del virus, mientras que las vacunas intramusculares no son capaces de generar esta inmunidad¹¹⁰. Todas las vacunas aprobadas hasta el momento frente al SARS-CoV-2 se administran intramuscularmente, aunque ya se están desarrollando vacunas de administración intranasal, siendo la mayor preocupación de estas la posible llegada del antígeno y el resto de los componentes de la vacuna al cerebro a través de los nervios olfatorios¹¹⁰.

En España se aprobó la comercialización de 7 vacunas frente al SARS-CoV-2 basadas en las tecnologías que se explican a continuación y cuyas bases quedan recogidas en la **Tabla I3**. Sin embargo, se ha retirado la autorización de alguna de ellas como, las vacunas basadas en vectores virales (Astrazeneca y Janssen) y la desarrollada por la farmacéutica Sanofi¹¹¹.

Nombre	Farmacéutica	Composición	Adyuvante	Dosis	Eficacia
BNT162b2	Pfizer/BioNTech	ARNm	Nanopartícula lipídica	30 µg	95%
mRNA-1273	Moderna	ARNm	Nanopartícula lipídica	100 µg	94%
Vaxzevria (ChAdOx1 nCoV-19)	AstraZeneca	Vector viral	No usa adyuvante	5×10^{10} partículas virales	75%
Ad26.COV2.S	Janssen	Vector viral	No usa adyuvante	8.92 log ₁₀ UI	66%
NVX CoV2373	Novavax	Proteína recombinante	Matrix-M	5 µg	90%
VidPrevtyn Beta	Sanofi Pasteur	Proteína recombinante	AS03	5 µg	
Bimervax	HIPRA	Proteína recombinante	SQBA (escualeno y excipientes)	40 µg	No se informa

Tabla 13: Vacunas frente al SARS-CoV-2 aprobadas hasta 2024 por la Agencia Europea del Medicamento (EMA). *AgU: unidades de antígeno; UI: unidades infecciosas.

Vacunas de ARNm

Se basan en el propio ARN mensajero de la proteína que se quiera usar como inmunógeno. A diferencia de las vacunas de ADN, no necesita llegar al núcleo, lo que puede suponer una ventaja. Sin embargo, el ARN es muy inestable, por lo que se necesita incluir ciertas modificaciones que estabilicen el material genético para poder suministrarlo¹⁰².

La efectividad de estas vacunas estaba demostrada en ratón desde 1990. Sin embargo, la inestabilidad del propio material genético, la alta inmunogenicidad y sus problemas de almacenamiento fueron los responsables de que no se aprobaran hasta 2020. Las únicas vacunas aprobadas de ARNm son las vacunas frente al SARS-CoV-2, en las cuales el ARN codifica para la proteína S, y las cuales presentan una eficacia del 90%¹⁰⁷. Estas vacunas usan como adyuvantes nanopartículas de lípidos, las cuales han permitido que el ARNm pueda acceder a todas nuestras células. Además, el uso de estas nanopartículas junto con la introducción de nucleótidos modificados favoreció la estabilidad y evitó la degradación del ARN¹¹². En este tipo de vacunas los principales efectos secundarios provienen del adyuvante utilizado¹⁰².

Al introducir el ARNm que codifica para la proteína S, las células del individuo vacunado son capaces de producir por sí mismas los péptidos de esta proteína y presentarlos a través de los MHC-I y II, lo que induce una buena inmunidad celular y humoral. Además, las nanopartículas lipídicas activan la vía de TLR7 y TLR8 favoreciendo el procesamiento y reconocimiento del antígeno¹¹³.

Se ha observado como estas vacunas inducen una maduración de los linfocitos T, tanto CD4+ como CD8+¹¹⁴, y aumentan el porcentaje de linfocitos T de memoria¹¹⁵, fundamentales para la protección ante una nueva infección. Además, estimulan a las células T foliculares y a las células B del centro germinal¹¹⁶. Por otro lado, son capaces de inducir la maduración de los linfocitos B aumentando la producción de anticuerpos específicos frente a la proteína S, sobre todo de tipo IgG e IgM¹¹⁷ y generando a su vez linfocitos B de memoria, permaneciendo tanto los linfocitos B como T de memoria unos seis meses en el organismo¹¹⁸.

Vacunas de vectores virales

Se basan en el uso de virus inactivados como vectores para el transporte de antígenos de un determinado patógeno. Además de transportar el antígeno, los vectores virales pueden tener la capacidad de replicarse, aumentando de esta forma la producción del antígeno y la respuesta inmunitaria¹⁰². Al igual que en el caso de las vacunas de ARNm, el vector viral va a utilizar la maquinaria del propio individuo para producir la proteína que transporta¹¹⁹. Un inconveniente de este tipo de vacunas es la inmunidad preexistente frente al adenovirus que se utiliza como vector, por ello se aconseja usar un adenovirus de origen no humano, como fue el caso de la vacuna de AstraZeneca, o un adenovirus humano con un serotipo poco común, como fue el caso de la vacuna de Janssen¹²⁰.

Su uso está mundialmente extendido. En el caso del SARS-CoV-2 demostraron una eficacia menor que las vacunas de ARNm, debido a que se necesitan dos dosis de refuerzo para generar un título elevado de anticuerpos y linfocitos de memoria. Sin embargo, debido al bajo número de individuos que fueron vacunados exclusivamente con este tipo de vacunas no se pudo evaluar la duración a largo plazo de la respuesta inmunitaria^{99,107}.

Vacunas proteicas

Pueden estar formadas por proteínas enteras, fragmentos de estas o proteínas recombinantes. Se consideran más seguras que las vacunas basadas en vectores virales, y la mayoría de sus efectos secundarios están relacionados con el adyuvante utilizado^{102,107}. En el caso de las vacunas frente al SARS-CoV-2 están formadas principalmente por fragmentos de la proteína S¹⁰⁷.

Vacunas inactivadas

Se basan en inactivar o matar el patógeno mediante métodos químicos o físicos. El problema de este tipo de vacunas es que se requieren laboratorios especializados para producir la inactivación, el proceso de producción es largo y suelen tener efectos adversos. La mayoría tienen como adyuvante el hidróxido de aluminio¹⁰⁷. En este caso, y a diferencia de todos los tipos de vacunas nombrados previamente, están dirigidas frente a todo el virus y no exclusivamente frente a la proteína S¹²¹. En el caso del SARS-CoV-2, ninguna se aprobó para su uso en España.

4. Sistema inmunitario.

El sistema inmunitario se encarga de la defensa del organismo frente a patógenos extraños para él. Se divide en dos componentes fundamentales, el sistema inmunitario innato, que constituye la primera barrera de defensa, y el sistema inmunitario adaptativo. El desarrollo de la respuesta inmunitaria es un proceso complejo en el que intervienen múltiples moléculas, citoquinas y células y una alteración de cualquiera de ellas está relacionado con el desarrollo de enfermedades autoinmunes.

4.1. Neutrófilos.

Son células polimorfonucleares de sangre periférica¹²² que se producen diariamente en la médula ósea y se liberan de forma constitutiva a la sangre, constituyendo entre el 50-70% de los leucocitos en humanos y entre el 10-25% de estos en ratones^{123,124}. Se caracterizan por presentar un núcleo multilobulado¹²⁴ y tener una vida media muy corta, en torno a 24 horas¹²⁵. Además de estar presentes en sangre y en medula ósea, se pueden encontrar en diferentes órganos como el bazo, el pulmón o el hígado¹²⁴ donde su vida media aumenta ligeramente¹²³. Los neutrófilos llegan a estos órganos a través de

la sangre gracias a la expresión de diferentes receptores de quimioquinas, citoquinas y otras moléculas ¹²⁶. Son primordiales para el correcto funcionamiento de la respuesta inmunitaria y una disminución en su número está relacionado con diferentes enfermedades autoinmunes como el lupus¹²⁴.

Estas células son las primeras en responder ante la presencia de patógenos, para ello presentan moléculas ya formadas que se liberan en situaciones de daño regulando diferentes procesos como la adhesión, la fagocitosis y la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)¹²⁵.

4.1.1. Trampas extracelulares de neutrófilos (NETs).

Se basan en la liberación de la cromatina descondensada al exterior junto con proteínas nucleares, citoplasmáticas y granulares que provocan la eliminación de los patógenos^{127,128}. En la mayoría de los casos se libera la cromatina del núcleo lo que causa la muerte del neutrófilo, conociéndose este proceso como Netosis. Sin embargo, cuando se produce la liberación de la cromatina, pero el neutrófilo mantiene su viabilidad, se habla de Netosis vital¹²⁹. La cromatina liberada va unida a diferentes componentes del ADN nuclear como las histonas, principalmente la Histona 3 (H3), y de ciertas proteínas como la mieloperoxidasa (MPO) o la elastasa (NE)¹²⁵ (**Figura 13**). Este mecanismo se desencadena cuando el resto de los mecanismos para la eliminación de patógenos fallan¹²⁷.

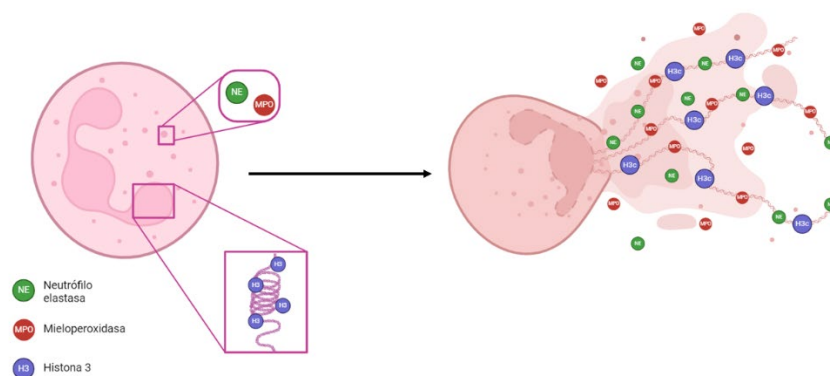


Figura 13: Proceso de Netosis y liberación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs). Se representan en la imagen los principales componentes de las NETs, en verde la enzima neutrófilo elastasa, en rojo la mieloperoxidasa y en azul la histona 3 citrulinada. Imagen realizada en Biorender.

A pesar de ser un proceso muy conservado se desconoce su mecanismo de acción y la mayoría de las moléculas implicadas. En las primeras etapas de este proceso, la

membrana citoplasmática se mantiene intacta, mientras que la membrana nuclear se desintegra permitiendo la salida del material genético y su interacción con los componentes citoplasmáticos. En etapas posteriores, es cuando la membrana citoplasmática se desintegra permitiendo la liberación al exterior de esas trampas extracelulares que, como ya se ha mencionado previamente, están formadas por cromatina y moléculas citoplasmáticas¹³⁰. Además, durante este proceso las histonas sufren modificaciones postraduccionales, como la metilación o la citrulinación, lo que provoca la descondensación de la cromatina. Por ejemplo, la H3 sufre un proceso de citrulinación, pasando a ser H3cit¹³¹. Al igual que con la mayoría de los procesos del organismo, una alteración en la formación de NETs está relacionada con el desarrollo de ciertas enfermedades como el lupus, el Alzheimer, la diabetes o el cáncer¹³².

En los últimos años se ha estudiado los mecanismos que desencadenan estas trampas extracelulares, observándose que existe una vía dependiente de peptidil arginina deaminasa 4 (PAD4), así como varias vías independientes. Dentro de las vías independientes cabe destacar aquella que se desencadena debido a la activación de TLR8 y TLR9, es lo que se conoce como Netosis secundaria¹³³.

Se ha visto que las trampas extracelulares no son exclusivas de neutrófilos, ni de la especie humana. Otras células inmunitarias innatas, como macrófagos o monocitos, son capaces de inducir esta respuesta, al igual que otras especies animales como ratones o peces, demostrándonos que es un proceso altamente conservado e importante para la defensa del organismo¹³⁴.

4.2. Receptores de tipo toll (TLRs).

Los receptores de tipo Toll son un tipo de receptores de reconocimiento de patógeno (PRR) presentes en las células del sistema inmunitario innato, especialmente en células dendríticas¹³⁵. Aunque no solo se encuentran en células inmunitarias sino también en otro tipo de células como fibroblastos o células epiteliales¹³⁶. Estos receptores tienen un papel fundamental en el desarrollo de la respuesta inmunitaria¹³⁷.

Es una familia compuesta por 10 miembros en humanos y 12 miembros en ratones¹³⁶, cada uno de los cuales reconocen distintos patrones moleculares asociados a patógenos. Son receptores transmembrana que se encuentran, en su mayoría, en la membrana de

INTRODUCCIÓN

las células aunque también encontramos TLRs endógenos, como por ejemplo TLR3, TLR7, TLR8 o TLR9¹³⁶⁻¹³⁸. Los neutrófilos presentan todos los TLRs menos TLR3 y TLR7, lo que nos indica que este grupo celular también es susceptible a la acción de los adyuvantes a través de estos receptores¹³⁹.

Los receptores de tipo Toll son glicoproteínas que constan de un dominio amino terminal y un dominio citoplasmático carboxilo terminal, homólogo al receptor de la interleucina 1, que se denomina Toll/IL- Dominio de homología 1R (TIR). A través de este dominio los TLRs interaccionan con sus proteínas adaptadoras, las cuales son fundamentales para desencadenar la cascada de señalización que finalizará con la activación de linfocitos^{137,140} (Figura I4).

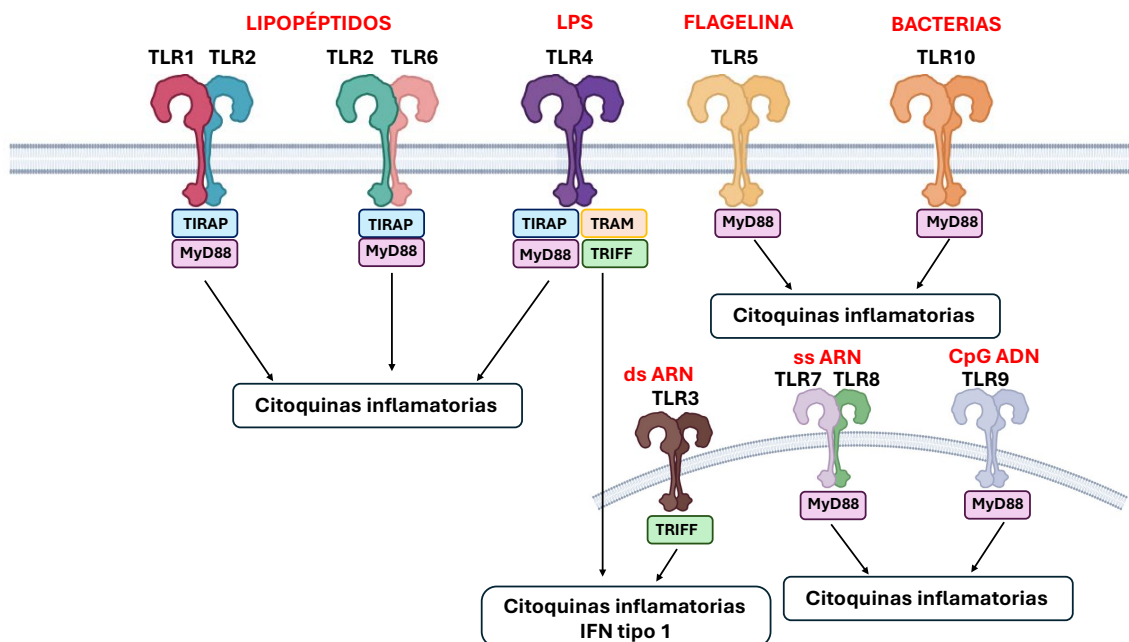


Figura I4: Distintos receptores de tipo Toll (TLRs) junto con sus proteínas adaptadoras, su localización y los estímulos que los activan. Imagen realizada en Biorender.

Las proteínas adaptadoras son MyD88, presente en todos los TLRs menos TLR3, y TRIF presente exclusivamente en TLR3 y TLR4, es decir, todos los TLRs son dependientes de MyD88 menos TLR3 y TLR4, el cual tiene una vía dependiente y otra independiente de MyD88. Las vías dependientes de MyD88 suelen inducir la liberación de citoquinas inflamatorias, mientras que, las vías dependientes de TRIF inducen la liberación tanto de citoquinas inflamatorias como de interferones de tipo I¹³⁶.

Estos receptores se descubrieron a mediados de 1990, están altamente conservados y han permitido demostrar que el reconocimiento de antígenos por parte del sistema inmunitario innato no es tan inespecífico como se pensaba^{141,142}. Además, se ha demostrado que la activación de los TLRs provoca la activación de las células presentadoras generando una estimulación de la respuesta B y T a antígenos específicos⁸. La expresión de los TLRs no es constante, sino que varía en función de la presencia de patógenos, citoquinas y factores ambientales. Ciertos adyuvantes son capaces de interactuar con estos receptores y desencadenar el inicio de la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, el adyuvante CpG activa a TLR9, mientras que, AS01 activa a TLR4⁷.

V. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS:

El complejo MSMPs-S1, basado en micropartículas de silicio mesoporoso (MSMPs) conjugadas a la proteína S1, se presenta como una potencial vacuna proteica frente al virus del SARS-CoV-2. Dicho complejo sería capaz de inducir una respuesta inmunoestimuladora eficaz, siendo las MSMPs el elemento potenciador de la respuesta inmunitaria generada frente a la proteína S. Se pretende demostrar que las MSMPs son capaces, no solo de potenciar la respuesta inmunitaria frente a la proteína S, sino también de proteger frente a la infección por SARS-CoV-2.

OBJETIVOS:

El objetivo general de este trabajo consiste en estudiar la capacidad adyuvante de las micropartículas de silicio mesoporoso (MSMPs) en una vacuna proteica frente al SARS-CoV-2, y profundizar en su mecanismo de acción adyuvante. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- 1- Producir y caracterizar las MSMPs para que puedan ser utilizadas como adyuvantes en vacunas proteicas.
- 2- Analizar, empleando el modelo murino BALB/c, la capacidad de las MSMPs conjugadas con la proteína S1 para inducir una respuesta humoral y celular robusta y generar una actividad neutralizante específica contra el SARS-CoV-2.
- 3- Evaluar, mediante el modelo murino transgénico k18-hACE2, la eficacia del complejo vacunal MSMPs-S1 en la protección contra la infección por SARS-CoV-2 y la prevención del desarrollo de formas graves de la enfermedad.
- 4- Identificar, en el bazo de ratones BALB/c inmunizados, posibles genes y vías de señalización implicadas en el mecanismo de acción de las MSMPs.
- 5- Estudiar, usando un modelo de ratón BALB/c, qué ocurre en la zona de inmunización después de la inoculación de las MSMPs.
- 6- Evaluar, mediante un modelo de ratón transgénico iDTRMRP8xCRE, el papel de los neutrófilos en la respuesta adyuvante de las MSMPs.
- 7- Estudiar en modelos de ratón Knock-out para MyD88 (KO MyD88) y para TLR4 (KO TLR4) el mecanismo de acción de las MSMPs.

- 8- Estudiar *in vitro* en neutrófilos humanos procedentes de donantes sanos, la capacidad de las MSMPs para inducir la formación de NETs, mediante métodos cualitativos y cuantitativos.
- 9- Estudiar en humanos, mediante la estimulación de PBLs y moDCs, la capacidad inmunoestimuladora de las MSMPs conjugadas a péptidos virales y su interacción con las células presentadoras.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

MATERIAL	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
Placas de cultivo multipocillo (6 pocillos)	Greiner Bio-One	657160
Placas de cultivo multipocillo (24 pocillos)	Greiner Bio-One	662160
Placas de cultivo multipocillo (96 pocillos)	Greiner Bio-One	655061
Tubos de microcentrífuga (0,5 ml)	BD pastickplate	231539
Tubos de microcentrífuga (1,5 ml)	Greiner Bio-One	616201
Tubos de microcentrífuga (2,0 ml)	Greiner Bio-One	623201
Tubos de centrífuga (50 ml)	Corning	430829
Tubos de centrífuga (15 ml)	Corning	430791
Pipetas serológicas 5 ml	Greiner Bio-One	606180
Pipetas serológicas 10 ml	Greiner Bio-One	607180
Pipetas serológicas 25 ml	Greiner Bio-One	760180
Pipeta pasteur 3 ml	Falcon	357575
Tamices celulares de 70 μ m	Falcon	352350
Agujas de inyección 20 G	bd microlance	301300
Agujas de inyección 25 G	bd microlance	300600
Agujas de inyección 30 G	bd microlance	304000
Jeringas 1 mL	BD pastickplate	303172
Jeringas 5 mL	Dismadel	00021911
Tubos de sangre EDTA	BD	367525
Placas p96 fondo en V	Greiner Bio-One	651101

Tabla M1: Material de laboratorio utilizado para la realización de los experimentos recogidos en este trabajo.

1. Micropartículas de Silicio Mesoporoso (MSMPs).

1.1. Fabricación y funcionalización de las MSMPs.

La producción de las micropartículas se llevó a cabo en el Departamento de Física Aplicada de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM). Para su fabricación se partió de obleas de silicio puro $1000 \pm 25 \mu\text{m}$ y resistividad $0,01-0,02 \Omega\text{cm}$ (Institute of Electronic Materials Technology), las cuales fueron expuestas a un tratamiento electroquímico con el objetivo de generar poros en su superficie. Este tratamiento se basó en pasar una corriente eléctrica a través de las obleas en un medio formado por dos electrolitos, con relación 1:1 (ácido fluorhídrico: etanol) en un volumen final de 200 mL.

A cada oblea se le aplicaron tres ciclos de un programa, cuyas condiciones quedan representadas en la **tabla M2**, con el objetivo de conseguir profundidad y una superficie porosa uniforme y homogénea en cuanto al tamaño y distribución del poro. Una vez finalizados los tres ciclos se retiró la oblea del medio electrolítico y se lavó con etanol absoluto para retirar el exceso de ácido. Tras retirar la capa porosa de la oblea y dejar secar los fragmentos obtenidos, la cual contiene la capa mesoporosa, se procedió a realizar su triturado manual en un mortero de cuarzo de ágata. Finalmente, el producto resultante se pasó a través de dos tamices de distinto tamaño de poro ($10 \mu\text{m}$ y $5 \mu\text{m}$) con el objetivo de obtener micropartículas de silicio mesoporoso de tamaño inferior a $5 \mu\text{m}$, las cuales se guardaron en etanol hasta su uso.

PASO	I(mA)/V(V)	TIEMPO	REPETICIONES
1	3435	50	35
2	4580	1	35

Tabla M2: Programa multipasos para la obtención de silicio mesoporoso

Para su funcionalización con grupos amino, las MSMPs fueron expuestas a 3-aminopropil trietoxisilano (APTS) (Sigma-Aldrich) en una atmósfera de nitrógeno con luz ultravioleta durante 20 minutos. Por último, se realizaron 5 lavados con etanol absoluto y se almacenaron en este hasta su uso. Todos los experimentos se realizaron con MSMPs- NH_3 , nombradas como MSMPs.

1.2. Caracterización de MSMPs.

La caracterización de las micropartículas de silicio se realizó en la Universidad Autónoma de Madrid. Esta caracterización se basó en determinar la morfología de las micropartículas, para lo cual se utilizó la microscopía electrónica de barrido (SEM), y determinar la correcta funcionalización de las micropartículas mediante la caracterización FTIR (Fourier-transform infrared spectroscopy) y el análisis químico elemental.

1.3. Marcaje fluorescente de las MSMPs con FITC.

Para la detección de las MSMPs por inmunofluorescencia o por microscopía confocal se marcaron las partículas con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Para ello se mezcló 1 mg de partícula con FITC en una solución etanólica a 0,19 mmol. La suspensión se mantuvo a 4°C en rotación y oscuridad durante toda la noche. El producto resultante (MSMPs-FITC) se recogió mediante centrifugación (10000 rpm 10 minutos) y se lavó tres veces con agua miliQ para eliminar el exceso de FITC.

1.4. Carga de las MSMPs con péptidos y proteínas virales.

Para la carga de las MSMPs con péptidos virales del SARS-CoV-2 o con la proteína S1 de dicho virus, se lavaron las MSMPs tres veces con 10 volúmenes agua miliQ centrifugándolas a 10000 rpm durante 10 minutos. Una vez finalizados los lavados las micropartículas se resuspendieron con el antígeno deseado y se incubaron a 4°C en rotación durante toda la noche.

Para estimulaciones *in vitro*, 0,09 mg/mL de MSMPs se cargaron con 20 µg/mL de PepTivators SARS-CoV-2 prot_S (Miltenyi Biotec), un pool de péptidos de 15 residuos con solapamiento de 11 aminoácidos, nombrado como Peptivator_S. Esta concentración asegura la carga en saturación de las MSMPs. Al día siguiente se resuspendieron en RPMIc y se procedió a la estimulación.

Para los ensayos de inmunización realizados en distintas cepas de ratón, 0,64 mg de MSMPs se cargaron durante toda la noche con 4,5 µg de S1, para al día siguiente resuspender el conjugado en 50 µL de PBS.

2. Células mononucleares humanas de sangre periférica (PBMCs).

2.1. Aislamiento de monocitos a partir de la fracción tromboleucocitaria de la sangre.

Para el aislamiento de monocitos se realizó en primer lugar el aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de donantes sanos mediante un gradiente de densidad (Ficoll-Paque PLUS GE Healthcare; Life Sciences). Una vez obtenidas las PBMCs se procedió al aislamiento de los monocitos por selección positiva. Para ello se siguió el protocolo del proveedor (separador magnético: MidiMACS y columnas LS: MACS Columnas) utilizándose para ello un anticuerpo anti-CD14 unido a bolas magnéticas (CD14 MicroBeads Human MACS Miltenyi Biotec). Tras este proceso se obtuvieron no solo los monocitos por selección positiva, sino también los linfocitos de sangre periférica (PBLs) por selección negativa.

2.2. Diferenciación de monocitos a células dendríticas derivadas de monocitos (moDCs).

Los monocitos se cultivaron a una concentración de 10^6 células/mL usándose placas p96 y en medio de cultivo RPMI-1640 (Lonza BioWhittaker), suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) (Gibco Life Technologies) descomplementado previamente, con 1% de L-Glutamina y con 1% de antibiótico/antimicótico, nombrando este medio a partir de ahora como RPMIc. Para la diferenciación de los monocitos a células dendríticas, el medio fue suplementado con rhGM-CSF e rhIL-4 (Immunotools) y el cultivo se mantuvo durante 5 días renovándose tanto el medio como las citoquinas cada dos días. La concentración final para ambas citoquinas fue de 1000 U/mL.

Una vez diferenciados los monocitos a células dendríticas derivadas de monocitos (moDCs), se co-cultivaron con PBLs provenientes del mismo donante durante 1 semana en una proporción 1:2.

2.3. Estimulación de PBMCs y moDCs con péptidos virales.

Para el estudio de la respuesta T específica en donantes sanos se estimularon tanto las PBLs y las moDCs, con Peptivator_S y, con MSMPs-Peptivator_S. El pool de péptidos se

añadió a una concentración de 20 µg/mL. Además, se utilizó LPS (100 ng/mL) como control positivo de estimulación y RMP1c como control negativo.

Las PBLs se cultivaron durante siete días en placas p96 a una concentración de 2×10^6 células/mL en RMP1c suplementado con rhIL-2 a 20 ng/mL (Immunotools), renovando el medio junto con rhIL-2 cada dos días. Estas células fueron estimuladas a día 1 y 6, estudiándose a día siete la respuesta celular T específica (**Figura M1**).

En el caso del co-cultivo, las células dendríticas derivadas de monocitos se cultivaron durante 5 días en placas p96 a una concentración de 1×10^6 células/mL, estimulándose a día 6 con Peptivator_S y MSMPs-Peptivator_S. Al día siguiente de la estimulación se añadieron PBLs del mismo donante estimuladas exclusivamente a día 1 y se mantuvo el co-cultivo durante seis días más, cambiando el medio junto con rhIL-2 cada dos días. A día 13 las células del co-cultivo volvieron a ser estimuladas usando las mismas condiciones estudiándose la respuesta celular T específica (**Figura M1**).

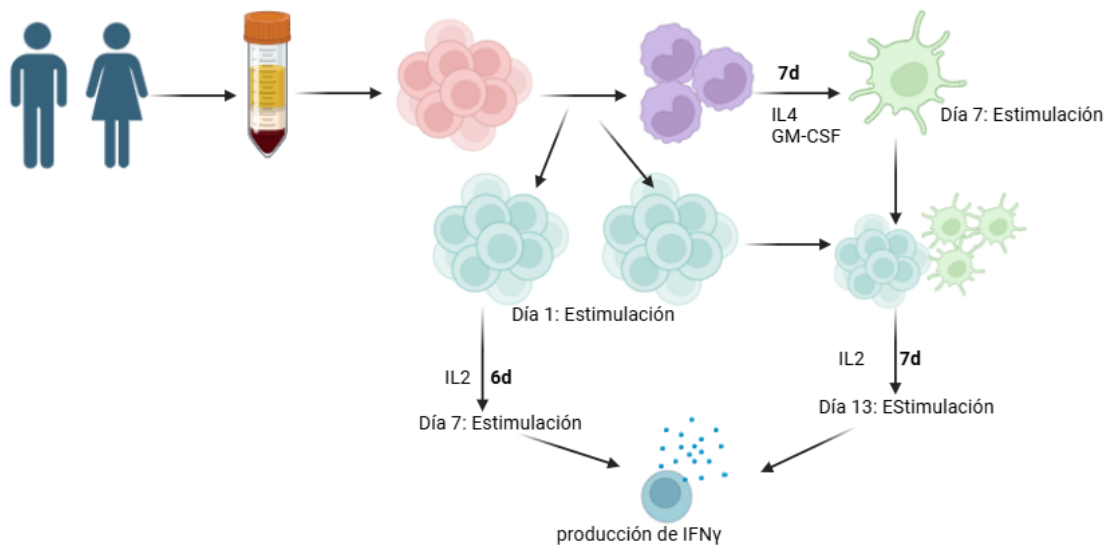


Figura M1: Esquema que muestra el protocolo seguido para el estudio de la respuesta T específica frente al SARS-CoV-2 en PBLs humanas solas y co-cultivadas con células dendríticas derivadas de monocitos (moDCs).

2.4. Estudio de la respuesta T específica frente al SARS-CoV-2.

Para estudiar la respuesta celular T específica frente al SARS-CoV-2 se estimularon las células como se explica en el apartado anterior y se añadieron 2,5 µg/mL de Brefeldina A (Invitrogen) durante 16 horas. Posteriormente se analizó la producción de IFNγ

mediante citometría de flujo intracelular, como se explica a continuación. Para ello, se utilizaron los siguientes marcadores (CD3, CD4 e IFN γ) recogidos en la **tabla M3**.

ANTICUERPO	FLUORÓFORO	CLON	REFERENCIA	CASA COMERCIAL
CD3	APC	OKT3	317318	Biolegend
CD4	PerCP-Cy5.5	OKT4	317414	Biolegend
CD8	FITC	SK1	344704	Biolegend
IFN	FITC	4SB3	502506	Biolegend
CD16	BV421	3G8	152400	Biolegend
H3cit	-	polyclonal	RM1001	Abbcam

Tabla M3: Anticuerpos humanos utilizados para los estudios por citometría de flujo realizados en este trabajo.

2.4.1. Citometría de flujo intracelular.

Para la tinción de moléculas de superficie se traspasaron las células a una placa de 96 pocillos de fondo cónico (Cellstar). A continuación, se retiró el sobrenadante mediante centrifugación (1600 rpm 2 minutos) y se lavaron las células con PBS para posteriormente realizar la tinción de superficie, incubándose las células con los respectivos anticuerpos 30 minutos a 4°C. Una vez realizada la tinción de superficie, las células se fijaron con PFA 4% durante 30 minutos a 4°C y se permeabilizaron con Tween 20 (Sigma) al 0,5% durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA). Una vez permeabilizadas, se realizó la tinción intracelular con los anticuerpos deseados, en las mismas condiciones que la tinción de superficie. Todos los anticuerpos se utilizaron a una concentración de 1 $\mu\text{g}/10^6$ células.

Finalmente, las muestras se pasaron a tubos de citómetro diluidas en PBS y se analizaron en el citómetro FACSCalibur o BD FACSCelesta (BD Biosciences) mediante el programa CellQuest (BD CellQuest). Los datos fueron procesados mediante el programa FlowJo V.10 (FlowJo, LLC).

3. Células polimorfonucleares humanas de sangre periférica (PMNs).

3.1. Aislamiento de neutrófilos por selección negativa.

Para el aislamiento de neutrófilos se realizó una selección negativa utilizando sangre de donantes sanos. Para ello se siguieron las instrucciones del kit MACSxpress Whole Blood Neutrophil Isolation (Miltenyi Biontech). Una vez aisladas las células polimorfonucleares se realizó una lisis de eritrocitos incubando las células 3 minutos con 3 mL de ACK (Gibco by Life Technologies). Posteriormente las células se lavaron con PBS, se resuspendieron en RPMIc y se sembraron a 10^6 células/mL.

3.2. Estudio de la endocitosis y la formación de NETs.

Para el estudio de endocitosis de las MSMPs por parte de los neutrófilos y la posterior formación de NETs, los neutrófilos fueron sembrados en placas p24, donde previamente se habían colocado cristales de inmunofluorescencia (\varnothing 12mm, Proquinorte) en cada uno de sus pocillos, como se explica en el apartado siguiente. Posteriormente, las células se estimularon con MSMPs-FITC durante 1 y 3 horas y se estudió tanto la endocitosis como la producción de NETs mediante inmunofluorescencia y microscopia confocal. Como control positivo de la formación de NETs se utilizó PMA 100nM (Sigma Aldrich) y como control negativo RPMIc.

3.2.1. Inmunofluorescencia.

En primer lugar, se colocan los cristales de inmunofluorescencia, previamente tratados con poli-L-Lysina (Invitrogen) en los pocillos de la placa. El tratamiento de los cristales asegura la adhesión de los neutrófilos a la superficie. Para ello, se añadieron 500 μ L de una dilución 1:1 de poli-L-Lysina en PBS incubándose los cristales a 37°C durante 15 minutos. Posteriormente se lavaron con PBS, se dejaron secar y se incubaron con luz UV durante 30 minutos.

A continuación, se cultivaron y estimularon los neutrófilos y, una vez transcurrido el tiempo de estimulación se retiró el sobrenadante y se lavaron los cristales 5 minutos con PBS, con cuidado de no levantar las células que se encontraban adheridas. Posteriormente se fijaron con PFA 4% durante 10 minutos a TA y oscuridad, para después

lavar los cristales 5 minutos con PBS. Las muestras se mantuvieron en PBS a 4°C hasta su uso.

Para la realización de la tinción de inmunofluorescencia, primero se permeabilizaron las células añadiendo PBS-Tritón al 0,1% durante 5 minutos a TA. Después, las células se bloquearon con BlockAid (Thermofisher Scientific) durante 1 h a TA y oscuridad.

A continuación, se añadió el anticuerpo primario, en este caso anti-mieloperoxidasa (Origen), diluido 1:25 en solución de bloqueo y se incubó durante 1 hora a TA y oscuridad. Después, se hicieron 2 lavados con PBS y se añadió el anticuerpo secundario (IgG anti-ratón de cabra (H + L) Alexa Fluor 594, Thermofiser) diluido 1:500 en solución de bloqueo e incubándose durante 30 minutos a TA y oscuridad. Finalmente, las células se lavaron dos veces con PBS y una vez con agua miliQ y se montaron con ProLong Diamond Antifade Mountant con DAPI (Invitrogen).

3.2.2. Cuantificación de NETs.

Para cuantificar la producción de NETs por parte de neutrófilos estimulados y analizar si existían diferencias entre la estimulación con MSMPs y la estimulación con Al(OH)₃ se realizaron dos técnicas distintas. Por un lado, mediante ELISA, se cuantificó la liberación de MPO al sobrenadante y, por otro lado, mediante citometría de flujo, se analizó el porcentaje de Histona 3 citrulinada (H3cit).

3.2.2.1. ELISA de mieloperoxidasa (MPO).

Para valorar cuantitativamente la liberación de MPO se aislaron neutrófilos humanos y se sembraron en placas de p96. Posteriormente las células se estimularon durante 1 y 3 horas y el sobrenadante fue recogido para evaluar en él, mediante ELISA, la liberación de MPO por parte de los neutrófilos.

Para la realización de este ELISA se utilizó un kit comercial (Invitrogen) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Una vez realizado el ELISA, se analizaron los datos a través de excell obteniéndose la concentración de MPO de cada uno de los sobrenadantes, los datos obtenidos de cada estimulación se normalizaron respecto al control negativo.

Este ensayo preliminar nos permitió determinar a qué tiempos íbamos a estudiar la presencia de Histona 3 citrulinada la cual debería estar presente en las células y no liberada en el sobrenadante.

3.2.2.2. Histona 3 citrulinada (H3cit) mediante citometría de flujo.

Para corroborar de nuevo de forma cuantitativa la formación de NETs se aislaron neutrófilos de donantes sanos, se incubaron en una p96 y se estimularon durante 30 y 90 minutos para posteriormente medir, mediante citometría de flujo, la presencia de la Histona 3 citrulinada (H3cit). Para ello se siguió el protocolo de tinción intracelular explicado anteriormente y se utilizaron marcadores frente a CD16 (superficie) e H3cit (intracelular), los cuales están recogidos en la **tabla M3**. En este caso, el anticuerpo frente a H3cit no estaba marcado, de manera que fue necesario realizar una tinción indirecta con un anticuerpo secundario. Para ello, se añadieron 0,5 µL anti-rabbit IgG-APC (Invitrogen) y se incubó durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente se lavaron las células y se diluyeron en PBS para ser analizadas usando el citómetro BD FACsCelesta disponible en el departamento. Los datos obtenidos se representaron mediante la intensidad media de fluorescencia (MFI).

4. Animales de experimentación.

Todos los animales fueron estabulados en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid (UCM). Los ratones fueron alimentados con pienso *ad libitum* y se acondicionaron, cumpliendo la normativa vigente. Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité de Ética de Investigación Animal de la Universidad Complutense de Madrid y realizados de acuerdo con los requerimientos legislativos relativos a la experimentación animal (D.C. 86/609/CEE; RD 1201/2005).

4.1. Cepas.

Para la realización de este trabajo se utilizaron diferentes cepas de ratones en función de los objetivos del ensayo. Las cepas utilizadas se nombran a continuación, incluyéndose una pequeña descripción de cada una y su utilidad para cada tipo de ensayo.

- BALB/c¹⁴³: esta cepa se caracteriza porque sus células Th2 se activan fácilmente tras las inmunizaciones, por lo que estos ratones responden muy bien en ensayos de inmunización. Esta cepa se utilizó para estudiar la diferencia entre la respuesta humoral y celular frente al SARS-CoV-2 generada por las MSMPs y por el Al(OH)₃.
- k18-hACE2¹⁴⁴: es una línea de ratón transgénica que se caracteriza por expresar el receptor ACE2 humano (hCAE2) en las células epiteliales. Para ello, es necesario el promotor de la queratina humana 18 (k18) que se expresa en todos los epitelios, incluidos los epitelios respiratorios. Este modelo de ratón se utilizó para estudiar la infectividad del virus del SARS-CoV-2 y la capacidad de protección que otorgaban las MSMPs en comparación con el Al(OH)₃.
- iDTRMRP8xCRE: es un modelo de ratón transgénico que se caracteriza por presentar el gen que codifica el receptor de la toxina diftérica inducible (iDTR) bajo el promotor de MRP8, una proteína que se expresa fundamentalmente en neutrófilos. El sistema CRE-LoxP se basa en el reconocimiento por parte de la recombinasa CRE de dos secuencias LoxP entre las que se localiza un codón de stop. De manera que, cuando se inocula la toxina diftérica, la recombinasa CRE se expresa reconociendo las secuencias LoxP y eliminando aquellas células que presentan el promotor MRP8. Estos ratones fueron cedidos por el Centro Nacional de Investigaciones Cardíacas (CNIC) y se utilizaron para estudiar el papel de los neutrófilos en el desarrollo de la respuesta inmunitaria y su relación con las MSMPs.
- KO MyD88¹⁴⁵: es un modelo de ratón knock-out en el cual se encuentra silenciada la proteína adaptadora MyD88, fundamental para la activación de la mayoría de los TLRs. Este modelo se utilizó para estudiar el mecanismo de acción de las MSMPs.
- KO TLR4¹⁴⁶: es un modelo de ratón knock-out en el cual se encuentra silenciada la vía de TLR4. Este modelo, al igual que el anterior, sirve para estudiar el mecanismo de acción de las MSMPs y para determinar si las MSMPs son capaces de activar las células a través de TLR4. Estos ratones fueron cedidos por el Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (CIB).

4.2. Anestesia.

Para la realización de diferentes procedimientos como la inmunización o la obtención de sangre fue necesario el anestesiado de los animales. Para ello, los animales se introdujeron en una cámara de inducción anestésica, donde se reguló el vaporizador de isoflurano al 4% con un flujo de oxígeno a 1 L/min. Una vez anestesiado se extrajeron de la caja y se les realizó el procedimiento en el menor tiempo posible, asegurando siempre la recuperación de los animales antes de devolverlos a la cubeta.

4.3. Inmunización intramuscular (i.m).

Las inmunizaciones de los ratones se hicieron en todos los casos por vía intramuscular, eligiéndose siempre la parte externa del cuádriceps izquierdo. Para llevar a cabo la inmunización, los ratones fueron anestesiados según lo establecido en el apartado anterior y la zona de inmunización desinfectada con un antiséptico. Para las inmunizaciones se inocularon 50 μ L del complejo vacunal utilizándose una aguja de 25 G (Becton Dickinson).

Para el estudio de la respuesta humoral y celular, los ratones se inmunizaron con diferentes complejos vacunales. Por un lado, un grupo fue inmunizado con MSMPs conjugadas con la subunidad 1 de la proteína S (S1), otro grupo fue inmunizado exclusivamente con la S1 y el tercer grupo fue inmunizado con $Al(OH)_3$ conjugado con S1. De esta forma se pudo comparar la respuesta generada por nuestro adyuvante con la generada por un adyuvante control ($Al(OH)_3$) y por el uso exclusivo del antígeno. Además, se utilizó como control de inmunización el PBS y ambos adyuvantes sin antígeno. Estos seis grupos se mantuvieron en la mayoría de los ensayos, aunque hubo ciertas modificaciones en función de la disponibilidad de ejemplares. Para las inmunizaciones se utilizaron 4,5 μ g de S1/ ratón, 0,64 mg de MSMPs/ratón y una proporción 1:1 de $Al(OH)_3$ /ratón.

En todos los casos se siguió el mismo protocolo de inmunización, que consistía en dos dosis del complejo vacunal separadas 30 días. Una semana después de la segunda dosis los ratones fueron sacrificados para el estudio de la respuesta celular. En el caso del modelo BALB/c, en el cual se hizo un estudio longitudinal de la respuesta inmunitaria, se les suministro a los ratones una dosis de recuerdo, denominada boost, siete meses

después de la primera dosis para siete días después sacrificarlos. Los ratones k18-hACE2 se infectaron con el virus del SARS-CoV-2 (como se explica más adelante), 15 días después de la segunda dosis de inmunización, en lugar de ser sacrificados para el estudio de la respuesta celular.

4.4. Obtención de suero a través del seno mandibular.

Con la finalidad de determinar el título de anticuerpos frente al SARS-CoV-2 que presentaban los ratones inmunizados, se les extrajo sangre de forma periódica. Para ello, se realizó una punción en la vena del seno submandibular mediante la inmovilización del ratón a través del pliegue de la piel dorsocervical y de la cola, o bien mediante anestesiado del mismo. La punción se realizó con una aguja 20 G y tras ella se recogió un volumen inferior al 10% del volumen total de sangre del animal (0,5 mL aproximadamente). Finalmente, se aplicó una ligera presión sobre la zona con una gasa con agua oxigenada durante unos minutos para cortar el sangrado y se devolvió al ratón a su jaula previamente comprobado su estado.

Una vez obtenida, la sangre se centrifugó a 14000 rpm durante 15 minutos a TA y se recogió la fracción del suero, evitando siempre pipetear el coagulo de sangre. El suero se almacenó a -80°C hasta su uso.

En todos los casos se hizo una primera extracción de suero previa a la inmunización, una segunda extracción 15 días después de la primera dosis y una última extracción en el momento del sacrificio, en este caso la extracción fue por punción cardiaca, como se explica posteriormente. En el caso de los ratones BALB/c, debido al estudio longitudinal, se hizo una tercera extracción a los 30 días de la primera dosis, una cuarta a los 2 meses y una quinta a los 5 meses. En el caso de los ratones k18-hACE2 se realizó una extracción siete días después de la segunda dosis para comprobar la correcta inmunización y no se extrajo sangre en el momento del sacrificio, debido a la posible presencia del virus en esta.

4.5. Sacrificio y obtención de órganos.

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical tras ser anestesiados con isoflurano. Tras la eutanasia se diseccionó a los ratones para extraer el bazo y los ganglios inguinales. Previamente, se les extrajo sangre del corazón para el posterior estudio de la

respuesta humoral, para ello se utilizó una aguja 30 G, la cual se introdujo en el ventrículo derecho con un ángulo de 180°.

Tras extraer el bazo, se cortó un fragmento pequeño para su inclusión en OCT, utilizándose el resto para el aislamiento de esplenocitos. En el caso de los ganglios, se extrajeron los inguinales por ser los más cercanos a la zona de inmunización y se incluyeron en OCT.

Para estudiar el efecto de las MSMPs en la zona de inmunización se extrajo el músculo de la pata izquierda, donde se había realizado la inyección, y se incluyó en parafina para realizar el análisis histológico.

5. Respuesta humoral en ratones inmunizados frente al SARS-CoV-2.

5.1. Detección de anticuerpos IgG1, IgG2a e IgG total mediante ELISA.

Para la detección de anticuerpos específicos frente al SARS-CoV-2 se realizó un ELISA indirecto en placas de p96 de alta absorción (ThermoFisher Scientific). En primer lugar, las placas se tapizaron durante toda la noche a 4°C con 5 µg/mL de la subunidad S1 de la proteína S del SARS-CoV-2 (Miltenyi Biontech), o bien, con 1 µg/mL de la región RBD (Miltenyi Biontech) presente en la misma subunidad. Al día siguiente las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween 20 (Sigma) al 0,5% y se bloquearon las uniones inespecíficas mediante la incubación de las placas con BSA 5% durante 2 horas. Una vez realizado el bloqueo se incubaron los sueros durante 1 hora a TA, diluidos en PBS 1/400 para detectar IgG1 e IgG total y 1/200 para detectar IgG2a, realizándose duplicados para cada muestra. A continuación, y después de realizar 3 lavados, se incubaron las placas con los respectivos anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa diluidos 1:2000 en PBS durante 1 hora a TA. Después de 3 lavados se revelaron las placas añadiendo TMB y la reacción colorimétrica se paró añadiendo HCL 1N.

La lectura óptica se llevó a cabo en un lector de placas a una absorbancia de 450 nm. Para el análisis de los datos, se calculó la media de OD de cada una de las muestras, se tuvo en cuenta la dilución empleada y se normalizó con el valor obtenido en las muestras de ratones inmunizados con PBS.

5.2. Estudio del porcentaje de neutralización frente a las diferentes variantes del SARS-CoV-2.

Los estudios de neutralización se realizaron mediante ELISA, de forma similar a la explicada en el apartado anterior. En este caso se tapizó con el dominio RBD de las distintas variantes del SARS-CoV-2 (1 µg/mL, Miltenyi Biontech), durante toda la noche a 4°C. A continuación, se realizaron cinco lavados con PBS-Tween 20 al 0,5%. Una vez realizado el bloqueo, se añadieron los sueros diluidos, en este caso 1/100, los cuales se incubaron durante 1 hora a TA. Posteriormente y tras el lavado de las placas, se añadió ACE2 (Miltenyi Biontech) diluida 1/100 en PBS a 37°C durante media hora. A continuación, se lavaron las placas 5 veces y se volvieron a incubar a 37°C durante una hora con Streptavidina-HRP diluida 1/1000 en PBS. Tras esta incubación se lavaron las placas, se añadió TMB y HCL 1N y se procedió a la lectura óptica, de la misma manera que en el apartado anterior.

En este caso el análisis de los datos se realizó calculando la media de cada muestra y restándole el blanco. A continuación, se dividió la media total de los ratones inmunizados con PBS, debido a que representan la ausencia de neutralización, entre la media de cada muestra. Este resultado se multiplica por 100 y finalmente se les resta 100, obteniéndose así el porcentaje de neutralización. Las muestras tendrán un porcentaje de neutralización de 0 a 100%, considerándose positivo para anticuerpos neutralizantes aquellas muestras que presenten un porcentaje de neutralización superior al 25%.

5.3. Estudio de la correlación entre anticuerpos y neutralización.

Para detectar posibles diferencias en la producción de anticuerpos y la neutralización entre el hidróxido de aluminio y las MSMPs se estudió estadísticamente la correlación que existía entre el título de anticuerpos y el porcentaje de neutralización. Para ello, se agruparon los datos en dos variables, X= porcentaje de neutralización a los distintos tiempos frente a la variante original e Y=título de anticuerpos a los distintos tiempos. Posteriormente se hizo una regresión lineal donde se obtuvo un valor del coeficiente de Pearson (R^2), existiendo una mayor correlación cuanto más cercano era el valor a 1, lo que indicaría una dependencia total entre las variables.

6. Respuesta celular en ratones inmunizados frente al SARS-CoV-2.

6.1. Aislamiento de esplenocitos.

Para el aislamiento de los esplenocitos se machacaron los bazos sobre tamices de poro de 70 μm utilizando el embolo de una jeringa de 5 mL. Las células se resuspendieron en una solución hipotónica de ACK (Gibco by Life Technologies) durante 3 minutos a temperatura ambiente para lisar los eritrocitos. A continuación, los esplenocitos se lavaron con PBS frio al 2% de FBS, se volvieron a filtrar por tamices de poro de 70 μm y se resuspendieron en PBS frio al 2% de FBS para posteriormente contar el número de células mediante tripan blue.

6.2. Cultivo y estimulación de esplenocitos.

Los esplenocitos se sembraron en placas de p96 a una concentración de 2×10^6 células/mL en un volumen final de 250 μL usando RPMI 1640, 10% de FBS, 1% antibiótico/antimitótico, L-glutamina 200 mM, 15 U/mL de rmlL-2 y 0,05 mM de β -mercaptoetanol.

Para la estimulación se usó medio como control negativo y una mezcla de PMA/Ionomicina (1:1) como control positivo. Los esplenocitos fueron estimulados con Peptivator_S a la misma concentración que se usó para el estudio de la respuesta celular en PBLs humanas. Tras dos horas se añadió Brefeldina A (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se dejó durante 16 horas para al día siguiente realizar el análisis de la respuesta T específica siguiendo el protocolo explicado en el apartado 2.4 de este trabajo. Los anticuerpos utilizados para ello quedan recogidos en la **tabla M4**.

ANTICUERPO	FLUORÓFORO	CLON	REFERENCIA	CASA COMERCIAL
CD3	APC	17A2	100236	Biolegend
CD4	PerCP-Cy5.5	GK1.5	100432	Biolegend
CD8	PE	53-67	100707	Biolegend
IFN- γ	FITC	XMG1.2	505806	Biolegend
Ly6G	PE	1A8	127608	Biolegend
CD19	PerCP-Cy5.5	1D3/CD19	152400	Biolegend

Tabla M4: Anticuerpos murinos utilizados para los estudios por citometría de flujo realizados en este trabajo.

6.3. Cuantificación de células B y T del bazo.

Para cuantificar el número absoluto de células B y T presentes en el bazo de los ratones inmunizados, se utilizó el citómetro BD FACSCelesta de la Unidad de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la UCM. Para ello, se tiñeron 200 μL de células con los anticuerpos recogidos en la tabla M4 frente a CD3, CD4, CD8 y CD19, siguiendo el protocolo de tinción superficial explicado previamente en este trabajo. Una vez realizada la tinción las células se resuspendieron en 300 μL de PBS y se añadió 250 μL de las Beads de contaje (Invitrogen).

Los datos fueron procesados mediante el programa FlowJo V.10 (FlowJo, LLC). Para obtener el número absoluto de células (células/ μL) se utilizó la fórmula matemática que se muestra a continuación, la cual recoge el número de beads adquiridas, el volumen de beads añadido (250 μL), el número de células adquirido, el volumen de células (300 μL) y la concentración de beads (1020 beads/ μL) la cual es característica de cada lote.

$$n^{\circ} \text{ absoluto de células } \left(\frac{\text{celulas}}{\mu\text{L}} \right) = \frac{n^{\circ} \text{ de células } \times \text{volumen de beads}}{n^{\circ} \text{ de beads } \times \text{volumen de células}} \times 1020 \left(\frac{\text{beads}}{\mu\text{L}} \right)$$

6.4. Extracción de ARN de esplenocitos.

Para continuar con el estudio del efecto de las MSMPs sobre los esplenocitos, se extrajo el ARN de esplenocitos de ratones inmunizados con los diferentes complejos vacunales y se analizó mediante ARN-seq, comparando el efecto de MSMPs-S1 con el efecto del $\text{Al}(\text{OH})_3$ -S1 y el no uso de adyuvantes

6.4.1. Lisis celular y extracción de ARN.

Una vez extraídos los esplenocitos, según lo explicado en el apartado 6.1 de este trabajo, se resuspendieron en ARN later (Invitrogen) y se mantuvieron a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugaron a 1500 rpm 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se mantuvieron a -80°C hasta su uso. Para realizar la lisis celular se utilizaron 350 μL del reactivo RAI 1 presente en el kit NucleoSpin RNA/Protein kit (Macherey-Nagel) añadiendo 3,5 μL de ditioneitol (DTT) 1M, agente reductor que reduce los puentes de disulfuro y protege de la oxidación. Las células se resuspendieron en la mezcla varias veces y se pasaron a un tubo libre de ARNasa manteniéndose a -80°C hasta su uso. Para la extracción de ARN se siguieron las indicaciones del kit de

purificación de DNA, ARN y proteínas (Macherey-Nagel) y se cuantificó usando el Nanodrop.

6.4.2. Análisis de ARN-seq.

Con el ARN obtenido se realizó un pool de las muestras, de manera que, cada condición analizada presentaba ARN de tres ratones distintos inmunizados con el mismo complejo. Posteriormente se secuenció el ARNm de cada conjunto de muestras y se analizaron los datos utilizando la plataforma Dr. TOM (BGI, Shanwai).

Para el análisis de ARN-seq se analizaron los genes de expresión diferencial (DEG). En primer lugar, se analizaron los procesos biológicos que se encontraban más alterados con cada grupo y dentro de cada uno de ellos las principales vías alteradas de cada grupo en comparación con el grupo control. Finalmente, se analizaron los genes de expresión diferencial para cada vía. Los grupos comparados fueron los siguientes PBS vs MSMPs; MSMPs vs MSMPs-S1 y Al(OH)₃-S1 vs MSMPs-S1, siendo el grupo control PBS; MSMPs y Al(OH)₃-S1 respectivamente.

7. Ratones k18-hACE2.

Para estudiar la capacidad de las MSMPs de proteger frente a la infección por SARS-CoV-2 se inmunizaron 8 ratones k18-hACE2 con nuestro complejo vacunal, siguiendo el mismo protocolo que en los ensayos anteriores. 7 días después de la segunda dosis se comprobó la correcta inmunización de todos los grupos estudiando la producción de anticuerpos IgG1 presentes en el suero. Posteriormente, los ratones fueron trasladados al INIA (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria) para ser infectados (reto infeccioso) por SARS-CoV-2 dos semanas después de la última dosis.

7.1. Reto infeccioso con el virus del SARS-CoV-2.

Para el reto infeccioso, en colaboración con la Dra. Noemí Sevilla (CISA-INIA), ratones k18-hACE2 se fueron infectados intranasalmente con 10⁵ PFU (unidades formadoras de placas) de SARS-CoV-2 MAD6 (Delta), muy similar a la cepa original de Wuhan. Posteriormente, se evaluó el estado físico de los individuos, la supervivencia, y la presencia de partículas virales en distintos órganos como pulmones, cerebro y corazón. Al contar con ocho ratones por grupo, únicamente se analizó la carga viral cuatro días

después de la infección en tres ratones de cada grupo, el resto de los individuos se utilizaron para el análisis de supervivencia.

7.2. Clinical score.

Para el análisis de los síntomas clínicos se tuvieron en cuenta los parámetros recogidos en la **tabla M5**. Cada uno de los parámetros se compone de una serie de características o condiciones que otorgan al animal una puntuación del 0 al 25, en función de la severidad, siendo 0 sin alteración del parámetro y 25 una alteración muy elevada. Los parámetros que se tienen en cuenta son el peso, la apariencia física, la movilidad y la respiración.

OBSERVACIÓN		PUNTUACIÓN	
PESO CORPORAL	Sin cambios	0	
	Pérdida \leq 25%	%= puntos	
	Pérdida $>$ 25%	25	
APARIENCIA	Pelaje	Brillante	0
		Mate	2
		Encrespada	5
	Ojos	Normales	0
		Cerrados	5
	Postura	Normal	0
		Encurvado	5
		Muy encurvado	15
	MOVILIDAD	Espontánea (comportamiento normal)	0
Espontánea, pero reducida		1	
Moderadamente reducida		5	
Movilidad solo después de la estimulación		15	
Alteración de la coordinación		20	
Letargo		25	
RESPIRACIÓN	Normal	0	
	Ligeramente alterada	1	
	Acelerada ($>$ 30%)	10	
	Muy acelerada ($>$ 50%)	25	

Tabla M5: Parámetros y características a observar en los ratones después de la infección por SARS-CoV-2 junto con la puntuación correspondiente.

La puntuación total obtenida de los parámetros anteriores nos determina la severidad de la enfermedad desarrollada por el individuo. Esta severidad se divide en 5 niveles, teniendo una puntuación de 0 el nivel más bajo y una puntuación mayor de 50 el nivel más alto (**Tabla M6**).

Índice de gravedad	Puntuación total
Nivel 0: los animales están sanos	0-5
Nivel 1: Baja morbilidad	5-10
Nivel 2: Morbilidad moderada	10-25
Nivel 3: Enfermedad moderada-grave	25-50
Nivel 4: Enfermedad muy grave (aplicar punto final)	>50

Tabla M6: Niveles de gravedad de la enfermedad en función de la puntuación total obtenida en el clinical score.

7.3. Análisis de la carga viral en órganos afectados.

El análisis de la carga viral, al igual que el reto infeccioso, se realizó en las instalaciones del INIA debido a la necesidad de realizar los experimentos en un laboratorio de riesgo biológico 2. Para ello, se extrajeron los pulmones, el corazón y el cerebro de 3 ratones de cada grupo 4 días después del reto. Estas muestras se lisaron aplicándoles 3 ciclos de congelación-descongelación seguidos de 20 ciclos de sonicación, cada uno de ellos con una duración de 2 minutos y una potencia de 5 W. Los lisados obtenidos se centrifugaron a 200 g 5 minutos con el objetivo de obtener las reservas virales. La extracción de ARN se realizó con trizol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez obtenido el ARN se realizó una RT-qPCR usándose la transcriptasa inversa SuperScript III (Invitrogen), una ADN polimerasa (Roche) y los cebadores (**Tabla M7**) necesarios para poder detectar la presencia de la proteína N del virus en estos órganos utilizándose como gen control la β -actina.

Primer N reverse	TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG
Primer N forward	GACCCCAAATCAGCGAAAT
Primer β -actina reverse	CGGACTCATCGTACTCCTGCTT
Primer β -actina forward	CAGCACAATGAAGATCAAGATCATC

Tabla M7: Cebadores utilizados para la detección de la proteína N mediante RT-qPCR.

8. Ratones iDTRMRP8xCRE.

Estos ratones se mantuvieron en racks ventilados para evitar infecciones durante la depleción de los neutrófilos.

8.1. Inyección intraperitoneal (i.p).

Para la eliminación de los neutrófilos se inocularon intraperitonealmente 100 μ L de toxina diftérica (MERCK) diluida en PBS, inyectándose una concentración final de 0,0026 μ g/ μ L.

Para la inyección intraperitoneal, los ratones fueron inmovilizados de forma correcta y sujetos firmemente del pliegue dorsal-cervical y de la cola. Después, los ratones se inclinaron hacia abajo para evitar pinchar órganos vitales, como el intestino, y la zona de inyección fue desinfectada utilizando etanol al 70%. Para la inyección se introdujo la aguja de 30G con un ángulo del 45° en el cuadrante inferior derecho de la región abdominal del animal. Las inmunizaciones en este modelo de ratón se realizaron el día posterior a la depleción de los neutrófilos, para así asegurar la ausencia de estos durante la inmunización.

8.2. Comprobación de la depleción de neutrófilos mediante citometría de flujo.

Para comprobar la depleción de los neutrófilos después de una única inyección de la toxina diftérica se extrajo sangre a los animales, como se explica en apartados anteriores, tras 24h y 48h de la misma.

Con la sangre se realiza una lisis de eritrocitos, efectuando tres incubaciones de 15 minutos con ACK (Gibco by Life Technologies) y lavando las muestras con PBS después de cada incubación. Una vez lisados los eritrocitos se realizó un marcaje directo de Ly6G (**tabla M4**) y se analizó el porcentaje de células positivas mediante citometría de flujo. Finalmente se comparó dicho porcentaje en ratones CRE+, aquellos que presentan la construcción y que sufrirían la depleción de los neutrófilos, y ratones CRE-, aquellos que no sufrirán una depleción después de la inoculación de la toxina diftérica.

9. Estudio histológico.

Para conocer el efecto de las MSMPs *in vivo* y su relación con la respuesta celular se realizaron distintos análisis histológicos estudiando las diferencias entre las poblaciones de células presentes en bazo y pata asociadas a la presencia de partículas.

9.1. Inclusión, corte y fijado de las muestras.

Para la inclusión del bazo se utilizó medio de congelación OCT (Tissue-Tek). Para ello, el bazo se introduce en el medio de congelación y tras 20 minutos a temperatura ambiente, para favorecer la penetración del medio en el tejido, se guarda a -80°C hasta su uso. Posteriormente se realizaron cortes seriados de un grosor de $7\ \mu\text{m}$ en el criostato (Shandon CryotomeE; Thermofisher Scientific) sobre portas tratados con poli-L-lysina para favorecer la adhesión. Los cortes también se mantuvieron a -80°C hasta su uso. Para realizar los cortes de manera correcta, es necesario mantener el órgano a -20°C la noche previa.

Previamente a la realización de las distintas técnicas de tinción, fue necesario fijar los cortes con acetona. Para ello, se atemperaron las muestras dejándolas a TA durante 15 minutos para después incubarlas con acetona durante 10 minutos a TA y oscuridad. Finalmente se realizan 2 lavados de cinco minutos con PBS para eliminar el exceso de acetona y se procede a realizar las diferentes técnicas de tinción.

9.1.1. Inclusión en parafina.

El segundo medio de inclusión fue la parafina, que se utilizó para realizar el estudio histológico de la pata. Para ello se introdujeron las muestras en formalina (Sigma-Aldrich) durante 24h a 4°C y en agitación. Posteriormente se lavaron introduciéndolas en agua durante 40 minutos y en alcohol etílico al 70%. A continuación, las muestras se introdujeron en concentraciones crecientes de etanol, 80%, 96% y 100%, durante 40 minutos repitiendo el proceso 1, 2, y 3 veces respectivamente, seguido de dos inclusiones de 60 minutos en Clear Rite (Sigma-Aldrich) para el aclaramiento de la muestra. Finalmente, se introdujeron las muestras en parafina durante 1 hora a 60°C , se reintrodujeron en parafina limpia de nuevo durante una hora y transcurrido el tiempo se realizaron los bloques para cortar las muestras en el microtomo realizando cortes seriados de $7\ \mu\text{m}$ cada uno.

9.2. Tinción de Hematoxilina/Eosina.

Para desparafinar e hidratar las muestras incluidas en parafina estas fueron introducidas 3 veces durante 10 minutos en Xileno y posteriormente en concentraciones decrecientes de etanol, desde etanol 100% hasta etanol al 96% realizándose 3 incubaciones de 10 minutos en cada uno de ellos (**Tabla M8**).

COMPUESTO	TIEMPO	OBJETIVO
Xileno	10 minutos x 3 veces	Desparafinación e
Etanol 100%	10 minutos x 3 veces	
Etanol 96%	10 minutos x 1 vez	Hidratación
H ₂ O destilada	5 minutos x 1 vez	Hidratación
Hematoxilina	3-5 minutos	Tinción núcleos
H ₂ O	15 minutos	Lavado
Eosina	1-5 minutos	Tinción citoplasma
Etanol 96%	10 minutos x 1 vez	Deshidratación
Etanol 100%	10 minutos x 3 veces	
Xileno	10 minutos x 3 veces	

Tabla M8: Compuestos utilizados para las tinciones de hematoxilina/eosina recogiendo el objetivo principal de cada uno de ellos y el tiempo de incubación.

Las muestras se incubaron en hematoxilina durante 2-5 minutos dependiendo del tipo de muestra, 3 minutos en el caso del bazo y 5 minutos en el caso de la pata. Una vez transcurrido el tiempo se lavaron las muestras con agua corriente durante 15 minutos y se pasó a realizar la tinción con eosina, la cual también difiere en tiempo según el tipo de muestra. Para los cortes de bazo se incubaron las muestras 1 minuto en eosina, mientras que, para los cortes de pata la incubación fue de 5 minutos (**Tabla M8**).

Una vez realizadas las tinciones se pasó a deshidratar las muestras, debido a que el medio de montaje que se utilizó era hidrofóbico. Para ello, las muestras se introdujeron durante 10 minutos en concentraciones crecientes de etanol, desde etanol al 96% hasta etanol 100% (3 veces en cada concentración) y luego en Xileno, realizándose 3 incubaciones de 10 minutos (**Tabla M8**). Una vez finalizado el proceso se realizó el montaje de las muestras utilizándose el bálsamo de Canadá como medio de montaje.

Una vez secas, se procedió a su observación en el microscopio Óptico (Leica MZ16 con cámara Leica DFC480 integrada). De esta forma se comprobó que los cortes estaban correctamente realizados y teñidos y que no se habían roto durante la inclusión. Además, nos permitió estudiar si existían cambios cualitativos en los órganos en función del adyuvante utilizado.

9.3. Inmunohistoquímica.

Para las tinciones de inmunohistoquímica se utilizó el kit ImmPRESS Reagent (Vectorlabs). Para aquellas muestras incluidas en parafina fue necesario repetir el protocolo de desparafinación e hidratación, explicado en el apartado anterior.

En primer lugar, se realizó un bloqueo de la actividad peroxidasa endógena mediante la incubación durante 10 minutos a TA de las muestras con BLOXALL solution (presente en el kit). Posteriormente, se lavaron las muestras con PBS durante 5 minutos y se bloquearon las posibles uniones inespecíficas mediante la incubación de las muestras con suero de caballo al 2,5% durante media hora a TA. Finalmente, y sin previo lavado, se incubaron las muestras O/N a 4°C con los anticuerpos primarios (**Tabla M9**) diluidos en suero de caballo al 2,5%. Para evitar que las muestras se secan las incubaciones se realizaron en una cámara húmeda.

ANTICUERPO	ESPECIE	DILUCION	CASA COMERCIAL	ANTICUERPO SECUNDARIO
CD3	Rat	1/100	Biolegend	IgG goat αRat
CD19	Rat	1/100	Biolegend	IgG goat αRat
F4/80	Rabbit	1/100	Biolegen	
Ly6G	Rat	1/100	Biolegend	IgG goat αRat
B220	Rat	1/100	Biolegend	IgG goat αRat
Elastasa	Rabbit	1/80	Abbcam	IgG goat αRabbit
MPO	Rat	1/80	OriGene	IgG goat αRat

Tabla M9: Anticuerpos primarios usados para las tinciones de inmunohistoquímica y sus correspondientes diluciones y anticuerpos secundarios

Al día siguiente, las muestras se lavaron durante cinco minutos con PBS tres veces para luego incubar los cortes con el anticuerpo secundario, anti-IgG (Vectorlabs) (**Tabla M9**). Los anticuerpos secundarios se incubaron durante una hora a TA utilizando, al igual que en el caso anterior, la cámara húmeda. Transcurrido el tiempo, las preparaciones se lavaron tres veces con PBS durante cinco minutos para después realizar el revelado. Para el revelado se mezclaron en una proporción 1:1 DAB y su diluyente (Vectorlabs) añadiéndose esta solución sobre las muestras e incubándose durante unos 5 minutos aproximadamente, aunque el tiempo de incubación dependerá del anticuerpo primario que se esté utilizando. Previamente al montaje, se realizaron dos lavados de 5 minutos de las muestras para eliminar el DAB y se incubaron las muestras con hematoxilina (Vectorlabs) durante aproximadamente 1 minuto. Finalmente, las muestras se lavaron y se montaron utilizando un medio de montaje no hidrofóbico (Vectorlabs), por lo que no fue necesario la deshidratación.

Al igual que en el apartado anterior, una vez las muestras estuvieron secas se procedió a su observación en el microscopio óptico para ver diferencias en las poblaciones de células entre los distintos grupos.

10. Análisis estadístico.

Para analizar los resultados, estos se representaron como la media de los datos junto con su desviación estándar (SD). Para realizar el análisis estadístico de la mayoría de los resultados se utilizó la prueba U de Mann Whitney al tratarse de variables independientes que no seguían una distribución normal. Para el análisis estadístico de los resultados del ensayo de infectividad en ratones k18-hACE2 se utilizó la prueba de one way-ANOVA al tratarse de variables independientes que siguen una distribución normal. Para comprobar si los datos seguían o no una distribución normal se realizó una prueba de normalidad utilizando el programa GraphPad Prims8.

Los niveles de significancia estadística considerados fueron los siguientes: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

VII. RESULTADOS

1. Micropartículas de Silicio Mesoporoso (MSMPs).

Para el desarrollo de este trabajo se han producido diversos lotes de micropartículas de silicio mesoporoso (MSMPs) compuestas de moléculas ordenadas de SiO₂, con una superficie porosa, generada tras un tratamiento electroquímico, y funcionalizadas para su posterior conjugación con antígenos. Una vez producidas, las micropartículas se mantienen en etanol hasta su uso. Al ser una producción 100% manual es necesario realizar una caracterización de cada uno de los lotes para asegurar el mantenimiento de las características y propiedades de las micropartículas.

Las partículas utilizadas en este proyecto tienen un tamaño inferior a 5 µm, además de poros en su superficie. Esta morfología se corroboró por microscopía electrónica de barrido (SEM), analizándose la porosidad gravimétricamente. Además de presentar poros en su superficie, las MSMPs una vez funcionalizadas, deben presentar grupos amino. Para corroborarlo se han utilizado diversos métodos, como el método de adsorción/desorción de nitrógeno⁶³, la espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FITR) y el análisis químico elemental, el cual nos permitió cuantificar el porcentaje de nitrógeno presente en una muestra funcionalizada en comparación con una muestra no funcionalizada.

1.1. Caracterización de MSMPs.

Mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) se obtuvieron imágenes de las partículas producidas en cada lote (**Figura R1**). Estas imágenes nos permitieron valorar cualitativamente las características físicas de las partículas, así como su forma y la distribución de los poros en su superficie.

La producción y el procesamiento manual de las obleas de silicio permitió obtener una población de micropartículas de tamaño heterogéneo, siempre inferior a 5 µm, y que a veces formaban agregados de tamaños superiores. Además, se observó la presencia de una capa porosa en cada uno de los fragmentos, con una distribución homogénea de los poros. De esta manera, se comprobaron dos de las características más importantes de las micropartículas de silicio mesoporoso: la heterogeneidad en forma y tamaño y la presencia de poros distribuidos homogéneamente en su superficie.

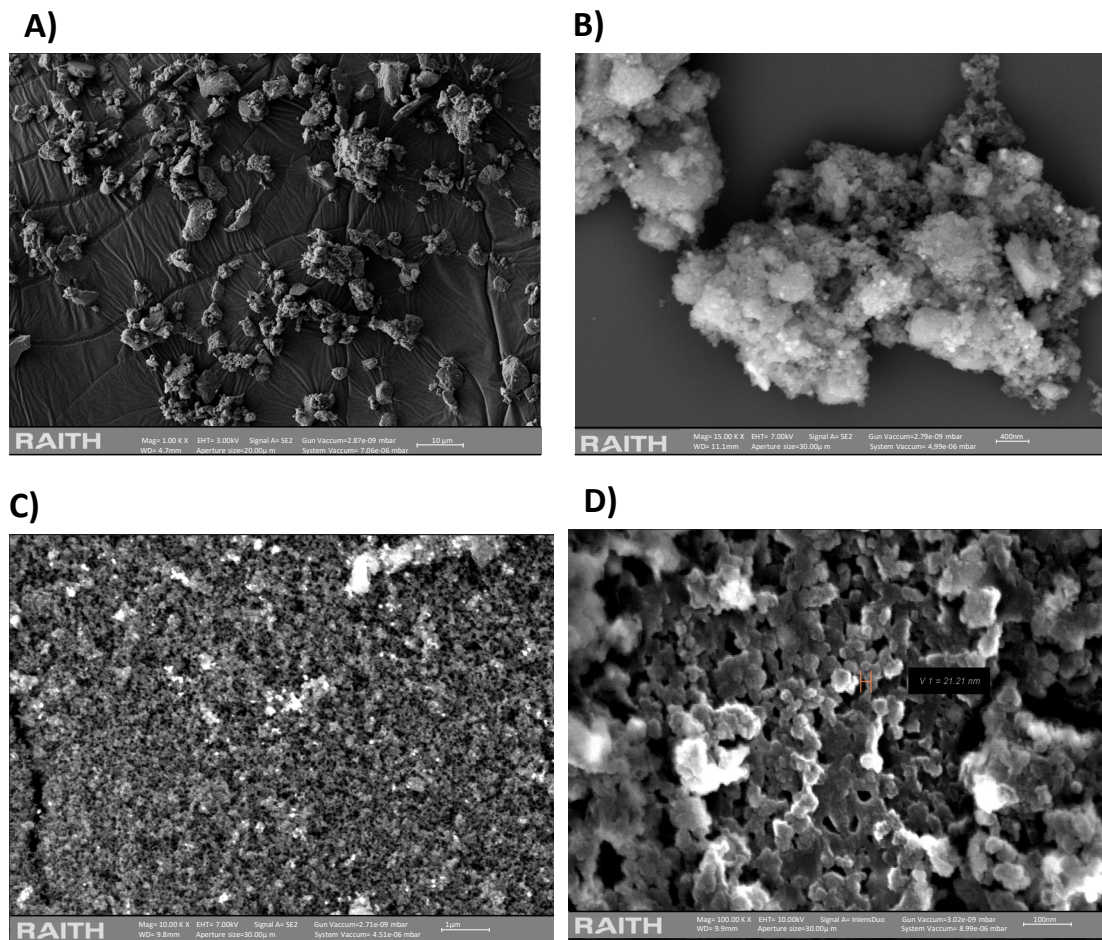


Figura R1: Imagen al microscopio electrónico de barrido (SEM) de las micropartículas de silicio mesoporoso (MSMPs). A) Población heterogénea de partículas, de tamaño inferior a 5μm. Aumento 1000x y B) Aumento 15000x. C) Presencia de poros en la superficie de las MSMPs, aumento 10000x y D) Aumento 100000x

1.2. Funcionalización de las MSMPs con grupos amino.

Para comprobar la correcta funcionalización de las MSMPs se realizaron dos análisis independientes.

1.2.1. Espectroscopía de Infrarrojos por Transformada de Fourier (FTIR).

Este análisis nos permitió detectar los diferentes grupos funcionales. Se basa en la vibración de las moléculas presentes en la muestra cuando esta es tratada con infrarrojos. Mediante este análisis se debería observar un pico de tensión del enlace N-H en torno a 3400-3300 cm^{-1} y otro de flexión de ese mismo enlace en torno a 1600-1500 cm^{-1} . Sin embargo, en este caso el pico de tensión no se detectó debido a la presencia de grupos OH, mientras que, el pico de flexión se detectó de manera sutil

(Figura 2). Para comprobar de forma inequívoca la presencia del grupo amino en la muestra funcionalizada se realizó un análisis químico elemental.

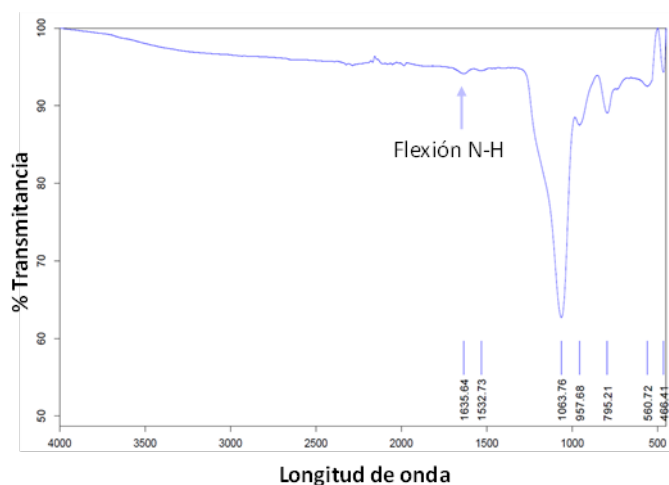


Figura R2: Espectro obtenido mediante FTIR de las MSMPs después de la funcionalización

1.2.2. Análisis químico elemental.

El análisis químico elemental nos permitió corroborar cuantitativamente la presencia de nitrógeno en las muestras funcionalizadas. Lo que observamos fue que, tras el tratamiento con APTS de las micropartículas el porcentaje de nitrógeno presente aumenta hasta el 1,5%, comprobando que el contenido de nitrógeno era superior en la muestra funcionalizada (Figura R3A). El análisis químico elemental nos permitió conocer la composición de nuestras MSMPs, observándose como el 4% era carbono, el 2% hidrógeno y el 1,5%, en el caso de las funcionalizadas, nitrógeno. (Figura R3B).

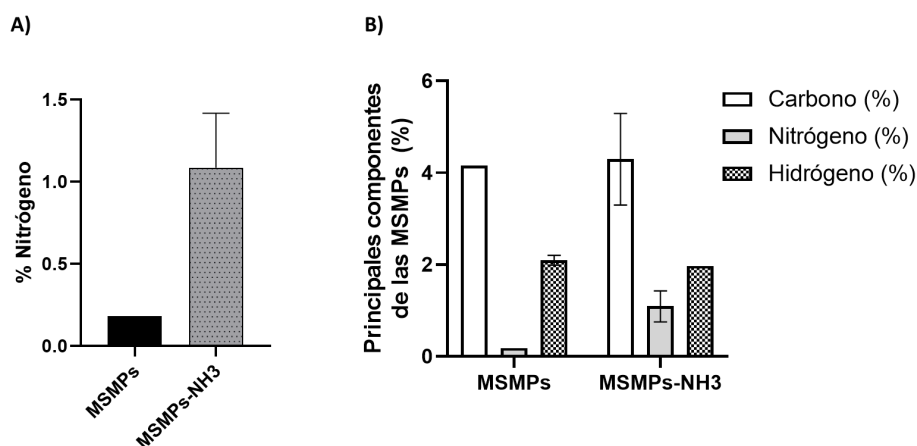


Figura R3: Composición de las micropartículas de silicio mesoporoso (MSMPs) producidas, mediante análisis químico elemental. A) Porcentaje de nitrógeno presente en la muestra funcionalizada en comparación con la no funcionalizada. B) Principales componentes de las MSMPs, aparte del silicio.

2. Estudio de la respuesta inmunitaria frente al complejo MSMPs-S1 en ratones BALB/c.

Para estudiar el posible papel adyuvante de las MSMPs, se diseñó un complejo vacunal basado en MSMPs y la subunidad S1 de la proteína S del virus SARS-CoV-2. Para ello se analizó la respuesta inmunitaria de ratones BALB/c inmunizados con dos complejos vacunales distintos, uno basado en MSMPs y el otro basado en hidróxido de aluminio, y se realizó un estudio longitudinal de la respuesta humoral y celular (**Figura R4A**). Con este ensayo se quiso conocer si existían diferencias entre el hidróxido de aluminio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) y las micropartículas de silicio mesoporoso (MSMPs) en cuanto a la estimulación de la respuesta inmunitaria adaptativa, tanto humoral como celular.

2.1. La respuesta humoral específica frente al virus del SARS-CoV-2, medida mediante la producción de IgG total, IgG1 e IgG2a, mejora en ratones inmunizados con MSMPs-S1.

Para el estudio de la respuesta humoral frente a S1 se midió la presencia en sangre de tres isotipos de inmunoglobulinas (IgG total, IgG1 e IgG2a) a largo plazo.

En primer lugar, y de forma general, observamos que los ratones inmunizados con cualquiera de los dos adyuvantes, tanto $\text{Al}(\text{OH})_3$ como MSMPs, conjugados con el antígeno producen una mayor cantidad de anticuerpos específicos que los ratones inmunizados exclusivamente con el antígeno (**Figura R4**). De esta forma queda demostrado el efecto inmunoestimulador de las MSMPs, siendo prácticamente igual que el desempeñado por el $\text{Al}(\text{OH})_3$. Al analizar de forma independiente cada una de las inmunoglobulinas se observaron ciertas diferencias, que demuestran una respuesta inmunitaria diferente en función del adyuvante utilizado.

Con respecto a IgG total, observamos un aumento significativo en la producción de anticuerpos a los 30 días, el cual se mantiene tras los dos meses, pero disminuye considerablemente a los 5 meses. En estos casos se observan diferencias entre los ratones inmunizados solo con S1 y los ratones inmunizados con adyuvantes, aunque no sean diferencias significativas. Siete días después del boost (7 meses después de la primera inmunización) podemos observar como el título de anticuerpos aumenta de nuevo, debido a la reexposición al antígeno, siendo este aumento similar en los dos

adyuvantes, pero escaso en los ratones inmunizados exclusivamente con el antígeno.

(Figura R4B-C)

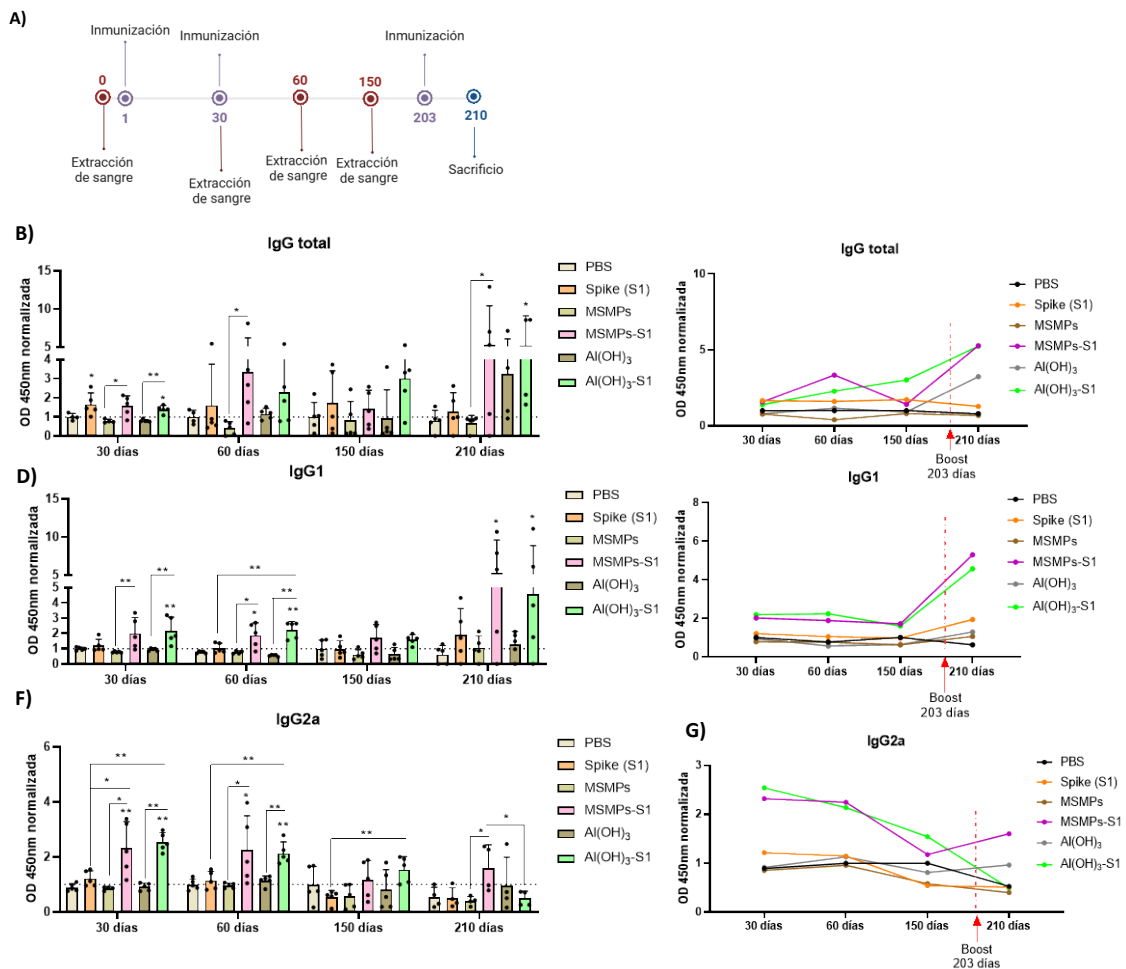


Figura R4: Estudio de la respuesta humoral en ratones BALB/c inmunizados frente al SARS-CoV-2. A) Esquema que muestra el protocolo de inmunización seguido. Producción de anticuerpos **(B-C)** IgG total, **(D-E)** IgG1 e **(F-G)** IgG2a, frente a S1, producidos por ratones BALB/c inmunizados con Spike (naranja), MSMPs-S1 (rosa) y Al(OH)₃-S1 (verde) a lo largo de siete meses, tras recibir dos dosis del complejo vacunal. Los resultados fueron normalizados frente a los datos de PBS obtenidos a los 30 días. Las diferencias significativas fueron analizadas mediante la prueba Mann-Whitney. **p* < 0,05, ***p* < 0,01, ****p* < 0,001. *n*=5

La cantidad de IgG1 tiene un comportamiento similar al observado en IgG total, observándose una mayor producción de anticuerpos cuando los ratones son inmunizados con el antígeno conjugado a un adyuvante, una disminución en el título de anticuerpos a los cinco meses y un aumento de estos después del boost. Sin encontrarse diferencias significativas entre ambos adyuvantes, pero sí observándose una mejora de la respuesta humoral con el uso de estos en comparación con su ausencia **(Figura R4D-E)**.

Por otro lado, IgG2a muestra un comportamiento similar a los anteriores, pero presentando mayores diferencias en función del adyuvante utilizado. En este caso, a los 30 días sí que se observan diferencias significativas entre el uso de adyuvantes y la inmunización exclusiva con el antígeno, manteniéndose estas diferencias hasta los dos meses. Al igual que en los casos anteriores, después de cinco meses, la presencia de IgG2a en sangre disminuye considerablemente. Sin embargo, después del boost, únicamente los ratones inmunizados con el complejo MSMPs-S1 vuelven a presentar un título significativamente elevado de anticuerpos en sangre, algo que no ocurre con el uso del hidróxido de aluminio como adyuvante. (**Figura R4E-F**).

2.2. El suero de ratones inmunizados con MSMPs-S1 muestran un porcentaje de neutralización frente al SARS-CoV-2 comparable a los inmunizados con Al(OH)₃-S1.

Una vez estudiada la capacidad de las MSMPs para inducir una respuesta humoral potente y tras observar sus similitudes y diferencias con el hidróxido de aluminio, decidimos estudiar la capacidad de neutralización que tenían los anticuerpos producidos y, observar si existía alguna diferencia significativa entre ambos adyuvantes. Para ello se analizó el porcentaje de neutralización frente a RBD (dominio de unión) de los distintos grupos a lo largo de siete meses y se correlacionó con la producción de anticuerpos que se había observado en el apartado anterior.

El análisis de la neutralización nos va a permitir conocer de forma teórica la capacidad de protección de nuestro complejo vacunal, puesto que, al bloquearse la unión de RBD-ACE2 se impide la entrada del virus a través de las células diana.

Para el estudio del porcentaje de neutralización se analizó la unión entre RBD y ACE2 en presencia y ausencia de los anticuerpos presentes en el suero de ratones inmunizados frente a S1. En este ensayo se observó que los ratones inmunizados con S1 conjugada tanto con hidróxido de aluminio como con MSMPs presentaban, un mes después de la primera dosis, un porcentaje de neutralización significativamente mayor que los ratones inmunizados exclusivamente con S1, manteniéndose estas diferencias hasta los dos meses (**Figura R5A**). Cuando se analizó el porcentaje de neutralización a los cinco meses, se observó como este disminuía significativamente, al igual que lo observado en el título

de anticuerpos. Tras el boost, únicamente los ratones inmunizados con MSMPs-S1 presentaban un porcentaje de neutralización elevado, siendo significativamente mayor que el observado en el resto de los grupos. Estas diferencias nos señalan una ventaja más en cuanto al uso de MSMPs como adyuvante vacunal frente al hidróxido de aluminio (Figura R5A).

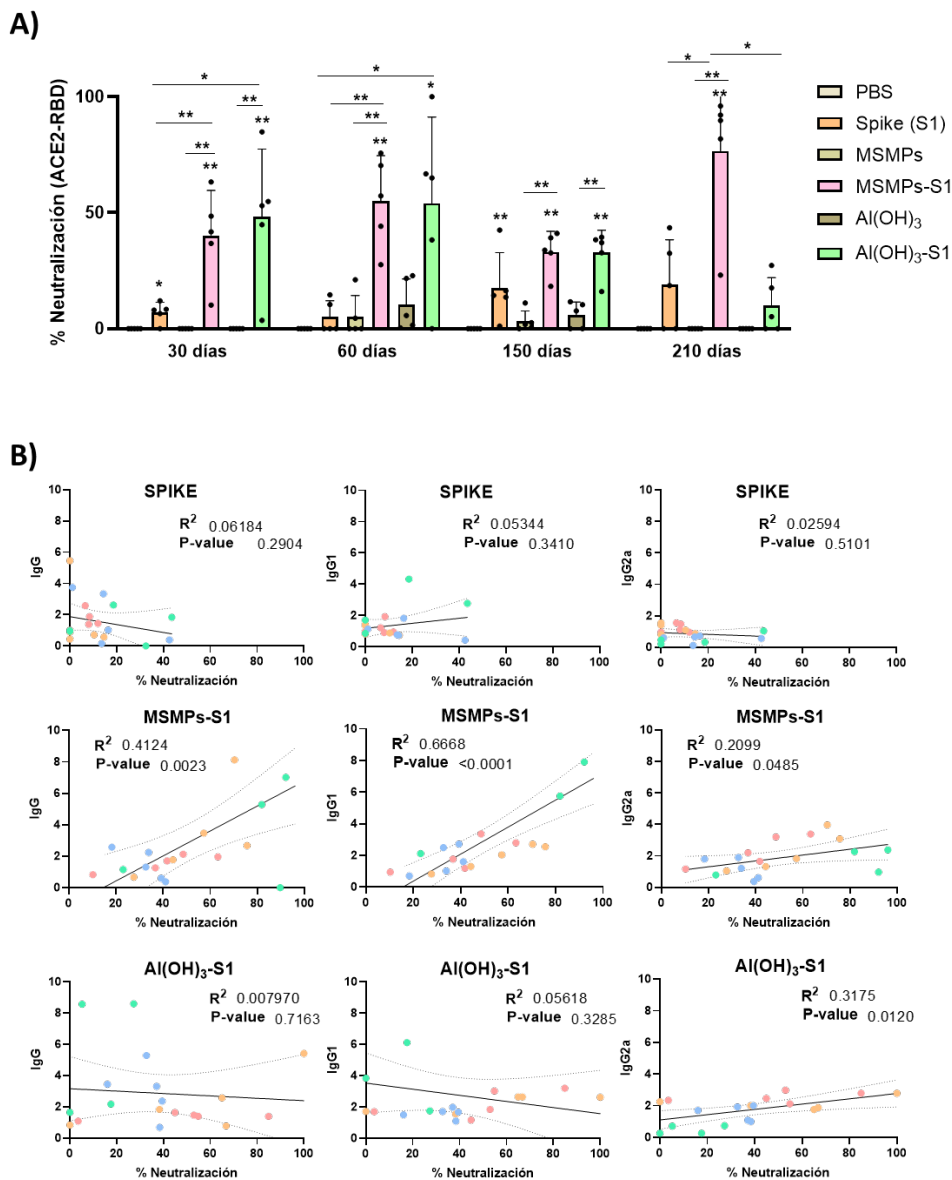


Figura R5: Estudio de la neutralización en ratones BALB/c inmunizados frente al SARS-CoV-2. A) Porcentaje de neutralización de ratones BALB/c inmunizados con Spike (naranja), MSMPs-S1 (rosa) y Al(OH)₃-S1 (verde) a lo largo de siete meses, tras recibir dos dosis del complejo vacunal. Los resultados fueron normalizados frente a los datos de PBS obtenidos a los 30 días. **B)** Correlación entre el título de anticuerpos IgG total, IgG1 e IgG2a y el porcentaje de neutralización en ratones BalB/c inmunizados con Spike, MSMPs-S1 y Al(OH)₃-S1 después de 30 (rosa), 60 (naranja), 150 (azul) y 210 (verde) días de la primera inmunización. El análisis de correlación se realizó mediante el coeficiente de Pearson (R2). n=5

Tras el análisis de la producción de anticuerpos y el análisis de neutralización observamos una diferencia considerable entre ambos adyuvantes, especialmente después del boost. Estos resultados nos demuestran que las MSMPs son capaces de estimular la producción de IgG2a mejor que el hidróxido de aluminio, aumentando la capacidad de neutralización tras la reexposición al antígeno siete meses después de la primera dosis.

2.2.1. Los ratones inmunizados con MSMPs-S1 muestran una mejor correlación en el tiempo, entre la cantidad de anticuerpos y el porcentaje de neutralización.

Para seguir indagando más en las diferencias entre ambos adyuvantes y para analizar más en profundidad el porcentaje de neutralización observado en el apartado anterior, se estudió la correlación entre el título de anticuerpos y el porcentaje de neutralización obtenido.

Tras analizar la correlación de IgG total, IgG1 e IgG2a con el porcentaje de neutralización de forma longitudinal en el tiempo, se observó que existía una correlación significativamente positiva en el grupo de ratones inmunizados con MSMPs-S1, siendo mayor en el caso de IgG1 ($R^2=0,67$). Esta correlación no se observaba ni en los ratones inmunizados exclusivamente con el antígeno ni en los ratones inmunizados con $Al(OH)_3$ -S1 (**Figura R5B**).

La correlación significativamente positiva observada en los ratones inmunizados con MSMPs-S1 nos indica que, en el estudio longitudinal, la mayoría de los anticuerpos producidos son anticuerpos neutralizantes, de tal manera que existiría, al menos de forma teórica, una mayor protección a la infección, a largo plazo, en este grupo de estudio. Por otro lado, la ausencia de correlación en el grupo $Al(OH)_3$ -S1 nos muestra que la mayoría de los anticuerpos producidos después del boost, por este complejo vacunal, no son neutralizantes, y por lo tanto, no se estaría protegiendo frente a la infección. Estos datos sugieren que las MSMPs podrían tener más ventajas como adyuvantes que el $Al(OH)_3$ a largo plazo, puesto que no solo producen más anticuerpos IgG2a después de la dosis de recuerdo, sino que tienen una mayor capacidad de neutralización.

2.2.2. Neutralización frente a las distintas variantes de preocupación (VOCs).

Una vez comprobada la correlación entre anticuerpos y neutralización frente a la variante original (de Wuhan), se quiso comprobar si también existía neutralización frente a las distintas variantes de interés (VOCs) y estudiar así, si las mutaciones que presentan podrían alterar la unión de los anticuerpos a la región RBD. Para ello se analizó el porcentaje de neutralización frente a distintas variantes 60 días después de la primera dosis, al observarse en resultados anteriores que, a este tiempo, la producción de anticuerpos y la neutralización era mayor.

Con respecto a la variante B.1.351 (beta) se observó (**Figura R6**) una tendencia hacia una disminución en el porcentaje de neutralización en comparación con la variante original en ratones inmunizados con MSMPs-S1 y Al(OH)₃-S1, aunque no se encontraron diferencias significativas. Con respecto a la variante B.1.617 (delta) no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de neutralización cuando se comparó con la variante original. Finalmente, con respecto a la variante B.1.1.529.1 (ómicon) se observa una ausencia de neutralización en todos los casos (**Figura R6**).

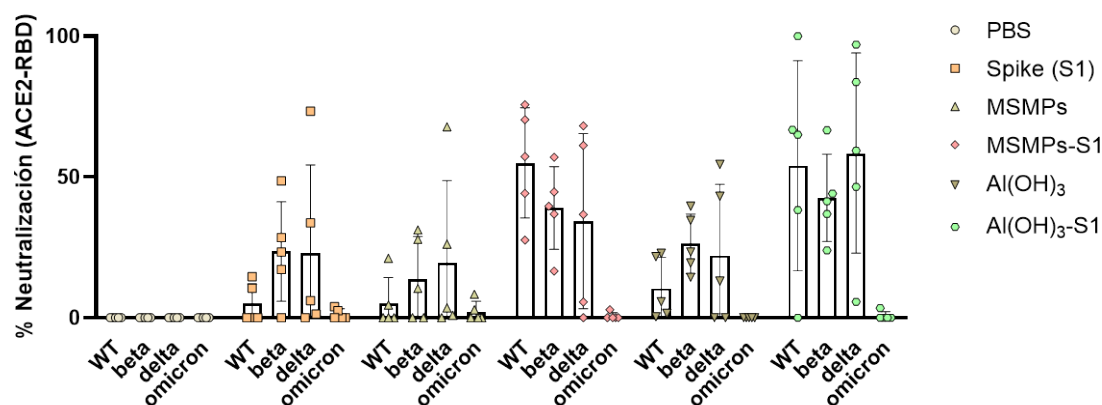


Figura R6: Estudio de la neutralización frente a las distintas variantes del SARS-CoV-2 en ratones BALB/c inmunizados con Spike (naranja), MSMPs-S1 (rosa) y Al(OH)₃-S1 (verde) después de 30 días de la primera dosis. Los resultados fueron normalizados frente a los datos de PBS. Las diferencias significativas fueron analizadas mediante la prueba Mann-Whitney. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$. $n=5$.**

2.3. Los ratones inmunizados con MSMPs-S1 presentan mayor respuesta celular específica frente al SARS-CoV-2.

Una vez estudiada la respuesta humoral frente al SARS-CoV-2 pasamos a estudiar la respuesta celular, otro componente fundamental de la respuesta inmunitaria adaptativa.

RESULTADOS

Para ello, se utilizaron los esplenocitos de ratones inmunizados con los distintos complejos vacunales, los cuales se estimularon *in vitro* con péptidos pertenecientes a la proteína S, nombrados como Peptivator_S para analizar la producción de IFN- γ por citometría de flujo como se explica en el apartado de métodos.

Para el análisis de la producción de IFN- γ se siguió el esquema que se muestra en la **figura R7A**, seleccionándose las células CD3+ y de estas las células CD4+ y CD4-, las cuales se nombraron como células CD8. En estos dos grupos de células se analizó el porcentaje de células positivas para IFN- γ , estudiándose así la respuesta celular (**Figura R7B**).

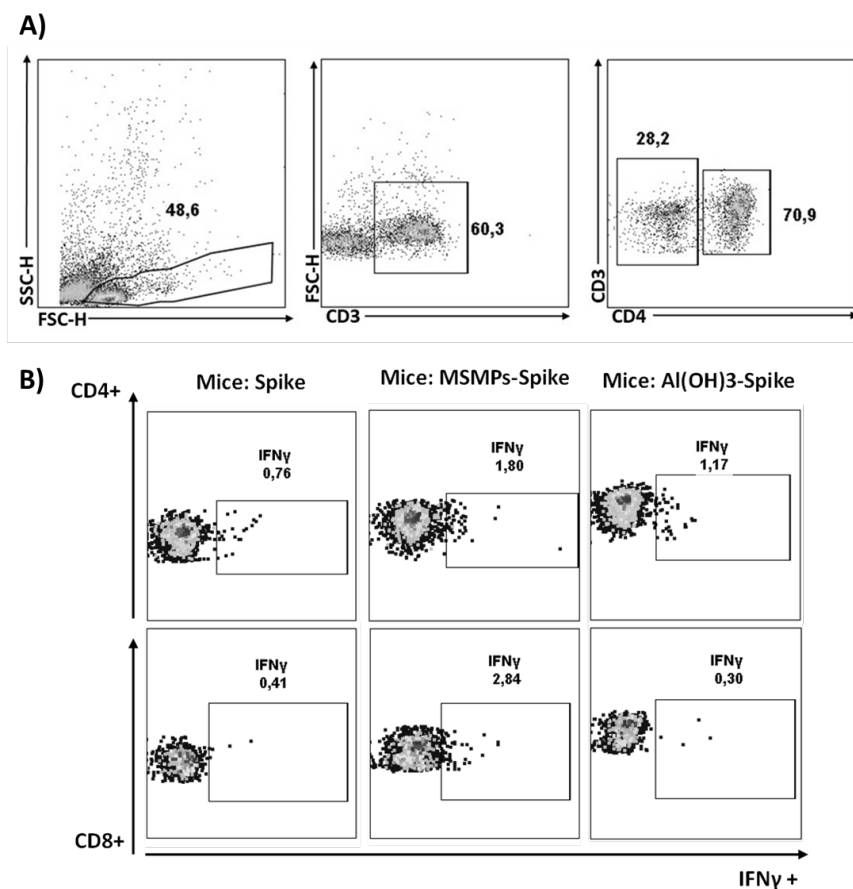


Figura R7: Estudio de la respuesta celular *in vitro* de esplenocitos en respuesta al Peptivator_S en ratones BALB/c inmunizados frente al SARS-CoV-2. A) Estrategia de gateo seguida para analizar la producción de IFN- γ linfocitos T CD4 y CD8. B) Dot plots representativos de la producción de IFN- γ de células T CD4 y CD8 de ratones BALB/c inmunizados con S1, MSMPs-S1 y Al(OH)₃-S1.

Tras el análisis, no se observaron diferencias significativas en cuanto a la producción de IFN- γ en las células CD4 entre los distintos grupos de ratones (**Figura R8A**). Sin embargo, al analizar la producción de IFN- γ en las células CD8 se observó cómo los ratones inmunizados con MSMPs-S1 producían una cantidad significativamente mayor de IFN- γ

que los ratones inmunizados con S1 (**Figura R8B**) demostrándose así que, las MSMPs son capaces de inducir una respuesta celular, además de una buena respuesta humoral. Por otro lado, cuando se comparó la producción de IFN- γ de estas células CD8 en ratones inmunizados con MSMPs-S1 con los ratones inmunizados con Al(OH)₃-S1 se observó cómo estos últimos no presentaban producción de IFN- γ , y por lo tanto, su respuesta celular era prácticamente nula.

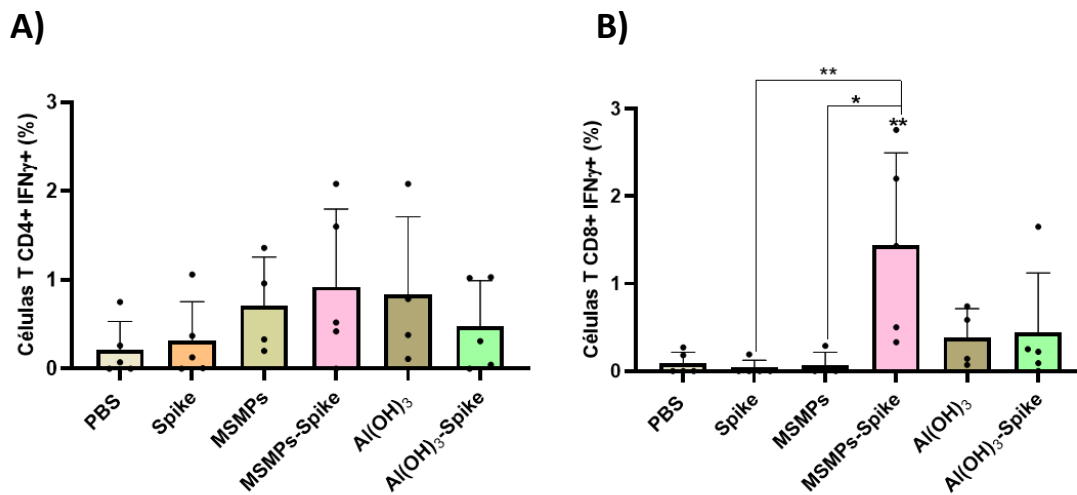


Figura R8: Respuesta celular Th1 (producción de IFN- γ) en los distintos grupos de ratones BALB/c. Los resultados muestran la media de los porcentajes (%) obtenidos (normalizados tras restarles la estimulación basal). **A)** Producción de células IFN- γ + por parte de las células CD3+ CD4+. **B)** Porcentaje de células IFN- γ + por parte de las células CD3+ CD4-, nombradas como células CD8+. Spike (naranja), MSMPs-S1 (rosa) y Al(OH)₃-S1 (verde). Las diferencias significativas fueron analizadas mediante la prueba Mann-Whitney. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. $n=5$.

2.4. Estudio transcriptómico (ARN-seq) de la expresión de genes del sistema inmunitario en esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados.

Además de estudiar la respuesta celular, decidimos analizar la expresión de genes implicados en la respuesta inmunitaria en esplenocitos de ratones inmunizados con los diferentes complejos vacunales. Para ello se realizó un análisis bioinformático de transcriptómica donde se analizaron genes de expresión diferencial (DEG) a partir de los esplenocitos de dichos ratones.

Como se explica en el apartado de métodos, los ratones fueron inmunizados con dos dosis y después de siete meses se les dio una dosis de recuerdo. Siete días después de la última dosis se aislaron los esplenocitos, se extrajo su ARN y se realizó un pool usando 3 ratones de cada condición. Como se observa en la **tabla R1**, los ratones inmunizados

con el complejo vacunal de estudio (MSMPs-S1) presentaban 2929 genes expresados diferencialmente, al compararlos con los ratones inmunizados exclusivamente con MSMPs y 589 genes expresados diferencialmente al compararlo con los ratones inmunizados con Al(OH)₃-S1.

Grupos comparados	Regulados a la baja	Regulados al alta	Total
PBS vs S1	15	396	441
PBS vs MSMPs	1947	1042	2982
MSMPs vs MSMPs-S1	904	2025	2929
Al(OH) ₃ vs Al(OH) ₃ -S1	9	173	182
Al(OH) ₃ -S1 vs MSMPs-S1	578	11	589

Tabla R1: Número de genes expresados diferencialmente (DEG) (total, regulados al alza y a la baja) en esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados con los diferentes tratamientos (PBS, S1, MSMPs, MSMPs-S1, Al(OH)₃ y Al(OH)₃-S1) tras 7 días de la dosis de refuerzo (FDR<0.005).

En primer lugar, se analizaron los genes que se encontraban diferencialmente expresados en el grupo MSMPs al compararlos con el grupo control (PBS). Tras este análisis se comprobó que la mayoría de los genes expresados diferencialmente formaban parte de dos vías principales, la transducción de señales y el sistema inmunitario (**Figura R9A**). Dentro de estas vías, nos centramos en el sistema inmunitario y observamos que las principales rutas afectadas eran la formación de NETs y las vías de señalización por citoquinas (**Figura R9C**). Además, dentro del sistema inmunitario se encontraron diferencias en los niveles de expresión de otros muchos genes (**Figura R9B**), destacando una regulación al alza, en el caso de las MSMPs, de quimioquinas como CxCl3 o la mieloperoxidasa y una regulación a la baja de genes que participan en la diferenciación hacia Th17.

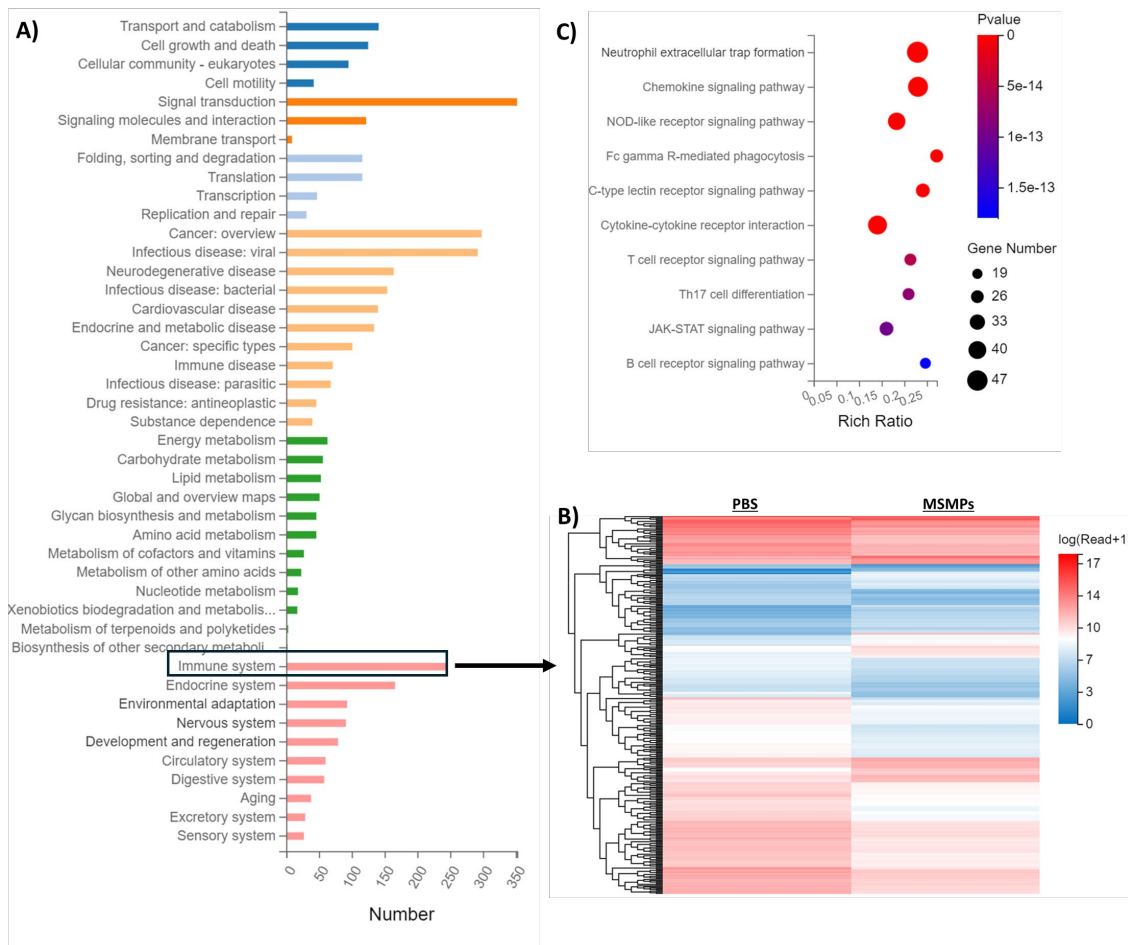


Figura R9: Análisis de ARN-seq en esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados con PBS y MSMPs, después de 7 días de la dosis de refuerzo (FDR<0,005). A) Clasificación de los DEG totales (MSMP vs PBS) según las vías KEGG y mapa de calor (B) con los genes DEG implicados en la respuesta inmunitaria. C) Diagrama de dispersión que muestra el enriquecimiento de diferentes vías implicadas, mostrando el número de DEG según el tamaño de los puntos y la significación de la expresión ajustado al p-valor según el color.

2.4.1. MSMPs vs MSMPs-S1.

Para estudiar transcripcionalmente el efecto de las MSMPs sobre esplenocitos de ratón y comprender su papel inmunoestimulador, que nuestro grupo ya había observado previamente, se analizaron las principales vías alteradas del sistema inmunitario tras la inmunización de los ratones con MSMPs-S1 en comparación con la inoculación exclusiva de MSMPs. Cuando comparamos ambas condiciones, observamos que las principales vías alteradas en MSMPs-S1, respecto a MSMPs son la formación de NETs y la señalización por quimioquinas (**Figura R10**).

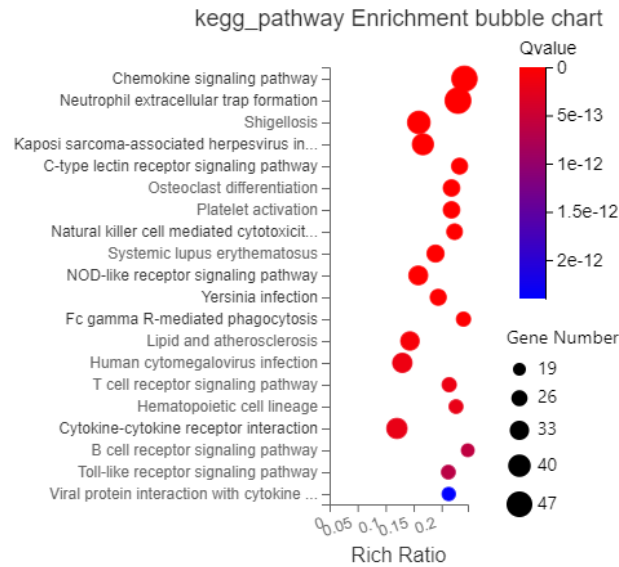


Figura R10: Diagrama de dispersión que muestra el enriquecimiento de diferentes vías implicadas, mostrando el número de DEG según el tamaño de los puntos y la significación de la expresión ajustado al q-valor según el color.

Con respecto a la formación de NETs (**Figura R11A**), se observa una regulación al alta de “Pclg1” o de “Mtor” en MSMPs-S1. Con respecto a las vías de señalización por quimioquinas (**Figura R11B**), se observa de nuevo una regulación al alta de “Pclg1”, mientras que, se produce una regulación a la baja de quimioquinas como Cxcl2 y Cxcl3 en los ratones inmunizados con MSMPs-S1.

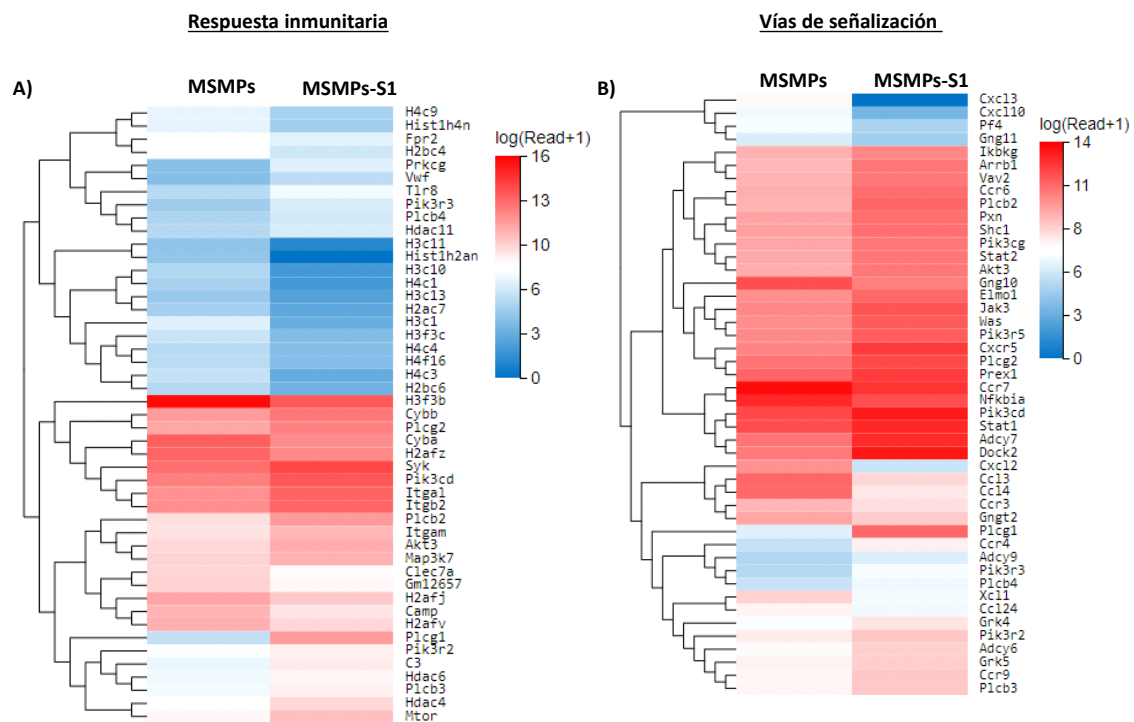


Figura R11: Análisis de ARN-seq en esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados con MSMPs y MSMPs-S1 tras 7 días después de la dosis de refuerzo (FDR<0,005). A) Mapa de calor con los genes DEG implicados en la respuesta inmunitaria en la vía de formación de trampas extracelulares de neutrófilos. B) Mapa de calor con los genes DEG implicados en la respuesta inmunitaria en la vía de señalización por quimioquinas.

2.4.2. Al(OH)₃-S1 vs MSMPs-S1.

A continuación, se quiso estudiar transcripcionalmente si existían diferencias entre el uso de hidróxido de aluminio y de MSMPs como adyuvantes. Para ello, se analizaron las vías alteradas y los genes con expresión diferencial en esplenocitos de ratones inmunizados con ambos complejos. Como se muestra en la **figura R12**, una de las vías del sistema inmunitario con un mayor número de genes expresados diferencialmente vuelve a ser la vía de formación de trampas extracelulares de neutrófilos y la vía de IL-17.

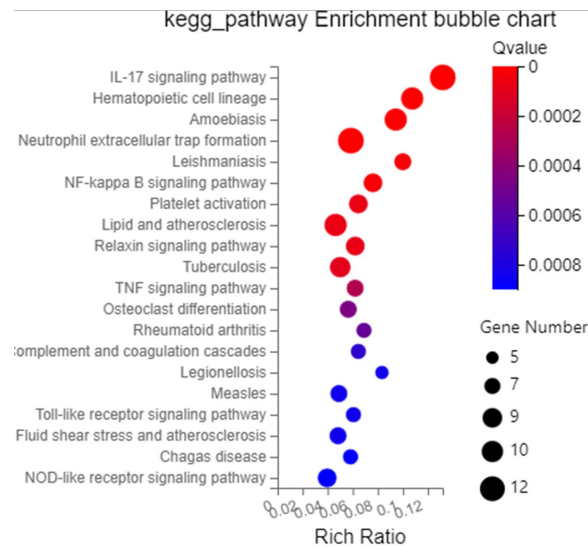


Figura R12: Diagrama de dispersión que muestra el enriquecimiento de diferentes vías implicadas, mostrando el número de DEG según el tamaño de los puntos y la significación de la expresión ajustado al q-valor según el color.

En el primer caso, se encontraron 12 genes expresados diferencialmente en el caso de los ratones inmunizados con MSMPs-S1, los cuales estaban regulados a la baja respecto al grupo Al(OH)₃-S1. **(Figura R13A)**. De la misma manera, al estudiar que ocurría con la vía de IL-17 **(Figura R13B)** observamos como la mayoría de los genes se encontraban regulados a la baja en los ratones inmunizados con MSMPs-S1, respecto a Al(OH)₃-S1.

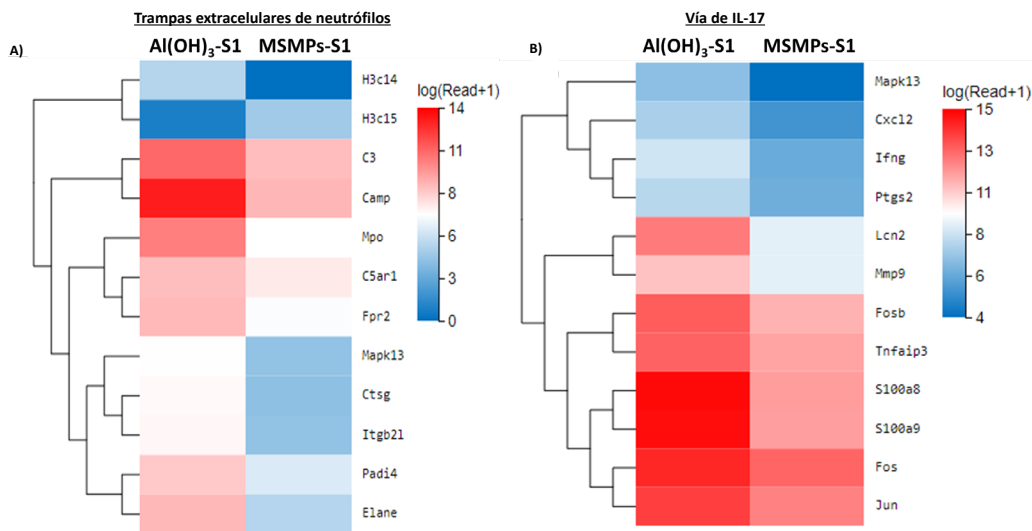


Figura R13: Análisis de ARN-seq en esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados con Al(OH)₃-S1 y MSMPs-S1 tras 7 días después de la dosis de refuerzo (FDR<0,005 A) Mapa de calor con los genes DEG implicados en la respuesta inmunitaria en la vía de formación de trampas extracelulares de neutrófilos. B) Mapa de calor con los genes DEG implicados en la respuesta inmunitaria en la vía de IL-17.

3. Protección frente a la infección por SARS-CoV-2 en ratones transgénicos k18-hACE2 inmunizados con MSMPs-S1.

Al observar un elevado título de anticuerpos, de neutralización y de respuesta celular en ratones inmunizados con nuestro adyuvante, se quiso estudiar el efecto protector que tenía frente a la infección. Para ello, se inmunizaron ratones transgénicos k18-hACE2, siguiendo el mismo protocolo de inmunización que en ensayos anteriores e inoculándoles intranasalmente la variante del virus SARS-CoV-2 MAD6¹⁴⁷ (idéntica al aislado viral de Wuhan-Hu-1; GenBank MN908947) 15 días después de la segunda inmunización (**Figura R14A**). Una vez infectados, se estudió el estado de los animales y la presencia del virus en distintos órganos, comparándose siempre los grupos control (PBS y MSMPs) con los grupos inmunizados con el antígeno sólo (S1) o con el antígeno junto con el respectivo adyuvante (MSMPs-S1 y Al(OH)₃-S1).

3.1. Respuesta humoral frente al SARS-CoV-2, medida como producción de IgG1 específica, previa a la infección.

Previamente al ensayo de infectividad se corroboró que todos los ratones se habían inmunizado correctamente. Para ello se realizó un ELISA de IgG1, frente a RBD, 7 días después de la segunda dosis. Lo que se observó fue que, tanto los ratones inmunizados con MSMPs-S1 como los ratones inmunizados con Al(OH)₃-S1 presentaban un título elevado de anticuerpos, en comparación con los grupos control (MSMPs y Spike), los cuales no presentaban anticuerpos frente a la región RBD del virus del SARS-CoV-2 (**Figura R14B**).

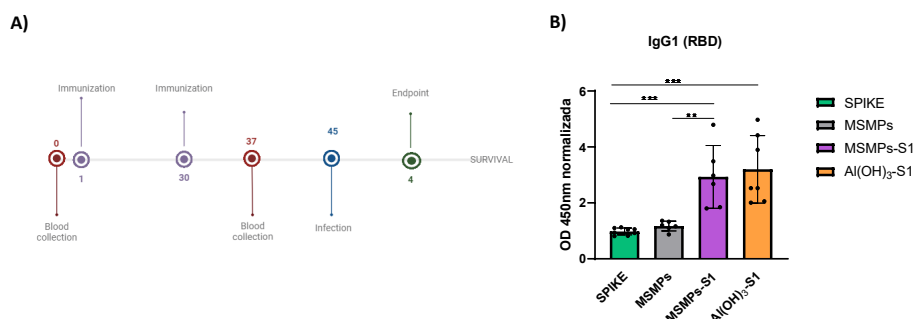


Figura R14: Ensayo de infectividad por SARS-CoV-2 en ratones k18 hACE2. A) Esquema que muestra el protocolo de inmunización e infectividad seguido para la realización del estudio. **B)** Producción de anticuerpos IgG1 frente a RBD a los 37 días después de la primera inmunización. Los datos fueron normalizados respecto al PBS y las diferencias significativas fueron analizadas mediante la prueba Mann-Whitney. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.2. Los ratones k18-hACE2 inmunizados con MSMPs-S1 sobreviven a la infección por el virus del SARS-CoV-2.

Una vez demostrada la infección de los animales y la presencia del virus en el organismo se quiso evaluar el desarrollo de la enfermedad en los distintos grupos de ratones. Para ello, se analizó tanto la supervivencia, como las variaciones en el peso de los animales durante los 15 días posteriores a la infección.

Con respecto a la supervivencia (**Figura R15A**) se observó cómo los ratones control (inmunizados con PBS o MSMPs) y los ratones inmunizados solo con el antígeno (S1) morían antes de los diez primeros días. Sin embargo, los ratones inmunizados con el antígeno conjugado con cualquiera de los adyuvantes sobrevivían, a excepción de uno de los individuos inmunizado con MSMPs-S1 que murió a los siete días. Estos resultados nos demuestran el efecto protector de nuestro adyuvante, al evitar la muerte de los animales tras la infección por SARS-CoV-2.

Por otro lado, al analizar las variaciones en el peso (**Figura R15B**) de cada uno de los individuos se observó cómo los ratones inmunizados con el antígeno solo o sin él sufrieron una disminución de su peso a lo largo de los días hasta su fallecimiento. En el caso de los ratones inmunizados con nuestro adyuvante, se produjo una ligera pérdida de peso no significativa durante los primeros días después de la infección, pero rápidamente se recuperaron hasta llegar a su peso inicial, incluso aumentando ligeramente de peso en los últimos días. Los ratones inmunizados con Al(OH)₃-S1 sufrieron cambios en su peso.

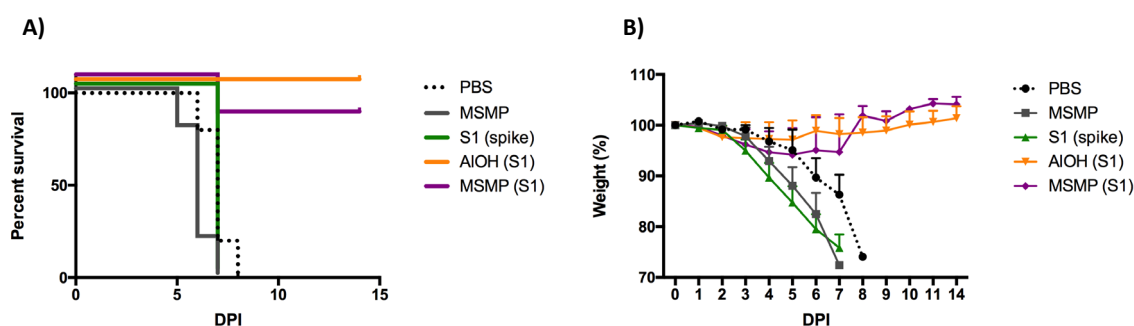


Figura R15: Ensayo de infectividad por SARS-CoV-2 en ratones k18 hACE2. A) Curva de supervivencia en ratones inmunizados. **B)** Variaciones diarias de peso durante 15 días en los ratones después de la infección (Media \pm SEM). Los grupos control analizados fueron: PBS (blanco), MSMPs (gris), mientras que, los grupos de estudio fueron: S1 (verde), MSMPs-S1 (morado) y Al(OH)₃-S1 (naranja).

Esta ausencia de cambio en el peso de los animales y la supervivencia a la infección nos demuestran como las MSMPs conjugadas a S1 son capaces de proteger frente a una forma grave de la enfermedad.

3.3. Evaluación de los síntomas clínicos que presentaron los ratones k18-hACE2 inmunizados tras la infección.

Para finalizar con el estudio de la protección frente a la enfermedad grave causada por SARS-CoV-2 se analizaron los síntomas clínicos que presentaban los ratones durante los 7 primeros días después de la infección. Para ello se analizaron los parámetros recogidos en la tabla 2 del apartado de métodos. Con estos parámetros, se les otorgó, cada día, a cada uno de los individuos una puntuación recogida en la **figura R16**, que nos indica el estado de salud de los individuos. Lo que se observó fue que, los ratones cuyo complejo vacunal no llevaba el antígeno o estaba constituido exclusivamente por este, presentaban una puntuación significativamente mayor que los ratones cuyo complejo vacunal estaba formado por cualquiera de los adyuvantes y el antígeno. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre ambos adyuvantes, aunque, sí que se observó una puntuación ligeramente mayor en los ratones inmunizados con MSMPs-S1 en comparación con los ratones inmunizados con Al(OH)₃-S1, especialmente a los siete días.

Los datos obtenidos en torno al “clinical score”, junto con los mencionados en el apartado anterior, nos demuestran que las micropartículas de silicio mesoporoso (MSMPs) son capaces de proteger del desarrollo de una enfermedad grave tras la exposición al virus SARS-CoV-2.

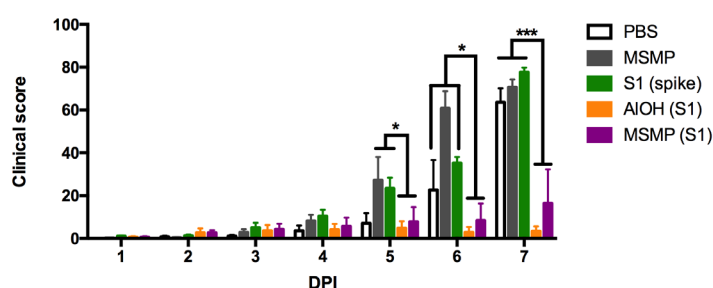


Figura R16: Signos clínicos diarios de cada grupo durante siete días después de la infección. Las diferencias significativas fueron analizadas mediante ANOVA con diferencia mínima significativa de Fisher. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Los grupos control analizados fueron: PBS (blanco), MSMPs (gris), mientras que, los grupos inmunizados fueron: S1 (verde), MSMPs-S1 (morado) y Al(OH)₃-S1 (naranja).

3.4. Menor presencia del SARS-CoV-2 en los órganos de ratones k18-hACE2 inmunizados con el complejo MSMPs-S1.

Finalmente, se analizó la presencia de ARN viral en diferentes órganos para comprobar, por un lado, si los animales se habían infectado y, por otro lado, analizar si el virus había sido capaz de diseminarse por el organismo infectando otros órganos. Para ello, se analizó el umbral del ciclo (CT) en tres órganos diferentes, 4 días después de la infección.

Lo primero en analizarse fueron los pulmones (**Figura R17A**), al tratarse de la principal entrada del SARS-CoV-2 en el organismo. En este caso se observó un bajo valor de CT en todos los grupos analizados siendo ligeramente menor en los ratones control y en los ratones inmunizados exclusivamente con el antígeno. Estos datos nos demuestran que el virus ha sido capaz de infectar a todos los individuos, de manera que ninguno de los adyuvantes induce la inmunidad necesaria para proteger totalmente de la infección, pero sí que parecen proteger parcialmente, al observarse una menor carga viral en los pulmones de los ratones inmunizados con cualquiera de los dos adyuvantes conjugados con la subunidad S1.

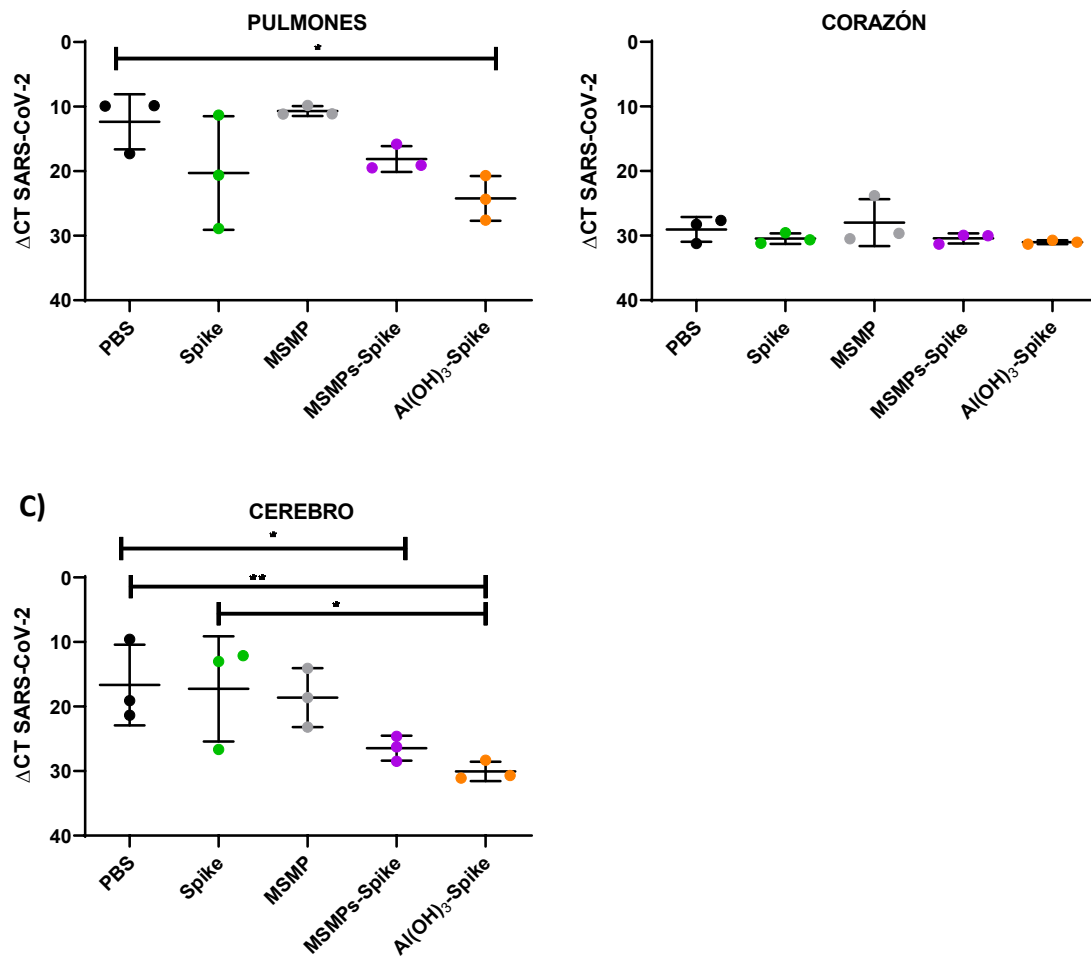


Figura R17: Presencia del SARS-CoV-2 4 días después de la infección en (A) pulmón, (B) corazón y (C) cerebro en ratones k18-hACE2 inmunizados con PBS (negro), Spike (verde), MSMPs (gris), MSMPs-S1 (morado) y Al(OH)₃-S1 (naranja). Las diferencias significativas fueron analizadas mediante one-way ANOVA * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$.**

Posteriormente, se continuó analizando la presencia del virus en el corazón (**Figura R17B**), observándose en este caso como el valor de CT es elevado en todos los grupos, alrededor de 30, lo que nos indica que no hay carga viral y por lo tanto, el virus no fue capaz de infectar este órgano.

Para finalizar, se analizó el valor de CT en el cerebro (**Figura R17C**) y fue en este órgano donde se encontraron grandes diferencias entre el uso y el no uso de adyuvantes, observándose que los individuos inmunizados con MSMPs-S1 y con Al(OH)₃-S1 presentaban unos valores de CT mucho más elevados que los ratones inmunizados con Spike, o los ratones control (PBS o MSMPs). De esta forma se demuestra que las MSMPs

son capaces de proteger frente a la diseminación del virus, favoreciéndose así el aclaramiento viral.

4. Estudio *in situ* del efecto de las MSMPs en la zona de inmunización.

Los resultados anteriores muestran claramente que las micropartículas de silicio mesoporoso presentaban una alta actividad adyuvante, al generar una potente respuesta humoral, y una fuerte respuesta celular, muy superior al aluminio. Con el fin de indagar en el mecanismo de protección asociado a este material decidimos inyectar intramuscularmente, en la pata izquierda, micropartículas de silicio mesoporoso, para estudiar qué efectos había 4 y 24 horas después, analizando cortes del tejido en el sitio de inyección que fueron posteriormente teñidos con Hematoxilina/Eosina (H/E). Además, se quiso analizar si existían diferencias *in situ* entre las MSMPs y el $Al(OH)_3$, ya que sí que habíamos encontrado diferencias en la respuesta celular y en la capacidad de neutralización frente al virus del SARS-CoV-2.

4.1. Infiltrado de células 4 y 24 horas después de la inoculación de MSMPs.

Analizamos el tejido circundante de ratones inyectados con micropartículas de silicio o con hidróxido de aluminio. Cuatro horas después de la inoculación de los adyuvantes se sacrificó a los animales para obtener cortes de tejido de la zona de inoculación. En estos cortes se observó un infiltrado de células en los sitios de inyección de los adyuvantes, el cual no aparecía tras la inoculación intramuscular de PBS (**Figura R18**).

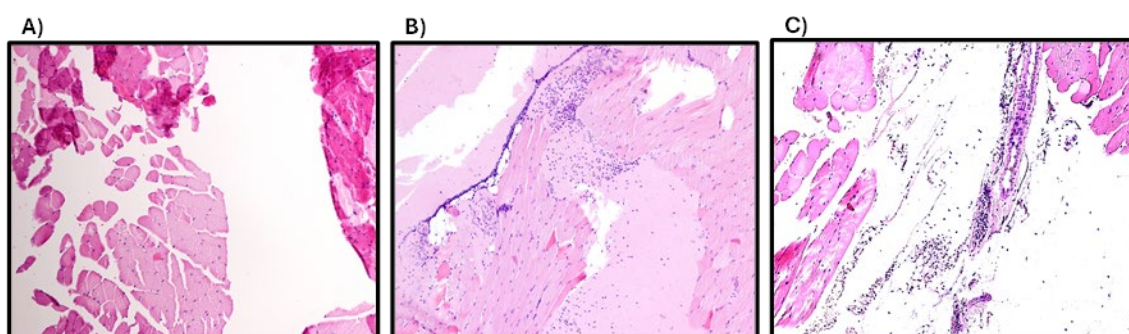


Figura R18: Secciones de tejido muscular de la zona de inyección transcurridas 4 horas, tinción hematoxilina/eosina. Aumento 100X. **A)** Sección histológica de la pata tras la inoculación de PBS. **B)** Sección histológica de la pata tras la inoculación de $Al(OH)_3$. **C)** Sección histológica de la pata tras la inoculación de MSMPs.

Por otro lado, observamos como el hidróxido de aluminio se acumulaba en la zona de pinchazo originando un depósito del mismo. Además, es en este depósito y en sus alrededores donde observamos un infiltrado basófilo (**Figura R19A-B**). En el caso de las MSMPs (**Figura R19C-D**) también se observa un infiltrado, pero en este caso no está asociado a ningún depósito del adyuvante, sino que se trata de un infiltrado mucho más difuso. Además, se observó como algunas de las células que formaban este infiltrado habían sido capaces de endocitar a las micropartículas de silicio mesoporoso presentes en la zona (**Figura R20**).

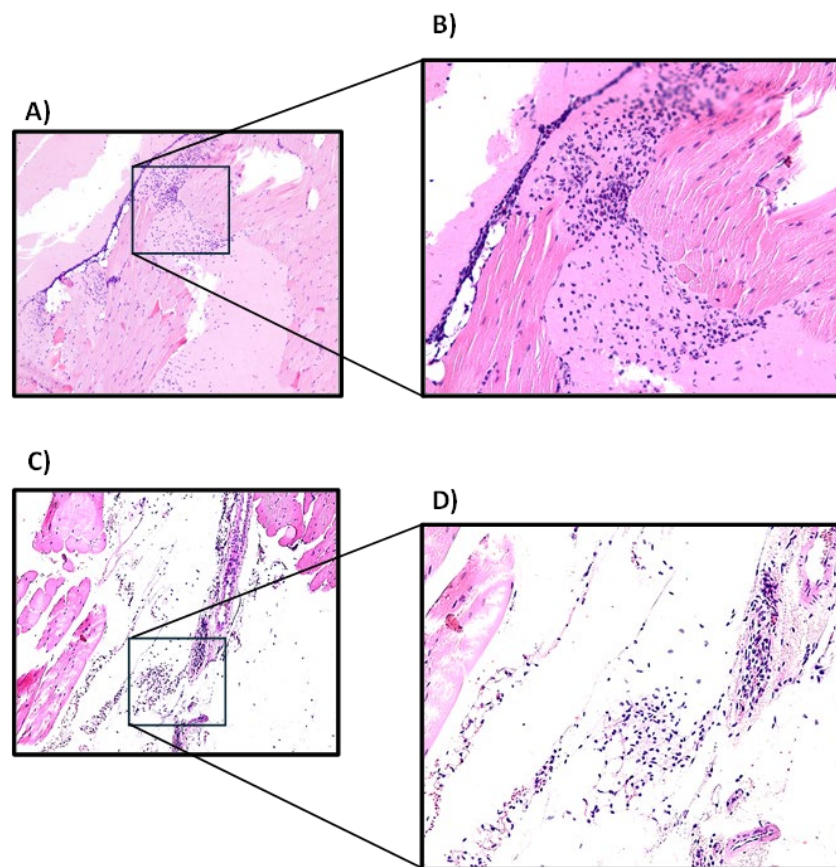


Figura R19: Secciones de tejido muscular de la zona de inyección transcurridas 4 horas, tinción hematoxilina/eosina **A)** Sección histológica de la pata tras la inoculación de $Al(OH)_3$. Aumento 100x. **B)** Sección histológica de la pata tras la inoculación de $Al(OH)_3$. Aumento 200x. **C)** Sección histológica de la pata tras la inoculación de MSMPs. Aumento 100x. **D)** Sección histológica de la pata tras la inoculación de MSMPs. Aumento 200x.

El experimento se repitió con animales que fueron sacrificados veinticuatro horas después de la inoculación. En este caso observamos como el depósito de aluminio, que se había formado a las cuatro horas, desaparecía por completo y con él, el infiltrado celular asociado (**Figura R21B**). Sin embargo, el infiltrado generado por las

micropartículas de silicio mesoporoso se mantenía 24 horas después de la inoculación de las mismas (**Figura R20C**).

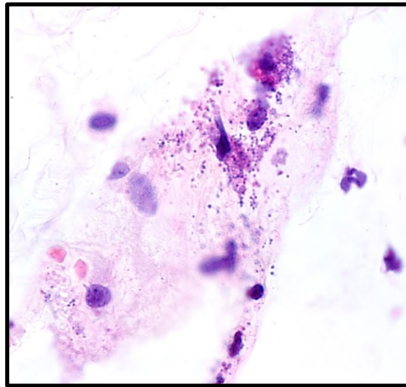


Figura R20: Secciones de tejido muscular de la zona de inyección de MSMPs transcurridas 4 horas. Tinción con hematoxilina/eosina. Aumento 1000x

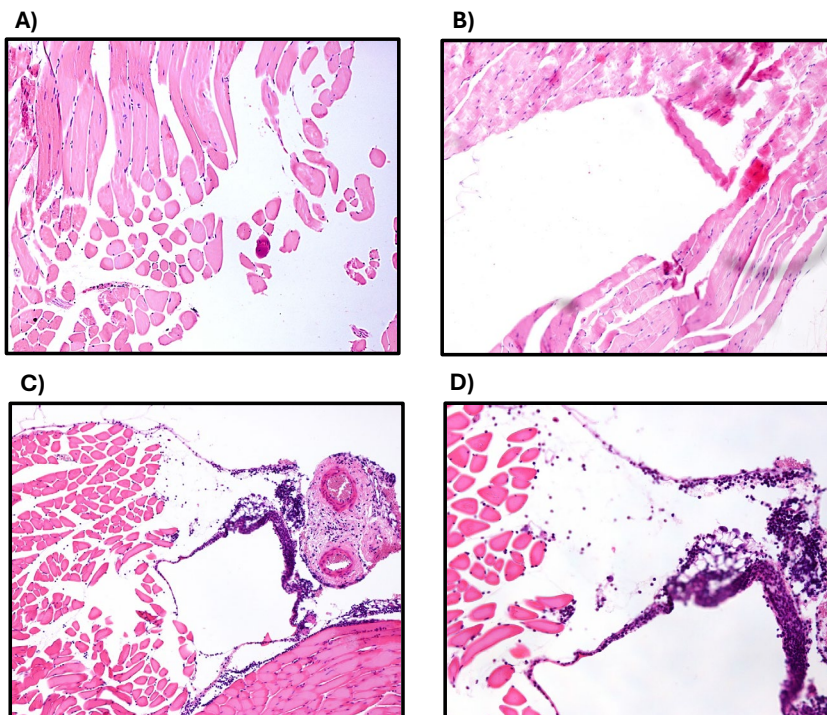


Figura R21: Secciones de tejido muscular de la zona de inyección transcurridas 24 horas, tinción hematoxilina/eosina. Aumento 100X. **A)** Sección histológica de la pata tras la inoculación de PBS. **B)** Corte de la pata tras la inoculación de $Al(OH)_3$. **C)** Sección histológica de la pata tras la inoculación de MSMPs. **D)** Sección histológica de la pata tras la inoculación de MSMPs. Aumento 200X.

4.2. Infiltrado de neutrófilos después de 4 y 24 horas de la inoculación de las MSMPs.

Una vez observada la capacidad de ambos adyuvantes de generar un infiltrado celular en la zona de inyección, decidimos analizar qué células formaban esos infiltrados y si el tipo celular variaba con el transcurso de las horas. Las primeras células que se estudiaron

fueron los neutrófilos, al tratarse de las primeras células del sistema inmunitario en actuar ante la presencia de daño.

La presencia de neutrófilos se estudió mediante la detección de la elastasa, proteasa característica de los neutrófilos, en los cortes adyacentes a los utilizados en el apartado anterior para el estudio *in situ* de los efectos de ambos adyuvantes.

Cuatro horas después de la inoculación de ambos adyuvantes, se observó como el infiltrado generado por MSMPs estaba formado principalmente por neutrófilos (**Figura R22E-F**) y parecía más intenso que el infiltrado generado por hidróxido de aluminio, en el cual también predominaban los neutrófilos (**Figura R22C-D**). Además, como se menciona en el apartado anterior, el infiltrado asociado al hidróxido de aluminio queda restringido a la zona del depósito, mientras que en el caso del producido por las MSMPs esto no ocurría, siendo la extensión de este infiltrado mucho mayor.

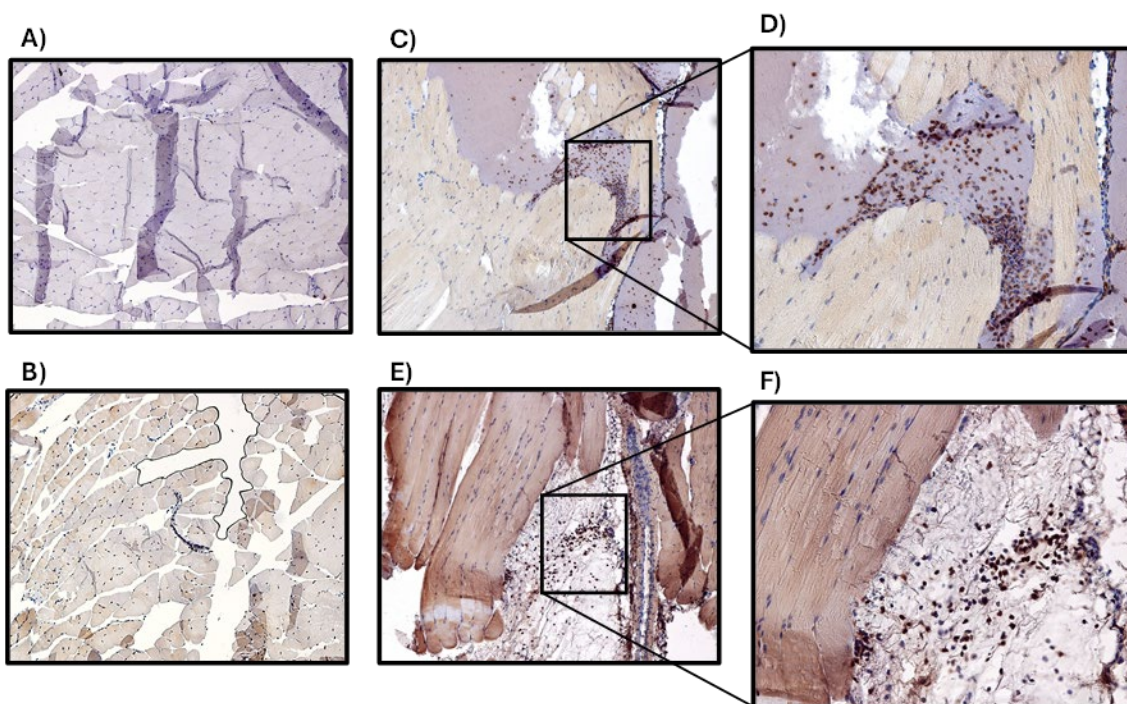


Figura R22: Secciones de tejido muscular de la zona de inyección transcurridas 4 horas, tinción con anti-elastasa. A) Control de isotipo. Aumento 100x. **B)** Sección histológica de la pata tras la inoculación de PBS. Aumento 100x. **C)** Sección histológica de la pata tras la inoculación de $Al(OH)_3$. Aumento 100x. **D)** Sección histológica de la pata tras la inoculación de $Al(OH)_3$. Aumento 200x. **E)** Sección histológica de la pata tras la inoculación de MSMPs. Aumento 100x **F)** Sección histológica de la pata tras la inoculación de MSMPs. Aumento 200x.

RESULTADOS

Como se observa en las tinciones de H/E, después de veinticuatro horas el infiltrado de células asociado al depósito de hidróxido de aluminio (**Figura R23A-B**) desaparecía quedando exclusivamente neutrófilos residuales, mientras que, el infiltrado asociado a las partículas se mantenía. En este caso, tras realizar la tinción frente a elastasa se observó una disminución de la cantidad de neutrófilos en el infiltrado originado por las MSMPs (**Figura R23C-D**).

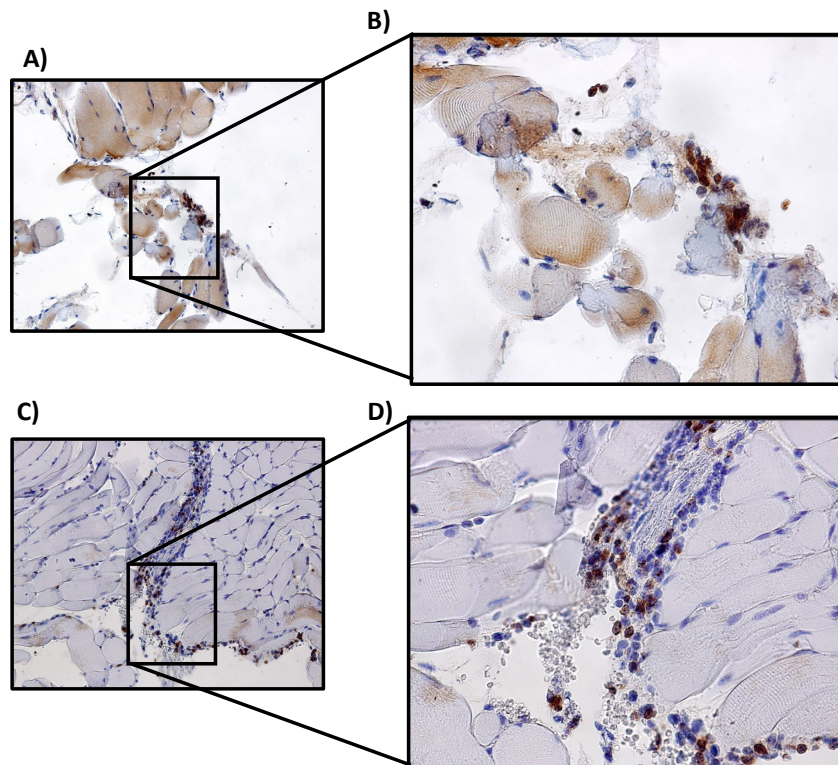


Figura R23: Secciones de tejido muscular de la zona de inyección transcurridas 24 horas, tinción con anti-elastasa. A) Sección histológica de pata tras la inoculación de $Al(OH)_3$. Aumento 200x. **B)** Sección histológica de la pata tras la inoculación de $Al(OH)_3$. Aumento 400x. **C)** Sección histológica de la pata tras la inoculación de MSMPs. Aumento 200x **D)** Sección histológica de la pata tras la inoculación de MSMPs. Aumento 400x.

Además de analizar la presencia de neutrófilos a través de la detección de la elastasa, se quiso corroborar el análisis mediante la detección de la mieloperoxidasa (MPO), enzima presente en los lisosomas de los neutrófilos y la cual es liberada durante la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs). Este marcador también se usará en el siguiente apartado para evaluar la formación de NETs.

Con respecto a la detección de neutrófilos mediante MPO observamos, al igual que con la elastasa, como después de 4 horas tanto el hidróxido de aluminio como las MSMPs generaban un infiltrado de neutrófilos (**Figura R24-R25**).

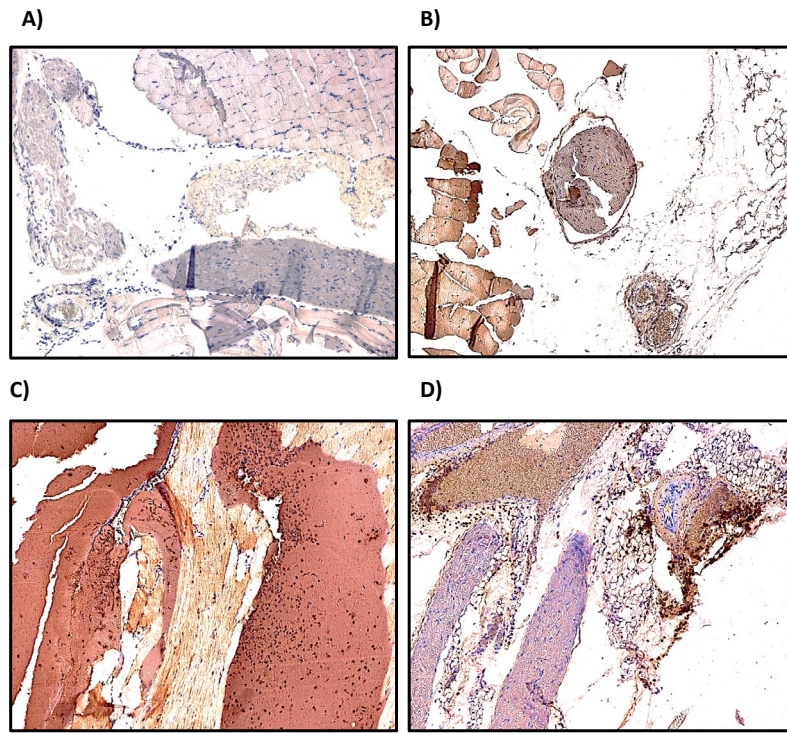


Figura R24: Secciones de tejido muscular de la zona de inyección transcurridas 4 horas, tinción con anti-MPO. Aumento 100x **A)** Control de isotipo del anticuerpo anti-MPO utilizado. **B)** Sección histológica de la pata tras la inoculación de PBS **C)** Sección histológica de la pata tras la inoculación de $Al(OH)_3$. **D)** Sección histológica de la pata tras la inoculación de MSMPs.

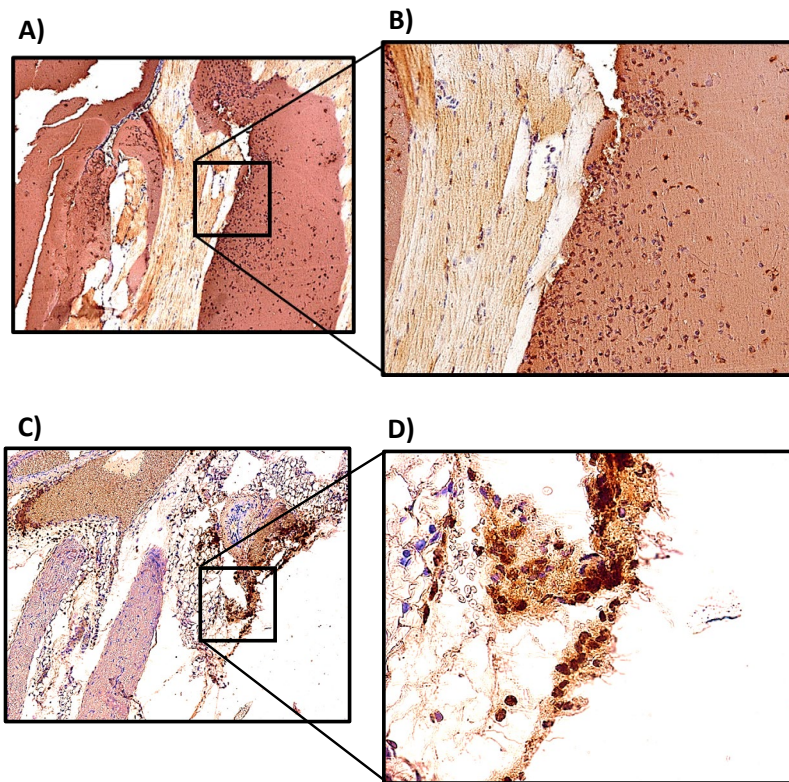


Figura R25: Secciones de tejido muscular de la zona de inyección transcurridas 4 horas, tinción con anti-MPO. **A)** Sección histológica de la pata tras la inoculación de $Al(OH)_3$. Aumento 100x. **B)** Sección histológica de la pata tras la inoculación de $Al(OH)_3$. Aumento 200x. **C)** Sección histológica de la pata tras la inoculación de MSMPs. Aumento 100x. **D)** Sección histológica de la pata tras la inoculación de MSMPs. Aumento 200x.

Después de 24 horas, al igual que se observaba en las tinciones de H/E y en el marcaje con elastasa, el número de neutrófilos que formaban el infiltrado asociado al hidróxido de aluminio disminuía hasta prácticamente desaparecer, dejando algunos neutrófilos residuales (**Figura R26A-B**). Sin embargo, cuando se pasó a analizar el infiltrado asociado a las MSMPs utilizando la MPO como marcador de neutrófilos, se observó un importante marcaje de esta enzima (**Figura R26C-D**), detectando en este caso las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) formadas más que los neutrófilos viables.

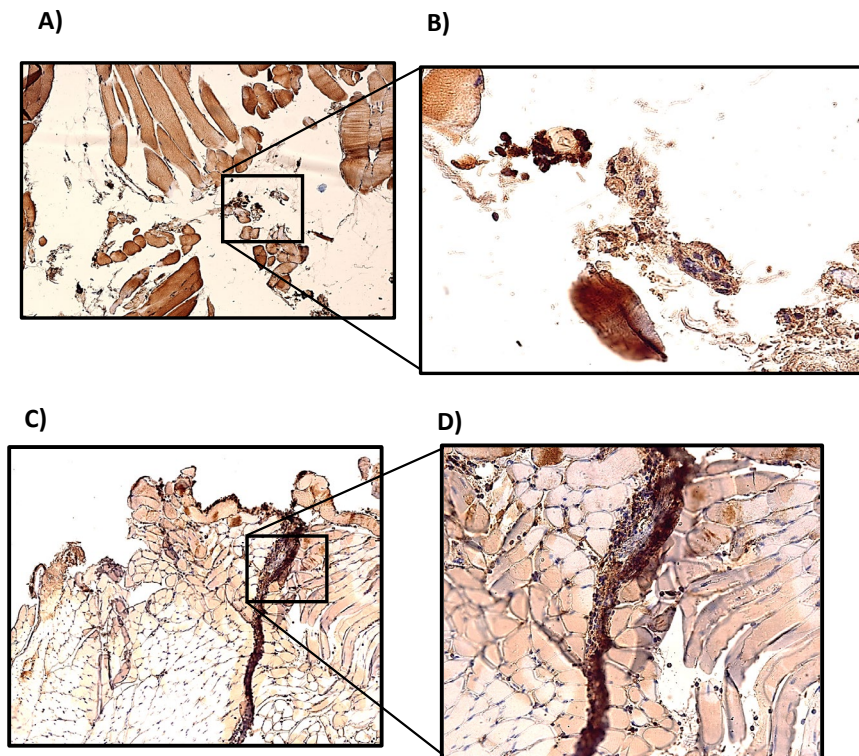


Figura R26: Secciones de tejido muscular de la zona de inyección transcurridas 24 horas, tinción con anti-MPO. A) Sección histológica de la pata tras la inoculación de $Al(OH)_3$. Aumento 100x. **B)** Sección histológica de la pata tras la inoculación de $Al(OH)_3$. Aumento 400x. **C)** Sección histológica de la pata tras la inoculación de MSMPs. Aumento 100x. **D)** Sección histológica de la pata tras la inoculación de MSMPs. Aumento 400x.

4.2.1. Formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) tras la inoculación de MSMPs.

En experimentos preliminares previos, nuestro grupo había mostrado, que las MSMPs eran capaces de inducir la formación de NETs en neutrófilos humanos estimulados *in vitro*. De manera que, quisimos comprobar si las MSMPs eran capaces de inducir este mismo efecto en los neutrófilos, pero en un modelo *in vivo*. Para ello, analizamos mediante inmunohistoquímica, la formación de NETs, a través del marcaje de MPO e histona 3 citrulinada (H3cit), en el sitio de inyección una vez transcurridas 4 y 24 horas de la inoculación de MSMPs y $Al(OH)_3$. Para realizar la tinción de inmunohistoquímica se escogió el corte siguiente al cual se había observado el infiltrado de neutrófilos.

4.2.1.1. Identificación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) a través de la detección de mieloperoxidasa (MPO).

Cuatro horas después de la inoculación del estímulo se observó cómo tanto el hidróxido de aluminio como las micropartículas de silicio mesoporoso fueron capaces de estimular

neutrófilos e inducir en ellos la liberación de MPO al exterior. Esta liberación no se observó en el caso del PBS (**Figura R27**).

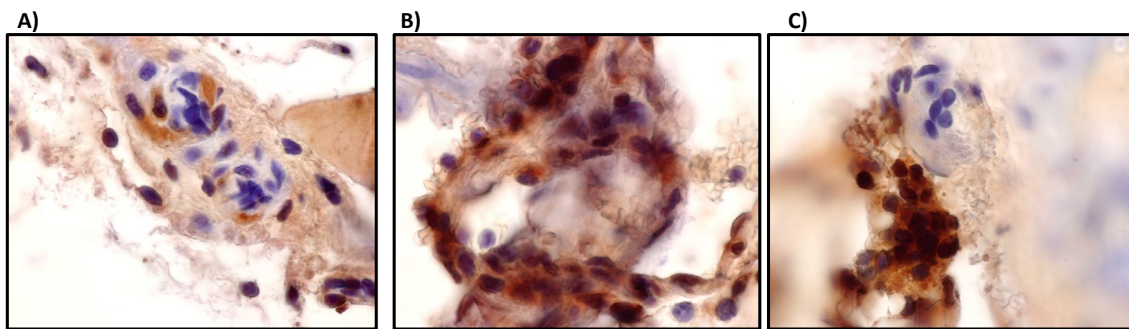


Figura R27: Secciones de tejido muscular de la zona de inyección transcurridas 4 horas de la inoculación de **A)** PBS, **B)** $Al(OH)_3$ y **C)** MSMPs, tinción con anti-MPO. Aumento 1000x.

Después de 24 horas se observó cómo, en el caso del hidróxido de aluminio, las NETs formadas en las zonas donde quedaban neutrófilos residuales eran mínimas (**Figura R28B**). Sin embargo, en el caso de las MSMPs las NETs formadas eran abundantes y de mayor tamaño, mostrándose la capacidad de este material para inducir la formación de NETs (**Figura R28C-D**).

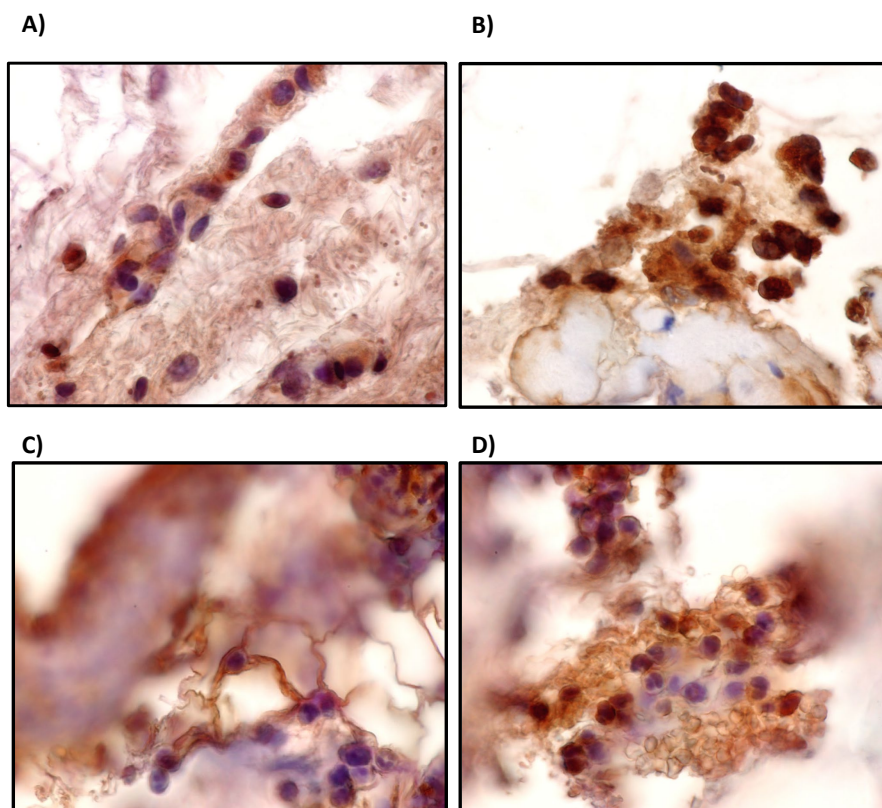


Figura R28: Secciones de tejido muscular de la zona de inyección transcurridas 24 horas de la inoculación de **(A)** PBS, **(B)** $Al(OH)_3$ y **(C-D)** MSMPs, tinción con anti-MPO. Aumento 1000x.

4.2.1.2. Identificación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) a través de la detección de Histona 3 citrulinada (H3cit).

Para corroborar los resultados del apartado anterior se decidió marcar mediante inmunohistoquímica otro componente fundamental de estas trampas extracelulares, la histona 3 citrulinada (H3cit), observándose ciertas diferencias con respecto al marcaje de MPO.

Cuatro horas después de la inoculación se observó un marcaje positivo tanto en el caso del hidróxido de aluminio como en el caso de las MSMPs, pero sin observarse la formación de NETs en el caso del $\text{Al}(\text{OH})_3$ (**Figura R29B**). En el caso de las MSMPs, se observa claramente una liberación extracelular de H3cit a las cuatro horas, pero no se forman esas redes que habíamos observado en el apartado anterior (**Figura R29C**).

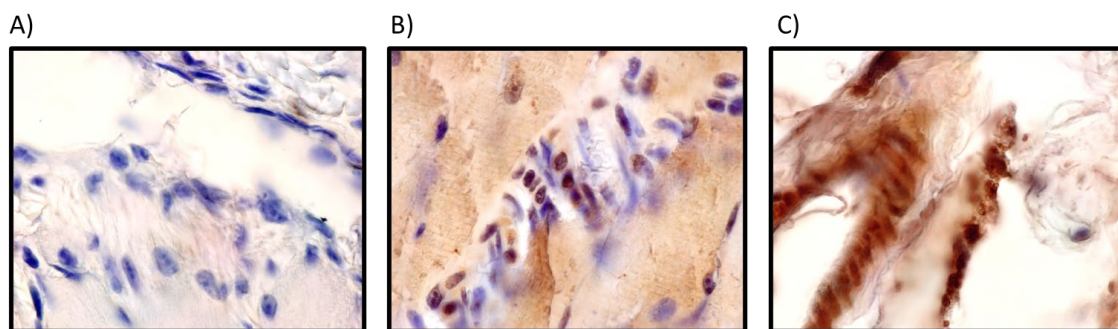


Figura R29: Secciones de tejido muscular de la zona de inyección transcurridas 4 horas de la inoculación del estímulo. **(A)** Control de isotipo. **(B)** $\text{Al}(\text{OH})_3$ y **(C)** MSMPs, tinción con anti-H3cit. Aumento 100x.

Transcurridas 24 horas sí que observamos la formación de redes correspondientes a trampas extracelulares de neutrófilos en el caso de la inoculación de MSMPs (**Figura R30C**), pero no en el caso del hidróxido de aluminio (**Figura R30A**). Estos datos corroboran lo observado tras la tinción de MPO.

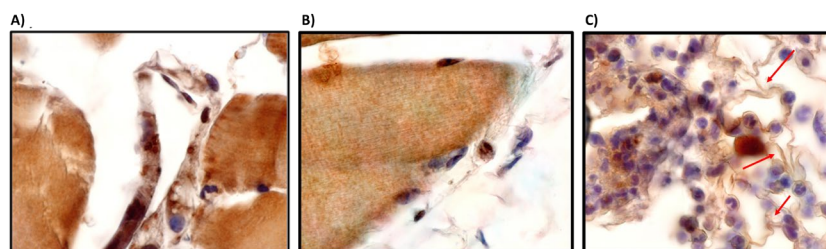


Figura R30: Secciones de tejido muscular de la zona de inyección, teñidas con anti-H3c, transcurridas 24 horas de la inoculación de **(A)** PBS, **(B)** $\text{Al}(\text{OH})_3$ y **(C)** MSMPs. Las flechas rojas muestran las NETs formadas. Aumento 100x.

Además, en el caso de las MSMPs si comparamos la tinción frente a elastasa, mieloperoxidasa e H3cit a las 24 horas observamos ciertas diferencias entre los tres componentes (**Figura R31**), observándose mayoritariamente MPO en la zona del infiltrado y en menor proporción H3cit y elastasa.

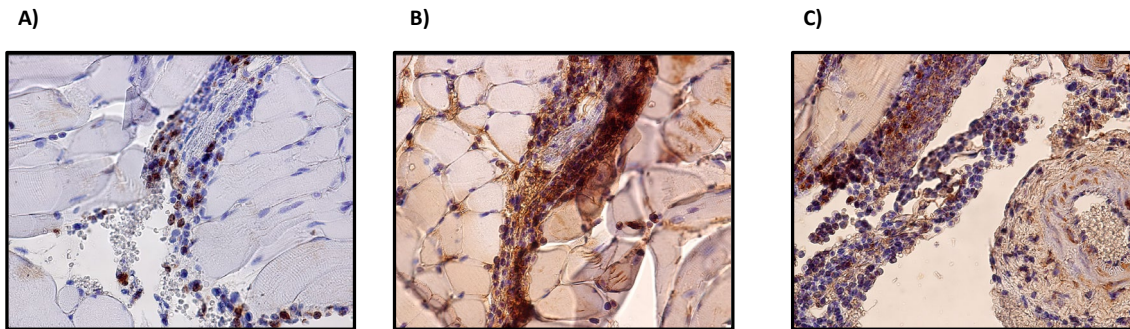


Figura R31: Secciones de tejido muscular de la zona de inyección transcurridas 24 horas de la inoculación de MSMPs. (A) Tinción con anti-elastasa. (B) Tinción con anti-MPO (C) Tinción con anti-H3c. Aumento 400x.

4.3. Análisis histológico de la presencia de macrófagos, células B y T en la zona de inyección 24 horas después de la inoculación de MSMPs.

Como se observa en el apartado anterior, después de 24 horas de la inoculación del estímulo, el infiltrado de células es mayor tras la inoculación de MSMPs en comparación con la inoculación de hidróxido de aluminio. Tras observarse que los neutrófilos no eran el principal componente del infiltrado a las 24 horas, quisimos estudiar qué otras células del sistema inmunitario formaban este infiltrado.

4.3.1. Detección de macrófagos en el sitio de la inyección 24 horas después de la inoculación de MSMPs.

En primer lugar, se estudió la presencia de macrófagos cuatro horas después de la inyección de ambos adyuvantes. La tinción con F4/80 no detectó la presencia de macrófagos en los ratones inoculados con hidróxido de aluminio ni con PBS, mientras que, en el caso de las MSMPs sí que aparecían estas células, aunque en muy baja proporción (**Figura R32**).

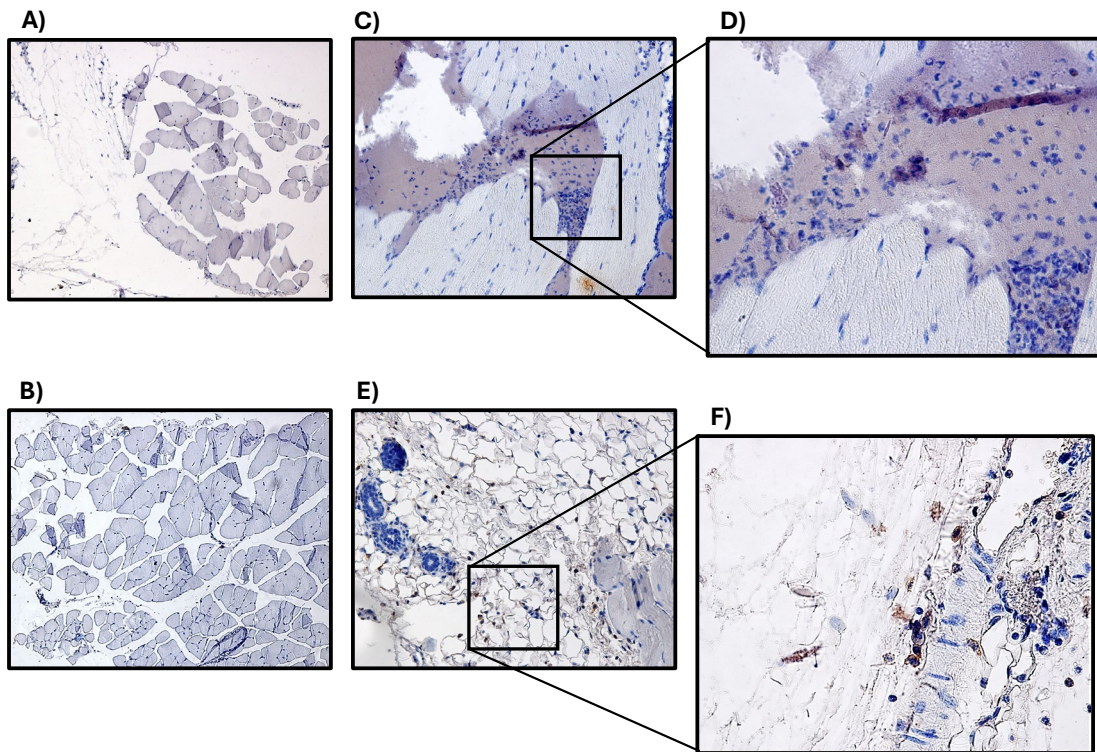


Figura R32: Secciones de tejido muscular de la zona de inyección transcurridas 4 horas, tinción con anti-F4/80. A) Control de isotipo. Aumento 100x. **B)** Sección histológica de la pata tras la inoculación de PBS. Aumento 100x. **C)** Sección histológica de pata tras la inoculación de $Al(OH)_3$. Aumento 200x. **D)** Sección histológica de la pata tras la inoculación de $Al(OH)_3$. Aumento 400x. **E)** Sección histológica de la pata tras la inoculación de MSMPs. Aumento 200x. **F)** Sección histológica de la pata tras la inoculación de MSMPs. Aumento 400x.

En las muestras post 24 horas no se observó un infiltrado significativo de macrófagos en ninguna de las condiciones analizadas (**Figura R33**).

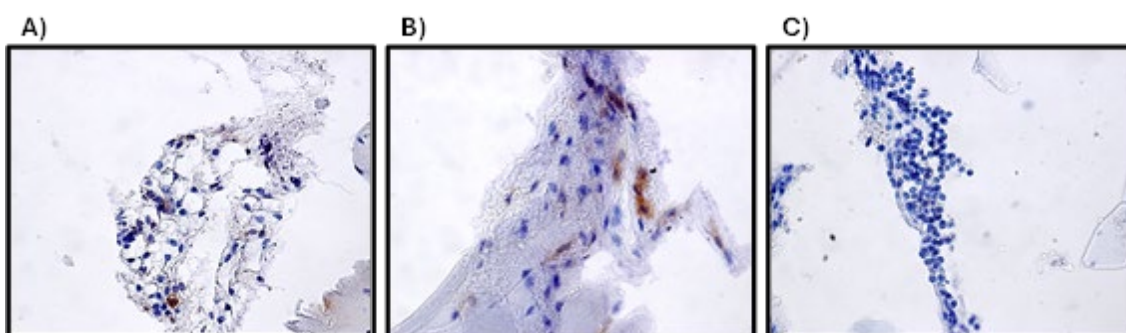


Figura R33: Secciones de tejido muscular de la zona de inyección transcurridas 24 horas, tinción con anti-F4/80. Aumento 400x. A) Sección histológica de la pata tras la inoculación de PBS. **B)** Sección histológica de pata tras la inoculación de $Al(OH)_3$. **C)** Sección histológica de la pata tras la inoculación de MSMPs.

Sin embargo, en un ensayo independiente, 24 horas después de la inoculación de las MSMPs sí que se observó la presencia de macrófagos en el infiltrado (**Figura R34B**).

donde previamente habíamos detectado la presencia de neutrófilos, los cuales a las 24 horas ya habían desaparecido (**Figura R34A**).

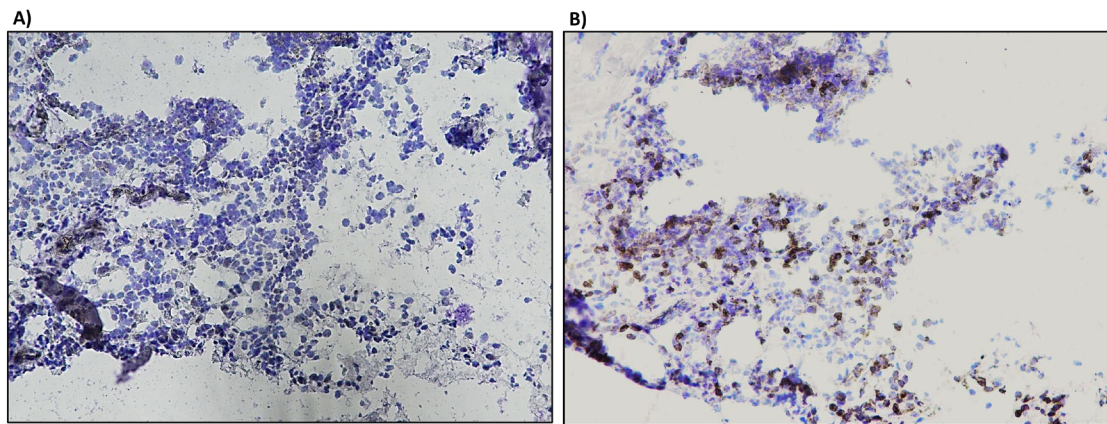


Figura R34: Secciones de tejido muscular de la zona de inyección transcurridas 24 horas. Aumento 200x. **A)** Sección histológica de la pata tras la inoculación de MSMPs, tinción con anti-elastasa. **B)** Sección histológica de pata tras la inoculación MSMPs, tinción con anti-F4/80.

4.3.2. Detección de células B en el sitio de inyección 24 horas después de la inoculación de MSMPs.

A continuación, se analizó la presencia de células B en dichos infiltrados 4 y 24 horas después de la inoculación de los distintos adyuvantes, sin detectar este grupo celular a las cuatro horas, en cualquiera de las condiciones (**Figura R35**).

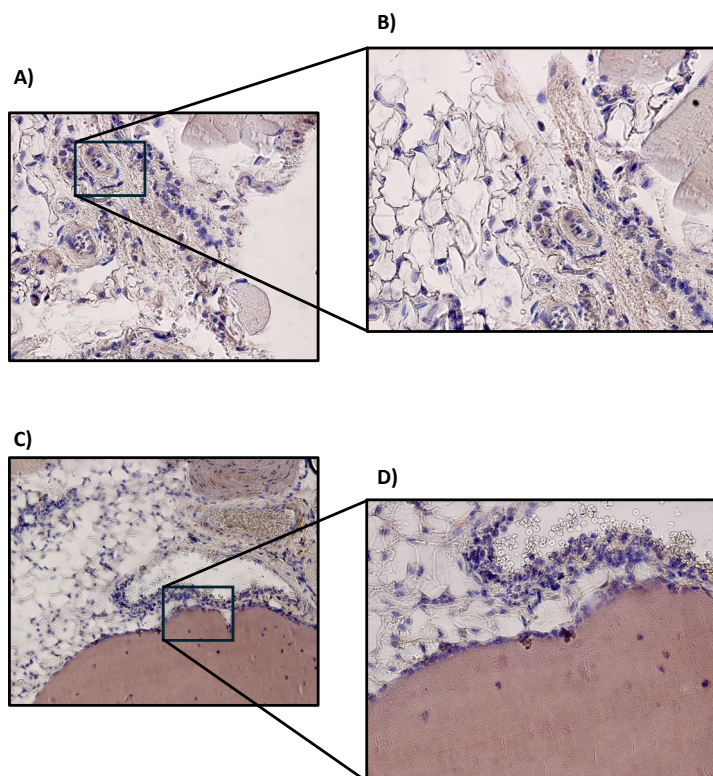


Figura R35: Secciones de tejido muscular de la zona de inyección transcurridas 4 horas. Tinción con anti-CD19. **A)** Sección histológica de pata tras la inoculación de MSMPs. Aumento 200x. **B)** Detalle de sección histológica de la pata tras la inoculación de MSMPs. Aumento 400x. **C)** Sección histológica de la pata tras la inoculación de $Al(OH)_3$. Aumento 200x. **D)** Detalle de sección histológica de la pata tras la inoculación de $Al(OH)_3$. Aumento 400x.

Tras 24 horas se observó, en la pata de ratones inoculados con MSMPs la presencia de células B, aunque no eran mayoritarias y parecían no estar formando parte del infiltrado previamente observado. Sin embargo, en los ratones a los que se inoculó $\text{Al}(\text{OH})_3$ no se observó la presencia de estas células (**Figura R36**).

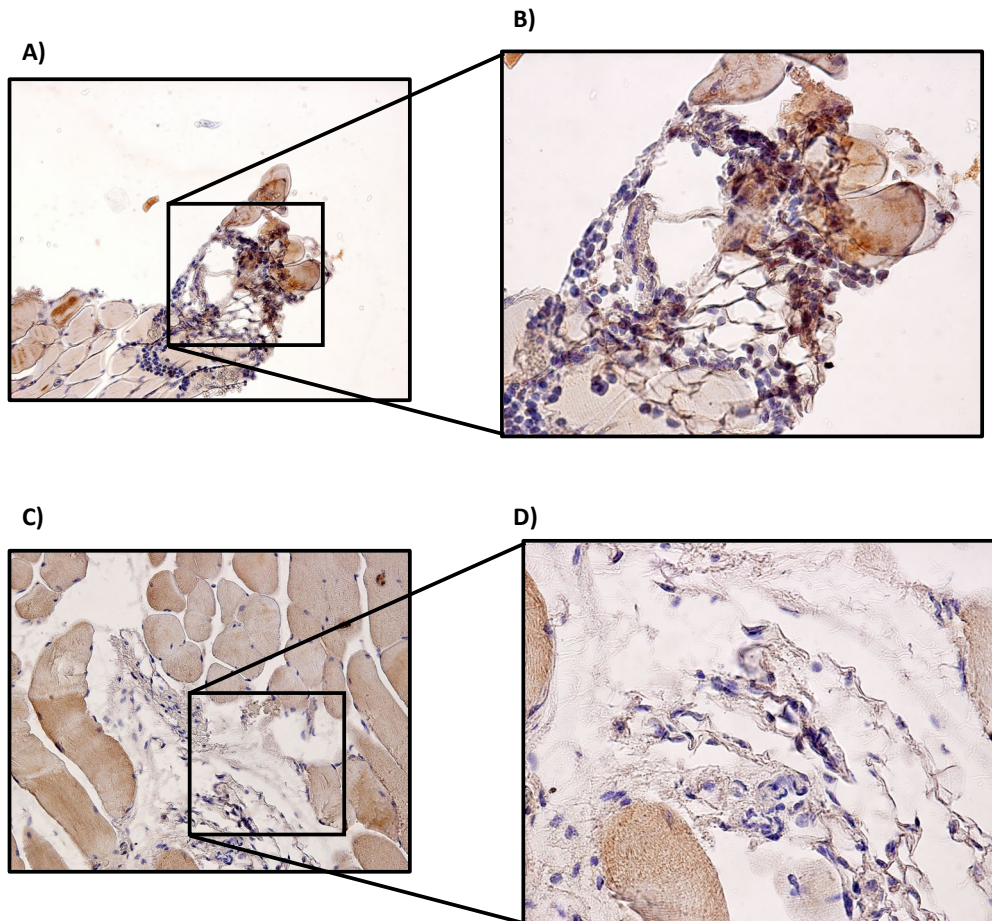


Figura R36: Secciones de tejido muscular de la zona de inyección transcurridas 24 horas, tinción con anti-CD19. A) Sección histológica de pata tras la inoculación de MSMPs. Aumento 200x. **B)** Detalle de la sección histológica de la pata tras la inoculación de MSMPs. Aumento 400x. **C)** Sección histológica de la pata tras la inoculación de $\text{Al}(\text{OH})_3$. Aumento 200x. **D)** Detalle de sección histológica de la pata tras la inoculación de $\text{Al}(\text{OH})_3$ Aumento 400x.

4.3.3. Detección de células T en el sitio de inyección 24 horas después de la inoculación de MSMPs.

Finalmente, se analizó la presencia de células T en el infiltrado 24 horas después de la inoculación de las MSMPs. En este caso, sí que se observó la presencia de estas células el propio infiltrado, en el cual ya habíamos detectado macrófagos (**Figura R37**). La presencia de células T nos indica una posible relación entre MSMPs, neutrófilos y células T.

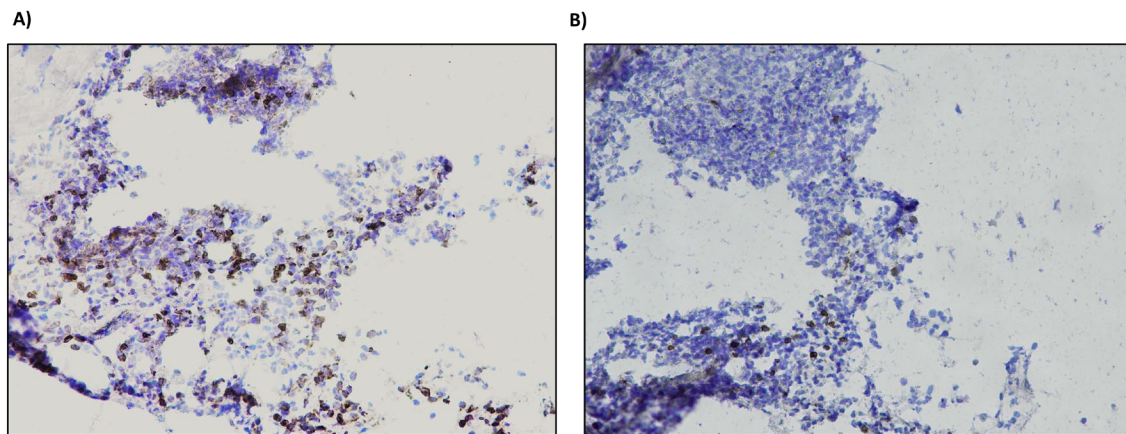


Figura R37: Secciones de tejido muscular de la zona de inyección transcurridas 24 horas. Aumento 200x. A) Sección histológica de la pata tras la inoculación de MSMPs, tinción con anti-F4/80. **B)** Sección histológica de pata tras la inoculación MSMPs, tinción con anti-CD3.

5. Estudio in vivo del papel de los neutrófilos en el desarrollo de la respuesta inmunitaria del complejo MSMPs-S1.

La inyección intramuscular de MSMPs provoca un gran infiltrado de neutrófilos que se asocia en parte, con la aparición de células B y T en el sitio de inyección de forma más tardía. En este trabajo se quiso comprobar el papel de los neutrófilos en la respuesta humoral y celular inducida por MSMPs. Para ello, se utilizó un modelo de ratón transgénico, iDTRMRP8xCRE, que se caracteriza por la expresión del receptor de la toxina diftérica bajo el control del promotor del gen MRP8, gen que se expresa de manera constitutiva en los neutrófilos. La expresión de este receptor permite que, tras la inoculación de la toxina diftérica, se produzca una eliminación temporal de los neutrófilos.

5.1. Depleción de neutrófilos tras una única dosis de toxina diftérica.

En primer lugar, se comprobó la eficiencia de la depleción de los neutrófilos tras la inyección intraperitoneal de una única dosis de toxina diftérica. Después de la inyección se extrajo sangre de los ratones 24 y 48 horas después de la inoculación de la toxina y se analizaron, mediante citometría de flujo, las células Ly6G+, un marcador de neutrófilos murinos (**Figura R38B**).

A las 24h después de la inoculación de la toxina, se observa una drástica disminución de neutrófilos en la sangre de los ratones CRE+. Después de 48 horas post-inyección se observa como el número de células Ly6G+ aumenta en los ratones CRE+, pero sigue

siendo más bajo que en los ratones CRE- (**Figura R38D**). Estos datos fueron fundamentales para establecer el protocolo de inmunización a seguir en estos ratones (**Figura R38A**), manteniéndose las dos inmunizaciones separadas por 30 días, como se hizo en los experimentos anteriores, y suministrando la toxina diftérica 24 horas antes de cada inmunización.

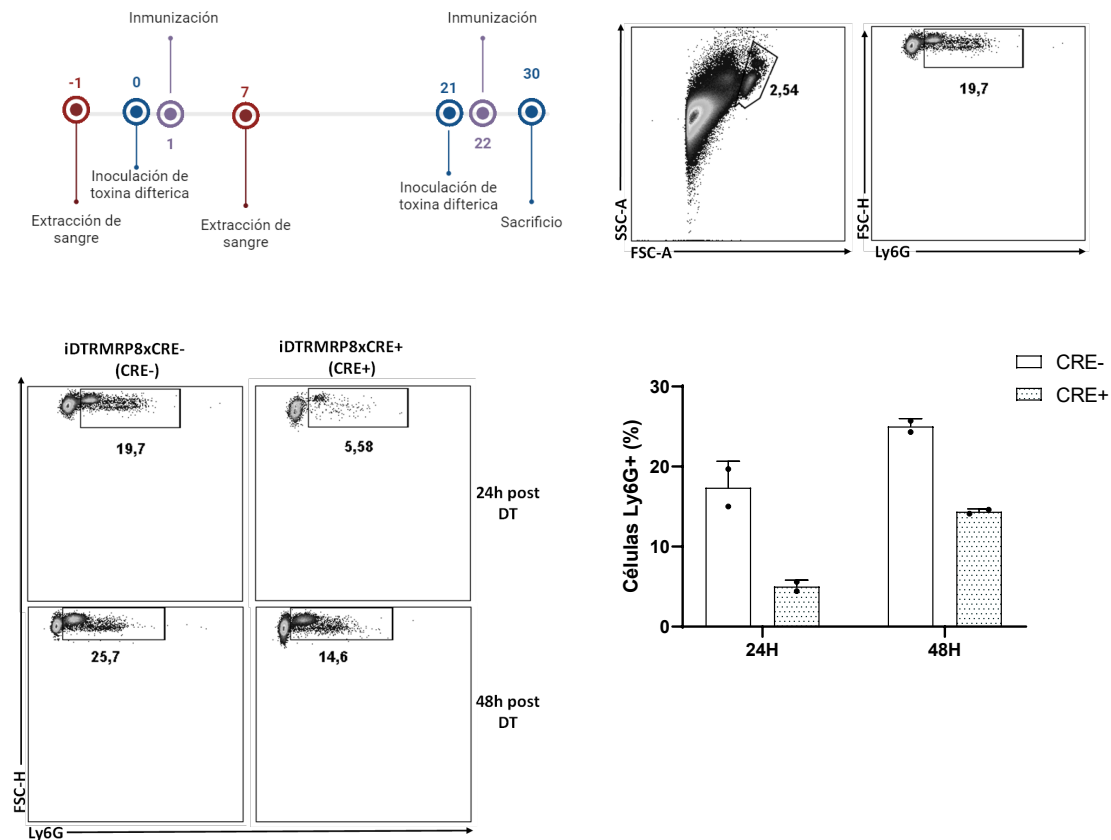


Figura R38: Depleción de neutrófilos en ratones iDTRMRP8xCRE. **A)** Esquema que muestra el protocolo de inmunización y la inoculación de la toxina diftérica seguido en el estudio. **B)** Estrategia de gateo a seguir para el análisis de la depleción de neutrófilos. **C)** Dot plots representativos del análisis de neutrófilos en sangre en ratones iDTRMRP8xCRE. **D)** Porcentaje de células Ly6G+ presentes en sangre periférica en ratones iDTRMRP8xCRE después de 24 y 48 horas de la inoculación de la toxina diftérica. n=2.

5.2. La respuesta humoral de los ratones inmunizados con el complejo MSMPs-S1 es dependiente de neutrófilos.

Los ratones control y deplecionados de neutrófilos fueron inmunizados con el complejo MSMPs-S1 y posteriormente se midió su respuesta IgG1 en suero frente a la región RBD, de la proteína S del virus.

A los 15 días la producción de IgG1 específica era muy baja, tanto en los ratones CRE+ como en los CRE-. Sin embargo, a los 30 días se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos. En este caso se observó que los ratones CRE- inmunizados con ambos adyuvantes tenían un título elevado de IgG1 en sangre, dato que concuerda con los resultados previos de inmunización en ratones BALB/c. Sin embargo, los ratones CRE+ inmunizados con MSMPs-S1 presentaron una respuesta humoral muy reducida. Por otro lado, los ratones CRE+ inmunizados con Al(OH)₃-S1 presentaron una respuesta humoral prácticamente idéntica a la generada por los ratones CRE- que habían sido inmunizados con el mismo complejo (**Figura R39**).

Estos resultados nos muestran que la producción de anticuerpos inducidos por MSMPs es dependiente de neutrófilos, lo que no ocurre en los ratones inmunizados con hidróxido de aluminio.

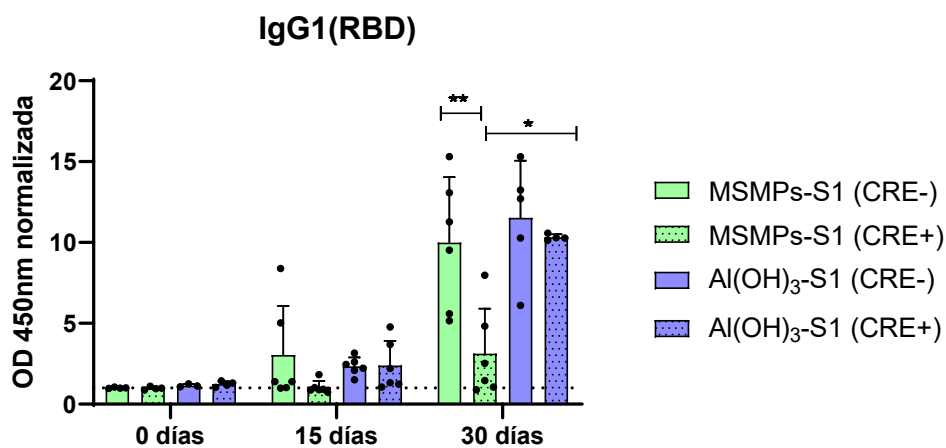


Figura R39: Respuesta humoral frente a RBD, medida como la producción de IgG1, en ratones *iDTRMRP8xCRE* inmunizados con MSMPs-S1 (verde) y Al(OH)₃-S1 (azul) en presencia o ausencia (moteado) de neutrófilos. Los resultados fueron normalizados frente a los datos de PBS. Las diferencias significativas fueron analizadas mediante la prueba Mann-Whitney. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$. $n=6$**

5.3. La respuesta celular de ratones inmunizados con el complejo MSMPs-S1 es dependiente de neutrófilos.

Tras ver que existían diferencias en la respuesta humoral entre ambos adyuvantes cuando se eliminaban los neutrófilos, quisimos estudiar si en la respuesta celular ocurría lo mismo. Para ello, analizamos la producción de IFN- γ por parte de las células CD4 y CD8

estimuladas con péptidos de la proteína S del SARS-CoV-2 y también analizamos posibles cambios fenotípicos del bazo.

Para estudiar la respuesta T específica, se aislaron los esplenocitos de los ratones inmunizados una semana después de la segunda inmunización, y se estimularon *in vitro* con péptidos del SARS-CoV-2 durante 16h, al igual que se hizo para estudiar la respuesta T en ratones BALB/c.

En la **figura R40** se muestra la estrategia de gateo que se siguió para el análisis de la respuesta T junto con dotplots representativos donde se puede observar cómo los ratones CRE+ inmunizados con MSMPs-S1 presentan una respuesta celular disminuida en comparación con los ratones CRE- inmunizados con el mismo complejo.

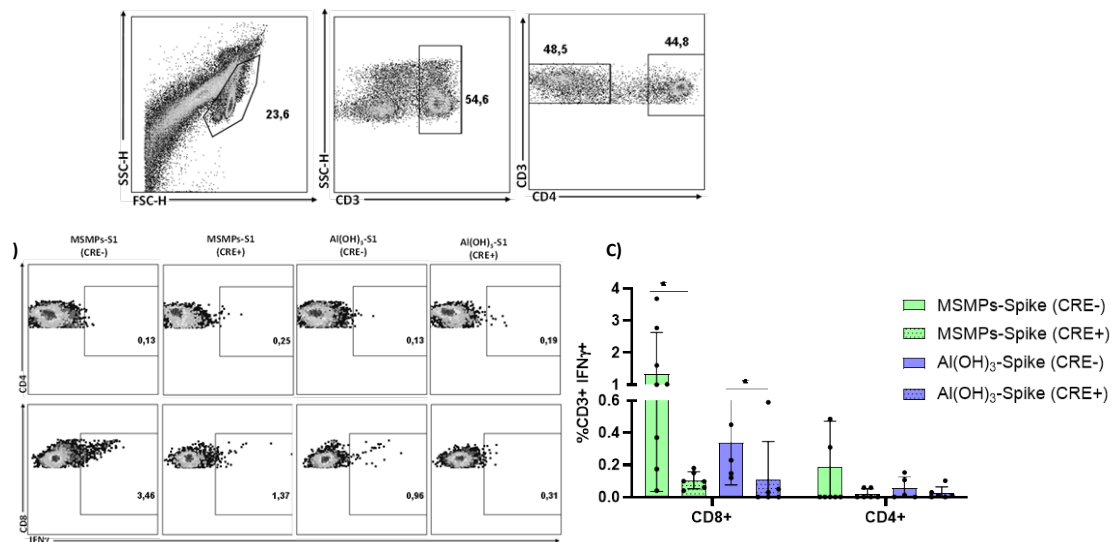


Figura R40: Estudio de la respuesta inmunitaria en ratones *iDTRMRP8xCRE* inmunizados frente al SARS-CoV-2. A) Estrategia de gateo seguida para analizar la producción de IFN- γ en linfocitos T CD4 y CD8 tras estimular los esplenocitos con Peptivator_S durante 16 h *in vitro*. B) Dot plots representativos de la producción de IFN- γ de células T CD4 y CD8 de ratones *iDTRMRP8xCRE* inmunizados de ratones *iDTRMRP8xCRE* inmunizados con MSMPs-S1 y Al(OH)₃-S1. C) Respuesta celular Th1 (producción de IFN- γ) de ratones *iDTRMRP8xCRE* inmunizados con MSMPs-S1 (verde) y Al(OH)₃-S1 (morado). Los resultados muestran la media de los porcentajes (%) obtenidos (normalizados tras restarles la estimulación basal). Las diferencias significativas fueron analizadas mediante la prueba Mann-Whitney. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$. Spike y Al(OH)₃-S1 (CRE-) $n=2$; MSMPs-S1 y Al(OH)₃-S1 (CRE+) $n=6$.**

Nuestros datos mostraron que los ratones inmunizados con Al(OH)₃-S1 presentaban una baja respuesta celular, al igual que ocurría en los ratones BALB/c inmunizados con este complejo. Sin embargo, cuando se pasó a analizar el complejo MSMPs-S1 sí que se

observaron diferencias significativas por parte de las células CD8 entre los ratones que presentaban neutrófilos en el momento de la inmunización (CRE-) y los ratones a los que se les habían eliminado los neutrófilos en ese momento (CRE+), observándose una disminución significativa de la respuesta celular en este último grupo (**Figura R40B y C**).

Estos resultados ponen de manifiesto que los neutrófilos son fundamentales para que las micropartículas de silicio mesoporoso (MSMPs) produzcan una respuesta celular potente frente a la proteína S1. Junto con los resultados de la respuesta humoral, podemos afirmar que la función inmunoestimuladora de las MSMPs es dependiente de neutrófilos.

5.4. Estudio del efecto de la depleción de neutrófilos en las poblaciones de células del bazo de ratones inmunizados con el complejo MSMPs-S1.

Al observar una alteración de la respuesta humoral y celular en los ratones CRE+ que habían sido inmunizados con MSMPs-S1 quisimos estudiar si había cambios estructurales en el bazo que fueran responsables de esta disminución de la respuesta inmunitaria. Para ello analizamos, mediante inmunohistoquímica, el bazo de ratones tanto CRE+ como CRE- que habían sido inmunizados con MSMPs-S1, siete días después de la segunda dosis.

Para este análisis marcamos CD3, B220 y F4/80, marcadores que corresponden con células T, B y macrófagos, respectivamente. Observamos que los bazos de los ratones CRE+ inmunizados con MSMPs-S1 parecían tener un menor número de células B y T (**Figura R41**), lo que podría estar relacionado con la disminución de la respuesta tanto humoral como celular. Además, se analizó el peso y el tamaño de los bazos observándose que no había diferencia en estos parámetros entre los distintos grupos (datos no mostrados)

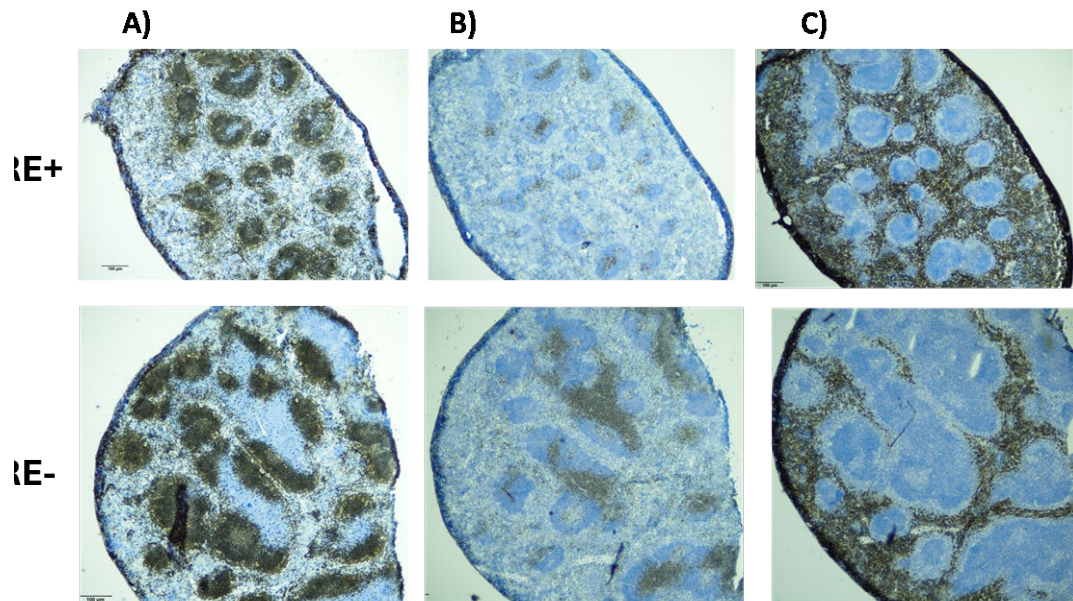


Figura R41: Secciones del bazo de ratones inmunizados con MSMPs-S1. Aumento 200x. Se muestra la población de células B220 (A), CD3 (B) y F4/80 (C) en ratones CRE+ (1) y CRE- (2).

Posteriormente quisimos saber si estas diferencias cualitativas que se observaban por inmunohistoquímica se observaban también cuantitativamente por citometría de flujo. Para ello determinamos el número total de células B y T y obtuvimos unos resultados similares, observando, de nuevo, una disminución en el número total de células CD3+, CD4+, CD8+ y células CD19+ en ratones CRE+ inmunizados con MSMPs-S1, en comparación con los ratones CRE- inmunizados con el mismo complejo. En el caso del hidróxido de aluminio no se observaron diferencias en el número de células entre la presencia y ausencia de neutrófilos en el momento de la inmunización (**Figura R42**).

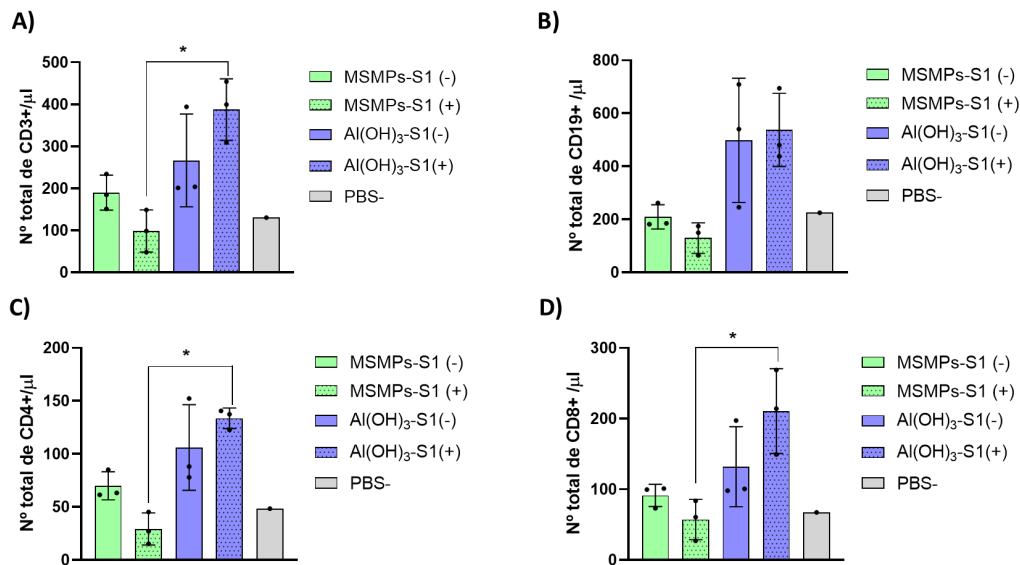


Figura R42: Análisis mediante citometría de flujo de las poblaciones (A) CD3+, (B) CD19+, (C) CD4+ y (D) CD8+ presentes en el bazo de ratones CRE+ (moteado) y CRE- (liso) inmunizados con MSMPs-S1 (verde), Al(OH)₃-S1 (morado) y PBS (gris). Las diferencias significativas fueron analizadas mediante la prueba Kruskal-Wallis. *p < 0,05, **p < 0,01, *p < 0,001 n=3.**

Los resultados observados en los diferentes modelos animales nos muestran que las micropartículas de silicio mesoporoso (MSMPs) son capaces de estimular la respuesta inmunitaria adaptativa, tanto celular como humoral, y generar una potente protección frente a la infección. Además, los resultados obtenidos en el modelo de ratón iDTRMRP8xCRE, nos indica que la respuesta inmunitaria inducida por las MSMPs es dependiente de neutrófilos, a diferencia de la respuesta inducida por el hidróxido de aluminio (Al(OH)₃-S1).

6. La estimulación de la respuesta inmunitaria inducida por la MSMPs parece ser dependiente de MyD88.

Para estudiar el mecanismo de acción de las MSMPs decidimos analizar el posible papel de la proteína adaptadora MyD88, utilizando el modelo de ratón Knock-out MyD88 (KO MyD88). Para ello, llevamos a cabo un experimento preliminar en el que se inmunizaron ratones KO y ratones WT tanto con MSMPs-S1 como con Al(OH)₃-S1, siguiendo el mismo protocolo de inmunización que en los ensayos previos (**Figura R43A**).

6.1. Ratones KO MyD88 inmunizados con MSMPs-S1 presentan una respuesta humoral disminuida.

Para estudiar la respuesta humoral se analizó la producción de IgG1 frente a la proteína S1 en ratones WT y KO inmunizados con MSMPs-S1 y con Al(OH)₃-S1. (**Figura R43B**).

Con respecto a los ratones KO inmunizados con Al(OH)₃-S1 observamos una producción de IgG1 elevada después de la segunda dosis (37 días) y a falta de los datos de inmunización de ratones WT (C57BL/6, mismo fondo genético que los ratones KO MyD88) con este complejo, la deficiencia de MyD88 parece no afectar a la producción de anticuerpos inducida por el complejo Al(OH)₃-S1. Los ratones WT inmunizados con MSMPs-S1 responden de forma similar, sin embargo, los ratones KO MyD88 muestran una respuesta humoral muy deficiente tras la inmunización con nuestro complejo vacunal.

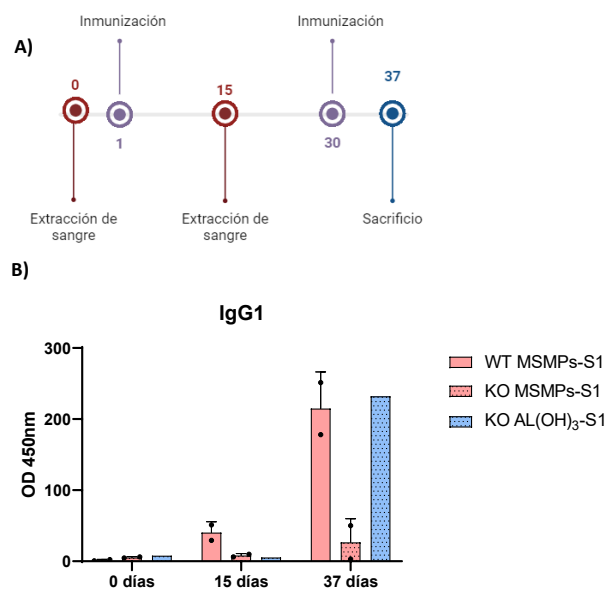


Figura R43: Estudio de la respuesta humoral en ratones KO MyD88 inmunizados frente al SARS-CoV-2. **A)** Esquema que muestra el protocolo de inmunización seguido en el estudio. **B)** Respuesta humoral, medida mediante ELISA como producción de IgG1 en ratones KO Myd88 (moteado) y WT C57BL/6 (liso) inmunizados con MSMPs-S1 (rosa) (n=2) y Al(OH)₃-S1 (azul) (n=1) después de 15 y 37 días de la primera dosis.

6.2. Ratones KO MyD88 inmunizados con MSMPs-S1 presentan una respuesta celular disminuida.

Tras comprobar que la eliminación de MyD88 condicionaba la respuesta humoral inducida por las MSMPs quisimos estudiar si la respuesta celular, que previamente

habíamos visto, también se veía alterada. Para ello se estimularon los esplenocitos tanto de ratones KO MyD88 como de ratones WT C57BL/6, inmunizados con los distintos complejos, con péptidos del SARS-CoV-2 y se analizó la producción de IFN- γ siguiendo la estrategia de gateo mostrada en la **figura R44A**. En primer lugar, observamos como los ratones KO MyD88 presentaban una activación basal elevada, analizada como producción de IFN- γ , situación que no se observaba en los ratones WT (**Figura R44B**).

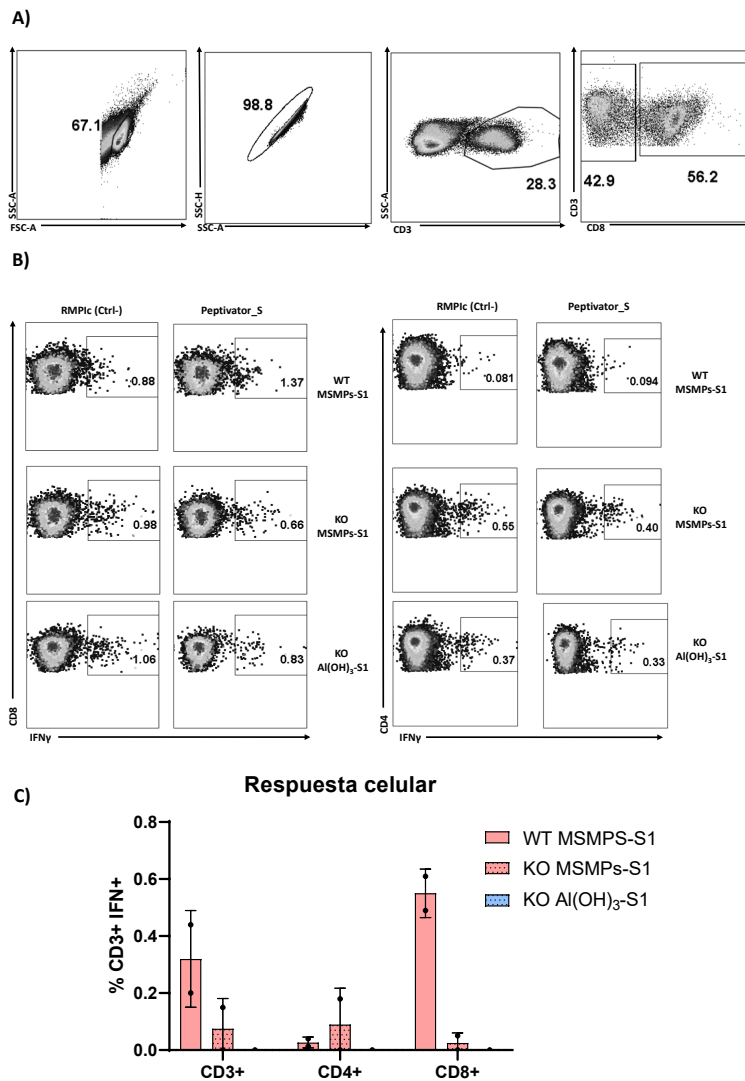


Figura R44: Estudio de la respuesta celular in vitro en respuesta al Peptivator_S en ratones KO MyD88 inmunizados frente al SARS-CoV-2. A) Estrategia de gateo seguida para analizar la producción de IFN- γ linfocitos T CD4 y CD8 tras estimular los esplenocitos de los diferentes grupos de ratones durante 16 h in vitro. B) Dot plots representativos de la producción de IFN- γ de células T CD4- y CD8 de ratones KO MyD88 inmunizados con MSMPs-S1 y Al(OH)₃-S1. C) Respuesta celular Th1 (producción de IFN- γ) en los distintos grupos de ratones KO MyD88 (moteado) y WT (liso) inmunizados con MSMPs-S1 (rosa) y Al(OH)₃-S1 (azul) por parte de células CD3+, CD4+ y CD8+. Los resultados muestran la media de los porcentajes (%) obtenidos (normalizados tras restarles la estimulación basal). Las diferencias significativas fueron analizadas mediante la prueba Mann-Whitney. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$.**

Tras el análisis de la respuesta celular, restando a cada condición la producción de IFN- γ obtenida tras estimular con RPMIc (activación basal), observamos como los ratones KO inmunizados con MSMPs-S1 presentaban una baja respuesta celular, en comparación con los ratones WT inmunizados con el mismo complejo. En el caso de los ratones KO inmunizados con Al(OH)₃-S1 su respuesta celular era nula, al igual que lo observado previamente en ratones BALB/c inmunizados con el mismo complejo (**Figura R44C**).

7. La estimulación de la respuesta inmunitaria inducida por las MSMPs parece ser independiente de TLR4.

Tras comprobar que la respuesta humoral y celular inducida por MSMPs era dependiente de MyD88, se quiso conocer más a fondo el mecanismo de acción de este material. Para ello se comenzó a estudiar a través de qué TLR podrían estimular las MSMPs a las células presentadoras. Se comenzó estudiando la posible interacción de MSMPs a través de TLR4, usando un modelo de ratón KO TLR4 y siguiendo el mismo protocolo de inmunización que en ensayos anteriores (**Figura R45A**).

7.1. La respuesta humoral inducida por MSMPs es independiente de TLR4.

Al igual que en apartados anteriores, se comenzó estudiando la respuesta humoral, medida como producción de IgG1, en ratones KO TLR4 y WT inmunizados con ambos complejos vacunales.

Quince días después de la primera dosis observamos como todos los ratones inmunizados, independientemente del complejo vacunal, presentan una producción de IgG1 superior a la de los ratones inmunizados con PBS. De la misma manera, se observa como 37 días después de la primera dosis, los niveles de IgG1 en sangre habían aumentado sin observarse diferencias entre los ratones KO y los ratones WT inmunizados con los distintos complejos vacunales. Con estos resultados podemos concluir que la respuesta humoral inducida por MSMPs no es dependiente de TLR4 (**Figura R45B**).

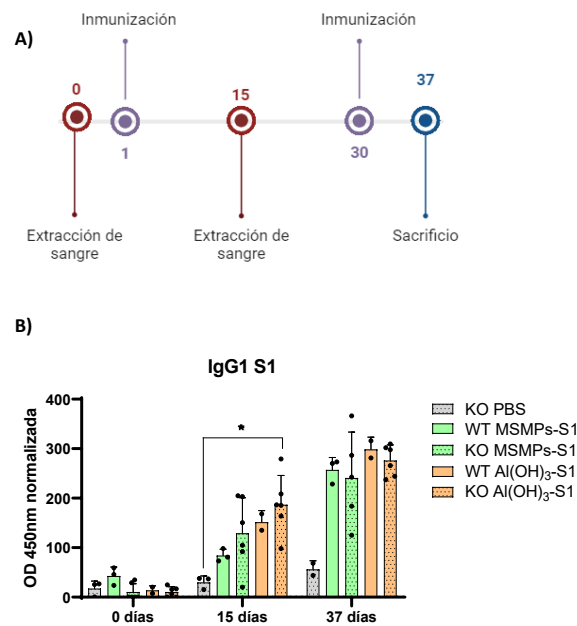


Figura R45: Estudio de la respuesta humoral en ratones KO TLR4 inmunizados frente al SARS-CoV-2. A) Esquema que muestra el protocolo de inmunización seguido en el estudio. **B)** Respuesta humoral, medida mediante ELISA como producción de IgG1 en ratones KO TLR4 (moteado) (n=6) y WT C57BL/6 (liso) (n=3) inmunizados con PBS (gris) (n=3), MSMPs-S1 (verde) y Al(OH)₃-S1 (naranja) después de 15 y 37 días de la primera dosis. Las diferencias significativas fueron analizadas mediante la prueba Mann-Whitney. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

7.2. La respuesta celular inducida por MSMPs es independiente de TLR4.

Comprobada la independencia de la respuesta humoral inducida por MSMPs de TLR4 se quiso estudiar si ocurría lo mismo con la respuesta celular. Para realizar este análisis se aislaron los esplenocitos de ratones KO y WT inmunizados con ambos complejos siete días después de la última dosis y se analizó la respuesta celular, medida como producción de IFN- γ , tras 16 horas de estimulación con péptidos del SARS-CoV-2, siguiendo la misma estrategia de gateo que en apartados anteriores.

Como esperábamos, al igual que ocurría con la respuesta humoral, la respuesta celular de los ratones KO inmunizados con nuestro complejo vacunal no se vio alterada (**Figura R46**). A pesar de la dispersión de los datos se observó cómo los ratones KO inmunizados con MSMPs-S1 presentaban una respuesta celular prácticamente idéntica a la presentada por los ratones WT inmunizados con el mismo complejo. Además, se vio una vez más, como los ratones inmunizados con Al(OH)₃-S1 presentaban una menor respuesta que los ratones inmunizados con nuestro complejo vacunal, volviéndose a demostrar la diferencia entre ambos entornos a la estimulación de la respuesta celular.

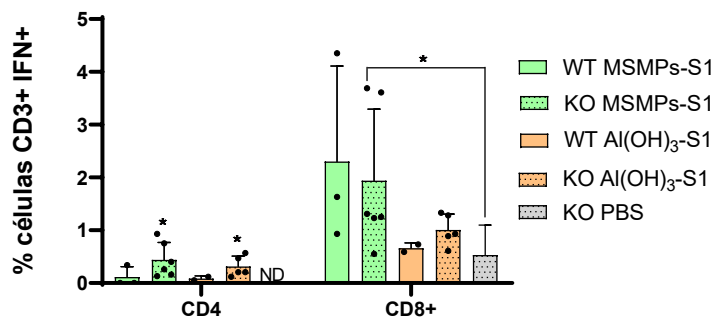
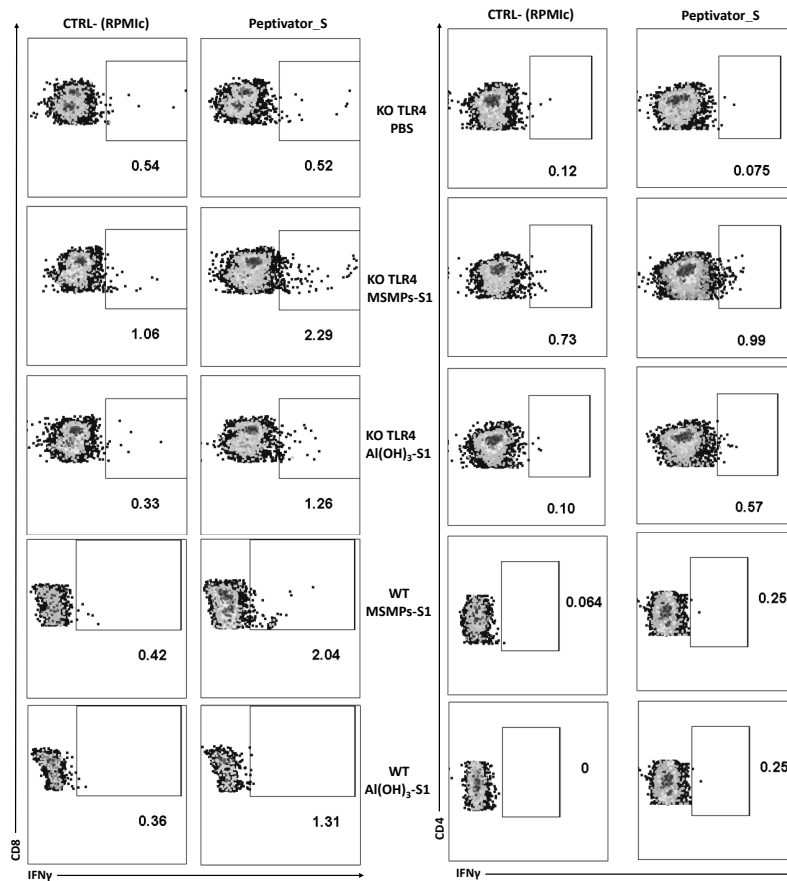


Figura R46: Estudio de la respuesta celular in vitro en respuesta al Peptivator_S en ratones KO TLR4 inmunizados frente al SARS-CoV-2. A) Dot plots representativos de la producción de IFN- γ de células T CD4- y CD8 de ratones KO TLR4 inmunizados con MSMPs-S1 y Al(OH)₃-S1. B) Respuesta celular Th1 (producción de IFN- γ) en los distintos grupos de ratones KO TLR4 (moteado) y WT (liso) inmunizados con PBS (gris) MSMPs-S1 (verde) y Al(OH)₃-S1 (naranja) por parte de células CD4 y CD8. Los resultados muestran la media de los porcentajes (%) obtenidos (normalizados tras restarles la estimulación basal). Las diferencias significativas fueron analizadas mediante la prueba Mann-Whitney. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$.**

8. Estudio *in vitro* de la respuesta de neutrófilos humanos frente a MSMPs.

Para estudiar el efecto de las micropartículas de silicio mesoporoso sobre los neutrófilos humanos se estimularon dichas células con MSMPs durante 1 y 3 horas, analizándose la endocitosis, la producción de NETs y la producción de MPO mediante diferentes técnicas.

8.1. Los neutrófilos humanos endocitan a las MSMPs.

Aunque ya se había demostrado la capacidad de los neutrófilos para endocitar partículas en un modelo animal *in vivo*, se quiso corroborar esta capacidad de endocitosis mediante modelos humanos *in vitro*.

Para este estudio se marcaron las MSMPs con FITC y luego se cultivaron los neutrófilos con MSMPs-FITC durante 1 y 3 horas. Después de 1 hora de incubación, las MSMPs parecían encontrarse en el interior de las células, sin que estas hubiesen perdido su viabilidad. En la **figura R47** observamos en azul el núcleo de los neutrófilos y en verde las MSMPs marcadas con FITC. Como se observa en el “merge” de esta figura las MSMPs aparecen en el interior de las células.

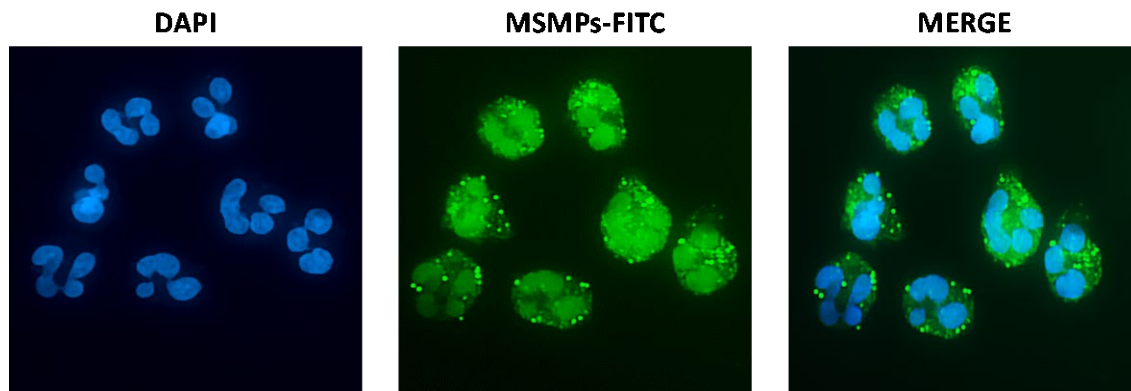


Figura R47: Estudio de la endocitosis de las micropartículas de silicio mesoporosas por parte de neutrófilos humanos después de 1 hora de estimulación mediante microscopia de fluorescencia. Las MSMPs se encuentran marcadas con FITC (verde) y los núcleos están marcados con DAPI (azul).

Sin embargo, mediante microscopia de fluorescencia no se puede determinar de forma inequívoca si las MSMPs se encuentran en el interior del neutrófilo o sobre él, para corroborarlo se analizan los diferentes planos focales o “stacks” mediante microscopia confocal. Como se observa en la **figura R48**, es en el “stack” intermedio donde se aprecia, principalmente, la presencia de MSMPs, lo que nos demuestra que las MSMPs han sido endocitadas por neutrófilos.

Aparte de la endocitosis, en esta figura se puede observar cómo tras 1 y 3 horas de estimulación de los neutrófilos, estos liberan al exterior MPO (marcada en Alexa fluor 594) indicándonos la presencia de NETs, lo cual se abordará más adelante. Además, se observa como los núcleos de los neutrófilos (marcados con DAPI) pierden su morfología clásica debido a la propia estimulación y a la formación de esas trampas extracelulares de neutrófilos. Todos estos datos demuestran que las MSMPs han sido endocitadas por neutrófilos humanos, confirmando lo observado previamente en los modelos animales *in vivo*.

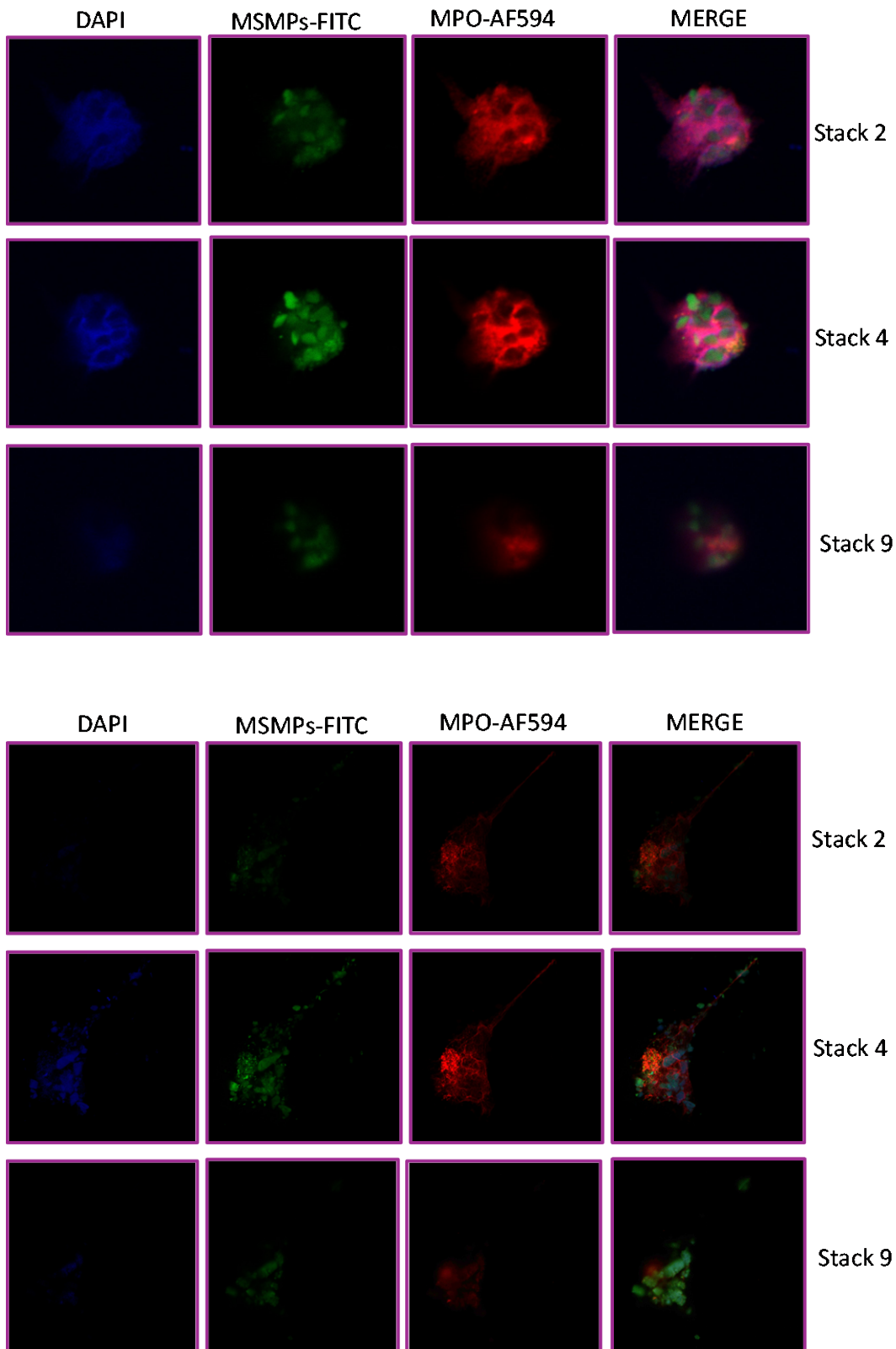


Figura R48: Estudio de la producción de NETs y le endocitosis mediante microscopía confocal. A) Staks de un neutrófilo después de haber sido estimulado durante 1 hora con MSMPs. **B)** Staks de un neutrófilo después de haber sido estimulado durante 3 horas con MSMPs. Mieloperoxidasa marcada con Alexa fluor 594 (rojo), núcleos marcados con DAPI (azul) y MSMPs marcadas con FITC (verde)

8.2. Producción de NETs tras la estimulación con MSMPs-FITC.

Una vez demostrado que los neutrófilos endocitan las MSMPs decidimos analizar si estas pudieran inducir la producción de NETs. Para ello incubamos los neutrófilos humanos con MSMPs durante 1 y 3 horas.

En primer lugar, se corroboró, mediante microscopia de fluorescencia, como, tras una hora de estimulación los neutrófilos son capaces de endocitar las MSMPs, como ya se mencionó en el apartado anterior, aunque estas parecen no inducir la formación de NETs (**Figura R49A**). Sin embargo, después de tres horas se observó cómo los neutrófilos formaban esas NETs perdiendo en muchos casos su propia morfología. Además, observamos como los NETs inducidos por las MSMPs son muy similares en abundancia a los NETs inducidos por PMA llegando a ser incluso de mayor tamaño que los formados por este control positivo (**Figura R49B**).

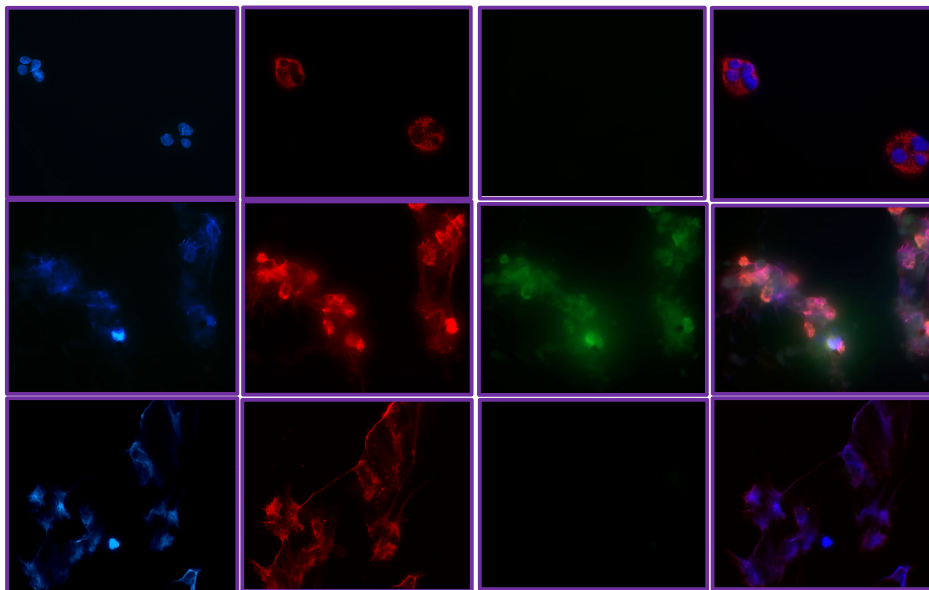
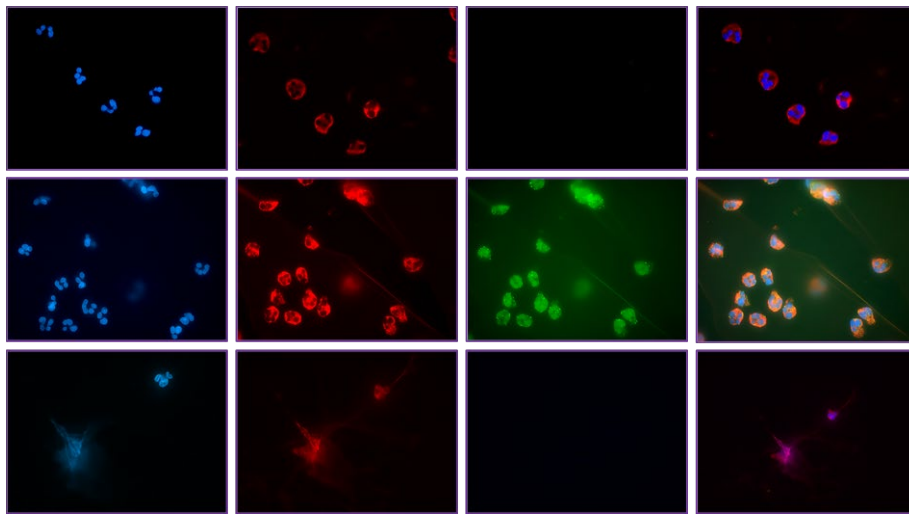


Figura R49: Estudio de la producción de NETs mediante inmunofluorescencia. A) Producción de NETs por parte de neutrófilos humanos estimulados con MSMPs durante 1 hora. **B)** Producción de NETs por parte de neutrófilos humanos estimulados con MSMPs durante 3 horas. Mieloperoxidasa marcada con Alexa fluor 594 (rojo), núcleos marcados con DAPI (azul) y MSMPs marcadas con FITC (verde)

Mediante microscopia confocal comprobamos como las MSMPs formaban agregados y estos agregados atraían a un mayor número de neutrófilos. El tamaño de los agregados que formaban las propias partículas condicionaba el tamaño de las NETs. De tal forma que, cuanto mayor era el tamaño del agregado, mayor era el número de neutrófilos que se congregaban a su alrededor y mayor era la NET formada. **(Figura R50).**

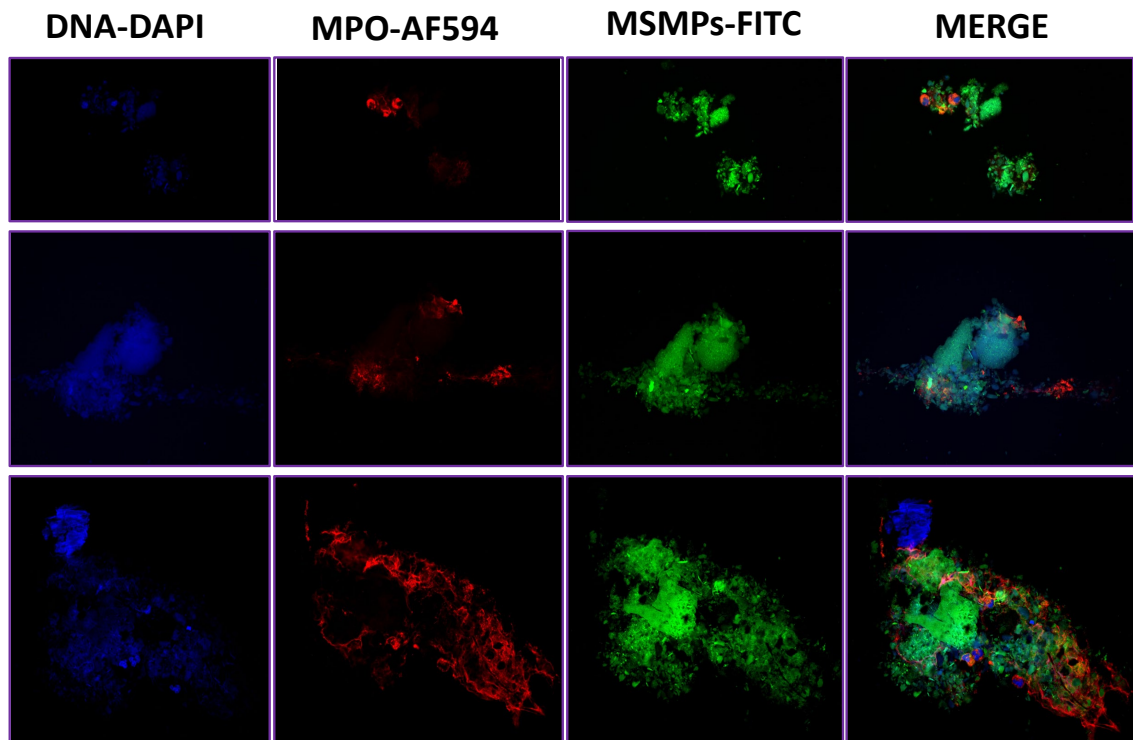


Figura R50: Estudio de la producción de NETs mediante microscopia confocal en función del tamaño del agregado. Neutrófilos estimulados durante 3 horas con MSMPs. De arriba abajo se observa cómo el tamaño de la NET formada es proporcional al agregado de MSMPs presente alrededor de los neutrófilos. Mieloperoxidasa marcada con Alexa fluor 594 (rojo), núcleos marcados con DAPI (azul) y MSMPs marcadas con FITC (verde).

De la misma manera, mediante microscopia confocal, se comprobó como el hidróxido de aluminio no era capaz de inducir la formación de NETs en neutrófilos estimulados *in vitro* tras 1 hora (**Figura R51**). Sin embargo, tras 3 horas de estimulación sí que observamos la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (**Figura R51**), pero de menor tamaño y en menor proporción que las observadas tras la estimulación con MSMPs. Con estos resultados *in vitro* corroboramos los resultados obtenidos *in vivo* en el análisis histológico demostrándose que en neutrófilos humanos y murinos las MSMPs tienen una mayor capacidad para inducir la formación de NETs que el $Al(OH)_3$.

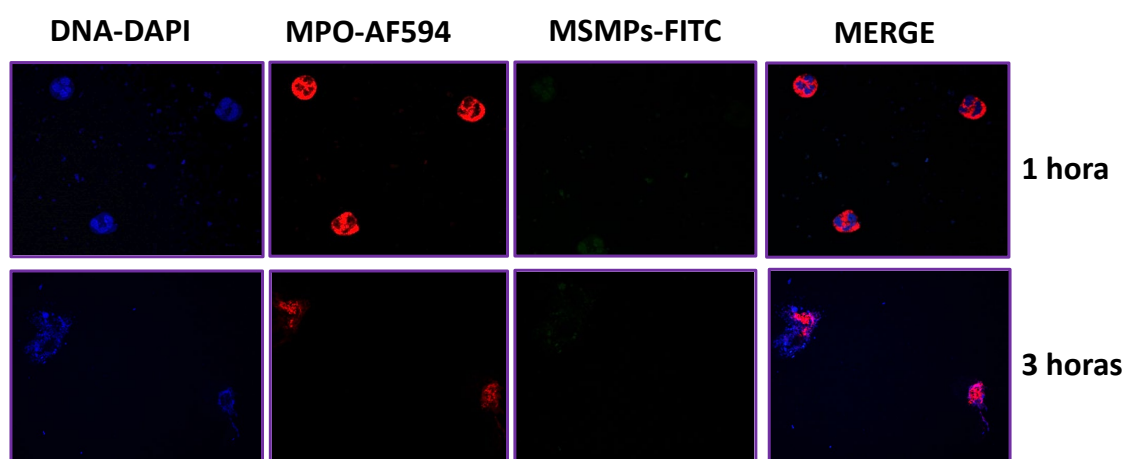


Figura R51: Estudio de la producción de NETs, mediante microscopia confocal, tras la estimulación *in vitro* de neutrófilos humanos con $Al(OH)_3$ durante 1 y 3 horas. Mieloperoxidasa marcada con Alexa fluor 594 (rojo), núcleos marcados con DAPI (azul) y MSMPs marcadas con FITC (verde).

8.3. Los neutrófilos humanos estimulados con MSMPs liberan MPO al medio.

Posteriormente quisimos evaluar cuantitativamente si las MSMPs inducían una mayor liberación de MPO que el hidróxido de aluminio. Para ello recogimos el sobrenadante de neutrófilos estimulados con ambos adyuvantes durante 1 y 3 horas y medimos la liberación de MPO por ELISA, utilizando PMA como control positivo de estimulación.

Mediante este ELISA se corroboró lo observado *in vitro* por inmunofluorescencia, las MSMPs liberan una mayor cantidad de MPO que el hidróxido de aluminio. Sin embargo, aunque por inmunofluorescencia se veía una mayor cantidad de MPO a las tres horas esto no se observó en el ELISA (**Figura R52**). Estos resultados son preliminares ya que se necesita aumentar la n, pero nos permitieron determinar a qué tiempo deberíamos medir la citrulinación de la histona 3 en neutrófilos estimulados tanto con hidróxido de aluminio como con MSMPs, como otro marcador específico de la inducción de NETs.

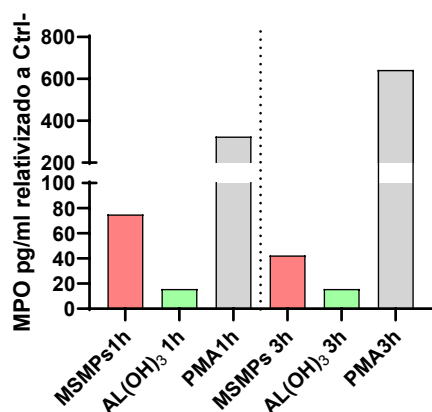


Figura R52: Estudio de la producción de MPO en el sobrenadante de neutrófilos estimulados 1 y 3 horas con MSMPs (rojo) y $Al(OH)_3$ (verde) mediante ELISA. Valores relativizados al control negativo

8.4. Los neutrófilos humanos estimulados con MSMPs presentan más Histona 3 citrulinada (H3cit).

Una vez cuantificada, de forma preliminar, la liberación de MPO por parte de neutrófilos humanos estimulados *in vitro* con MSMPs, quisimos estudiar, mediante citometría de flujo, la presencia de Histona 3 citrulinada (H3cit) en dicho grupo celular transcurridos 30 y 90 minutos desde la estimulación, comparando siempre los resultados con la no estimulación. Como se menciona en la introducción y a lo largo de este trabajo, la presencia de Histona 3 citrulinada es otro marcador característico de la formación de NETs. Al igual que ocurre en el apartado anterior, los resultados obtenidos tras este análisis son preliminares, y se requiere aumentar el tamaño muestral, debido a la variabilidad entre las muestras, para obtener resultados significativos sobre el aumento de la expresión de H3cit en neutrófilos estimulados con MSMPs.

A los 30 minutos, no se observan diferencias en la intensidad media de fluorescencia (MFI) entre la no estimulación y la estimulación con MSMPs. Sin embargo, transcurridos 90 minutos observamos como los neutrófilos estimulados con MSMPs presentan mayores cantidades de H3cit, medida como MFI, en comparación con los neutrófilos estimulados con hidróxido de aluminio y con el grupo control (**Figura R53**). Aunque estos resultados son bastante preliminares respaldan lo observado previamente sobre la capacidad de las MSMPs para inducir la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs).

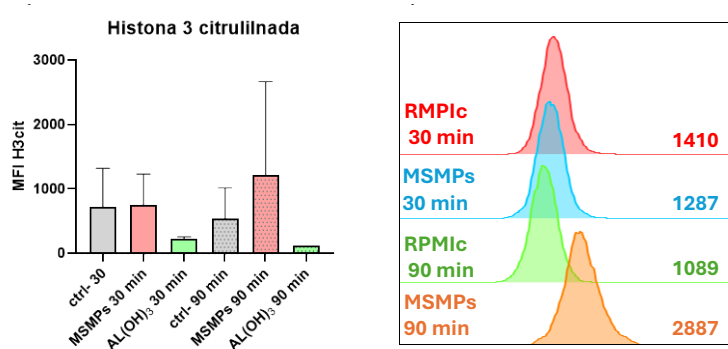


Figura R53: Análisis cuantitativo de la presencia de Histona 3 citrulinada (H3cit) de neutrófilos, mediante citometría de flujo. A) Gráfica que representa la presencia de Histona 3 citrulinada, medida como Intensidad de fluorescencia media (MFI), en neutrófilos estimulados 30 y 90 minutos con RPMIc (gris) MSMPs (rojo) y Al(OH)₃ (verde). **B)** Histograma representativo de la expresión de H3cit en neutrófilos humanos estimulados con MSMPs y con RPMIc durante 30 y 90 minutos. n=3.

9. Estudio in vitro en humanos de la capacidad inmunoestimuladora de las MSMPs en la respuesta celular frente al virus del SARS-COV-2.

Finalmente decidimos analizar la capacidad de las MSMPs para estimular la activación de linfocitos T humanos, analizándose la producción de IFN- γ tanto en PBLs solas como PBLs co-cultivadas con células dendríticas derivadas de monocitos (moDCs) autólogas, previamente primadas (**Figura R54A**).

En primer lugar, se escogieron como donantes a individuos sanos que habían sido vacunados frente al SARS-CoV-2 o que habían pasado recientemente la enfermedad. Para corroborarlo, se detectó, mediante ELISA, la presencia en sangre de IgG frente a la proteína S del SARS-CoV-2 (**Figura R54**).

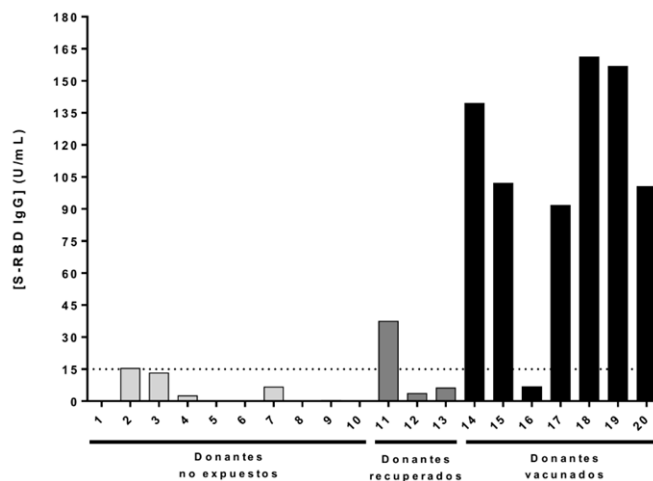


Figura R54: Estudio in vitro de la respuesta inmunitaria frente a SARS-CoV-2. Respuesta IgG frente a la proteína S-RBD de SARS-CoV-2. Se llevó a cabo la detección de IgG frente a RBD de la proteína S de SARS-CoV-2 mediante ELISA. La línea horizontal representa el umbral a partir del cual se consideró respuesta positiva (15 U/mL). El ensayo se realizó por duplicado.

A continuación se analizó, en los individuos que presentaban anticuerpos frente al SARS-CoV-2, la producción de IFN- γ por parte de las células T CD4+ y células T CD8+ en presencia y ausencia de células dendríticas previamente primadas y tras la estimulación con MSMPs-Peptivator_S y MSMPs solas.

En el caso de las células T CD4+ no se observaron diferencias significativas en la producción de IFN- γ tras la estimulación de PBLs con péptidos (Peptivator_S) o con MSMPs conjugadas a los mismos péptidos, pero sí entre la estimulación exclusiva con MSMPs y la estimulación con MSMPs-Peptivator_S. Cuando co-cultivamos las CD4 con

moDCs primadas provenientes del mismo donante observamos un aumento en la producción de IFN- γ (**Figura R55**). Esto nos indica el papel que juegan las células dendríticas en la presentación y activación de las células CD4 frente a péptidos virales, a través del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC-II).

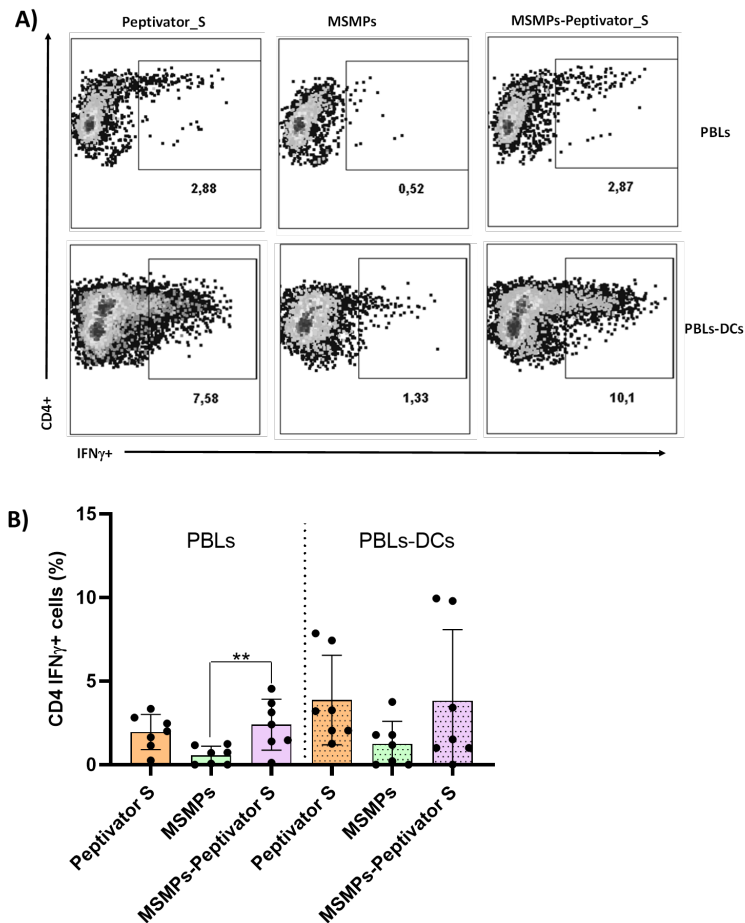


Figura R55: Estudio in vitro de producción de IFN- γ en células T. A) Dotplots representativos de la producción de IFN- γ en células CD4+ solas y co-cultivadas con DCs primadas. **B)** Respuesta T CD4+ (producción IFN- γ) en presencia y ausencia de células dendríticas. Los resultados muestran la media de los porcentajes (%) obtenidos (normalizados tras restarles la estimulación basal). Las diferencias significativas fueron analizadas mediante la prueba Mann-Whitney. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. $n=7$.

Con respecto a las células T CD8+ observamos que sí que hay un aumento significativo en la producción de IFN- γ cuando son estimuladas con MSMPs-Peptivator respecto a los péptidos solos. Cuando estas células se co-cultivan con moDCs autólogas se observa un aumento significativo en la producción de IFN- γ al estimular las células solo con péptidos, comparable al observado con MSMPs-Peptivator, aunque este aumento es mucho menor que el observado en las células CD4. En este caso, también se observa una

diferencia significativa entre la producción de IFN- γ en PBLs-DCs estimuladas con MSMPs y las estimuladas con MSMPs-Peptivator (**Figura R56**).

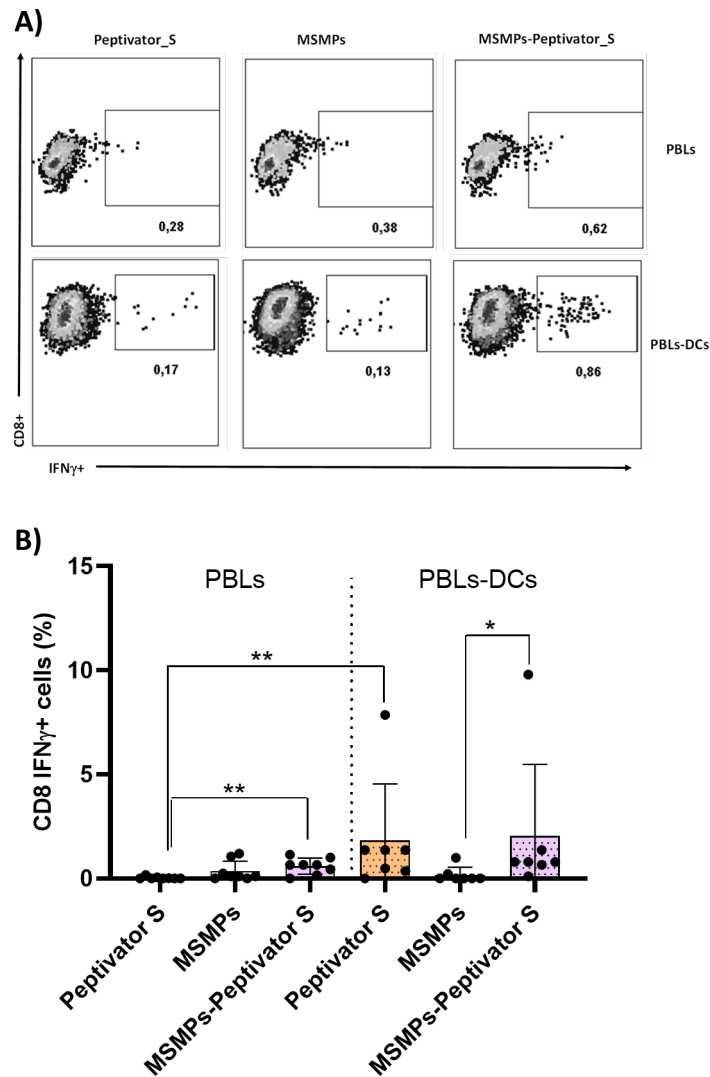


Figura R56: Estudio in vitro de producción de IFN- γ en células CD8+. **A)** Dotplots representativos de la producción de IFN- γ en células CD8+ solas y co-cultivadas con DCs primadas. **B)** Respuesta T CD8+ (producción IFN- γ) en presencia y ausencia de células dendríticas. Los resultados muestran la media de los porcentajes (%) obtenidos (normalizados tras restarles la estimulación basal). Las diferencias significativas fueron analizadas mediante la prueba Mann-Whitney. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. $n=7$.

VIII. DISCUSIÓN

El uso de adyuvantes es fundamental para que una vacuna genere una potente y robusta respuesta inmunitaria debido a las limitaciones que tiene el uso exclusivo de antígenos o subunidades de los mismos, como la necesidad de grandes cantidades de estos o múltiples dosis de recuerdo para generar una respuesta adecuada¹⁴⁸. Desde que se aprobó el primer adyuvante en 1926 no se ha encontrado ninguno que cumpla con todas las características para ser considerado como ideal¹⁴⁹. El aluminio, en sus diferentes formas, es el adyuvante más utilizado desde su descubrimiento, y durante más de 7 décadas fue el único disponible en el mercado⁵. Aun así, presenta ciertos inconvenientes y son estos los que dejan hueco para la llegada de nuevos adyuvantes¹⁵⁰. Aunque muchos adyuvantes han llegado a la fase preclínica, muy pocos han conseguido la autorización para su uso en humanos, debido principalmente a problemas de toxicidad y tolerabilidad⁵. Todos estos datos dejan de manifiesto la necesidad de explorar nuevos materiales con potencial adyuvante, que no sean tóxicos para el organismo, que cumplan con los criterios de tolerabilidad y eficacia, y que reúnan la mayor cantidad de características necesarias para ser considerados ideales.

Este trabajo, continuando con investigaciones previas del grupo, se ha centrado en estudiar el potencial del silicio mesoporoso, en forma de micropartículas (MSMPs), para ser utilizado como adyuvante en vacunas gracias a su capacidad inmunoestimuladora. En estudios previos nuestro grupo demostró el papel de las MSMPs como adyuvante en una vacuna antitumoral, compuesta por un antígeno de naturaleza carbohidrato, que generó una potente respuesta protectora frente al desarrollo de tumores que presentaban ese antígeno⁶³. El trabajo aquí presentado muestra la investigación llevada a cabo para demostrar que las MSMPs pueden ser utilizadas como adyuvantes en vacunas de naturaleza proteica confiriendo una potente y duradera respuesta inmunitaria, tanto humoral como celular, frente a una infección viral, en este caso por SARS-CoV-2. Además, comparamos el efecto de las MSMPs con el generado por el hidróxido de aluminio ($\text{Al}(\text{OH})_3$), identificando diferencias y similitudes entre ambos y demostrándose así el papel adyuvante de las micropartículas de silicio mesoporoso en vacunas de distinta naturaleza.

1. Las MSMPs conjugadas a la S1 ofrecen protección frente al SARS-CoV-2 y al COVID-19.

La producción de anticuerpos específicos es fundamental para el control de las infecciones virales. En el caso de las infecciones por coronavirus se ha descrito que existe una disminución significativa de esta respuesta con el paso del tiempo lo que explica las continuas reinfecciones que sufre la población¹⁵¹.

Nuestros datos mostraron que las MSMPs conjugadas con la proteína S del SARS-CoV-2 (MSMPs-S1) son capaces de generar una robusta respuesta humoral un mes después de la primera inmunización en ratones WT BALB/c, produciendo anticuerpos de tipo IgG, IgG1 e IgG2a específicos frente a dicha proteína. También observamos que cinco meses después de la inmunización los niveles de anticuerpos decaen considerablemente, al igual que ocurre con las vacunas para SARS-CoV-2 en humanos. Esta caída de la respuesta humoral es una de las principales causas de las sucesivas olas a las que se vio expuesta la sociedad tras la vacunación¹⁵².

Con respecto a la respuesta de IgG total, IgG1 e IgG2a específicas para S1 no se observaron diferencias entre las MSMPs y el hidróxido de aluminio durante los primeros meses, lo que nos indica que las MSMPs tienen una capacidad similar al hidróxido para estimular la respuesta humoral. Navarro-Tobal et al. demostraron que las partículas de silicio mesoporoso eran capaces de inducir una respuesta humoral prolongada en un complejo vacunal peptídico basado en un péptido de la proteína RAGE (receptor for advanced glycation end products), la cual perduraba hasta 52 días después de la inmunización¹⁵³. Con respecto a la inmunización frente al SARS-CoV-2, Adam et al. (2022), tras inmunizar ratones BALB/c con micropartículas de silicio modificado conjugadas a la región RBD (mSMP-RBD), observaron títulos elevados de IgG1, IgG2a e IgG2b, los cuales fueron muy similares a los obtenidos tras la inmunización con alum-RBD. Además, observaron cómo los anticuerpos producidos se mantenían hasta 180 días tras la inmunización⁷⁵.

En los experimentos realizados para medir la respuesta humoral a largo plazo observamos como 7 meses después de la primera dosis, y tras recibir una dosis de recuerdo (boost) siete días antes del sacrificio, los ratones inmunizados con MSMPs-S1

respondieron con un aumento en la producción de IgG2a que no se observó en los ratones inmunizados con hidróxido de aluminio. Esta diferencia entre ambos adyuvantes nos muestra la capacidad de las MSMPs para estimular la respuesta Th1 a largo plazo, caracterizada por la producción de IL2 y anticuerpos IgG2a^{74,154}, en lugar de la respuesta Th2, caracterizada por la liberación de IL4 y la producción de anticuerpos IgG1, respuesta que es capaz de estimular el hidróxido de aluminio^{155,156}. En ratón, se ha descrito que la inmunidad neutralizante y protectora frente al virus influenza se consigue con una combinación de IgG2a e IgG1¹⁵⁷. Igualmente, la IgG2a se ha relacionado con una mayor eficacia en terapias antitumorales¹⁵⁸.

La estimulación de la respuesta Th1 por parte de las MSMPs, como adyuvante, ya había sido demostrada previamente por nuestro grupo, en un modelo de vacuna tumoral frente a un antígeno de tipo carbohidrato⁶³. Además, confirma los datos obtenidos por Adam A, et al. (2022) en los que tras la inmunización por vía parenteral y tras la administración de una dosis de recuerdo por vía intranasal se observa una potente inmunidad sistémica y de mucosas en ratones inmunizados con mSMP-RBD⁷⁵.

A continuación, decidimos analizar la capacidad de neutralización frente al virus de los anticuerpos generados. Nuestros resultados mostraron una buena capacidad neutralizadora en ratones inmunizados con cualquiera de los dos adyuvantes, sin observarse diferencias entre ellos durante los dos primeros meses. En este periodo de tiempo la neutralización inducida, tanto por las MSMPs como por el Al(OH)₃ es elevada demostrando, de forma teórica, una protección frente a la infección por SARS-CoV-2. Sin embargo, esta similitud observada entre ambos adyuvantes no concuerda con los datos obtenidos por Adam A, et al. (2022), quienes observaron cómo los ratones inmunizados con mPSM-RBD, tenían una capacidad de neutralización mucho mayor que los ratones inmunizados con hidróxido de aluminio, en los que los niveles de unión RBD-ACE2 disminuían aproximadamente un 60%⁷⁵. Las diferencias entre ambos ensayos respecto al hidróxido de aluminio se pueden deber al formato utilizado en cada ensayo. En nuestro caso se utilizó un hidrogel, mientras que, Adam et al. utilizaron una combinación de hidróxido de aluminio y magnesio que se encontraba en suspensión y formaba estructuras particuladas capaces de estimular al sistema inmunitario de forma diferente al hidrogel. Otra diferencia entre ambos ensayos la encontramos en las partículas de

silicio empleadas para la inmunización. Adam et al. utilizan unas micropartículas producidas a través de un método de condensación, que presentan una distribución homogénea de poro y se encuentran unidas a CpG⁶⁹ para activar de forma más eficaz a TLR9. Nuestras partículas se originan a través de un método electroquímico, presentan una distribución heterogénea de los poros y no se encuentran modificadas.

En el estudio de la respuesta humoral también medimos la capacidad de neutralización en un estudio longitudinal durante siete meses donde de nuevo volvimos a observar diferencias entre ambos adyuvantes. Siete días después del boost comprobamos como únicamente los ratones inmunizados con MSMPs-S1 presentaban una elevada neutralización, siendo cercana al 100% en la mayoría de los individuos, mientras que, los ratones inmunizados con el adyuvante tradicional tenían una respuesta neutralizante prácticamente nula. Con ambos adyuvantes la neutralización se perdió a los cinco meses, pero el hecho de solo recuperarse tras el boost en los ratones inmunizados con nuestro adyuvante explica la diferencia significativa observada tras el análisis de correlación entre la neutralización y la producción de anticuerpos a lo largo del tiempo.

Por otro lado, también estudiamos la capacidad de ambos adyuvantes de generar anticuerpos neutralizantes frente a las distintas variantes de preocupación (VOCs) asociadas a un incremento de la transmisión y severidad de la enfermedad, dos meses después de la primera dosis. Los menores porcentajes de neutralización que observamos para las variantes beta y delta y la ausencia de neutralización observada con respecto a ómicron se correlaciona con las múltiples mutaciones que las variantes presentan en la proteína S, concretamente en la región RBD respecto a la cepa original de Wuhan, con la que realizamos la inmunización⁶⁹. Estas mutaciones modifican la capacidad de unión de los anticuerpos, producidos frente a la variante original. Por ejemplo, ómicron presenta más de 30 mutaciones en la proteína S, mientras que, beta solo presenta 8. Esta presencia elevada de mutaciones en la proteína S de la variante ómicron provoca que los anticuerpos producidos tras la vacunación o infección frente a la variante WT no sean capaces de reconocer ninguna región de la proteína S. Mientras que el bajo número de mutaciones presentes en la variante beta hace que los anticuerpos producidos previamente frente a la variante WT sí que sean capaces de reconocer y unirse a las distintas regiones de la proteína S, aunque con menor afinidad¹⁵⁹. Estos resultados nos

demuestran como las mutaciones presentes en el dominio RBD disminuyen la eficacia de los anticuerpos producidos tras la vacunación frente a la variante original, independientemente del adyuvante utilizado.

Uno de los principales inconvenientes de muchos adyuvantes actuales, entre ellos el hidróxido de aluminio, es su incapacidad de inducir una respuesta celular robusta^{5,74}, la cual es primordial en las vacunas virales¹⁶⁰. Únicamente las vacunas vivas atenuadas son capaces de estimular esta respuesta⁵. La experiencia acumulada en la investigación y el estudio de otros coronavirus (SARS-CoV y MERS-CoV) demostró que, para obtener una respuesta protectora efectiva, era necesario tanto una respuesta humoral como una respuesta T de memoria por parte, tanto de las células CD4+ como de las CD8+¹⁶¹.

En ratones envejecidos se demostró como las células T CD8+ específicas frente un antígeno inmunodominante protegían de la infección mortal por SARS-CoV gracias a la liberación de citoquinas como IFN- γ y TNF- α , las cuales redujeron la carga viral en el pulmón¹⁶². De nuevo, los estudios que se realizaron frente al SARS-CoV demostraron como las células CD8+ de memoria persisten hasta seis años después de la infección, mientras que, las células B de memoria no se detectaron a tan largo plazo¹⁶³. Debido a la similitud entre ambos virus se planteó la hipótesis de que era muy probable que en el caso del SARS-CoV-2 ocurriera lo mismo, y tras estudios longitudinales de la respuesta humoral, tanto en modelos animales como en la población general, se demostró una disminución considerable de esta respuesta a los cinco meses. De manera que, la generación de vacunas capaces de estimular la respuesta celular CD8+ de memoria son fundamentales para proteger a largo plazo de la infección.

En este trabajo demostramos como las MSMPs cargadas con la subunidad S1 del SARS-CoV-2 eran capaces de inducir una robusta respuesta de linfocitos T CD8 productores de IFN- γ , la cual no se observaba en los ratones inmunizados con hidróxido de aluminio. Estos resultados concuerdan con los observados por Adam et al. (2022) quienes al inmunizar intraperitonealmente ratones con mPSM-RBD observaron la capacidad de este complejo para inducir una respuesta T CD8 específica, medida como producción de IFN- γ , en el bazo de los ratones inmunizados. La respuesta celular era muy superior a la respuesta generada por los ratones inmunizados con alum-RBD⁷⁵.

La producción de IFN- γ por parte de las células CD8 estimuladas nos indica la presentación cruzada de estos péptidos a través del complejo mayor de histocompatibilidad I (MHC-I). De esta forma se encontró no solo una nueva diferencia entre ambos adyuvantes, sino también una ventaja en el uso de MSMPs frente al de Al(OH)₃, ya que como se menciona previamente y como ha quedado demostrado en este trabajo, el hidróxido de aluminio no es capaz de inducir esta respuesta. La respuesta celular, sobre todo citotóxica, junto con la elevada y mantenida capacidad neutralizante de los anticuerpos sugiere que las MSMPs serían capaces de proteger más tiempo, y de manera más eficaz, frente a la infección por SARS-CoV-2 que el hidróxido de aluminio.

Previamente nuestro grupo demostró como MSMPs conjugadas a péptidos virales aumentaban, *en ensayos in vitro* con células humanas, la respuesta inmunitaria específica, medida como producción de IFN- γ ⁵⁰. En este trabajo, hemos demostrado como MSMPs conjugadas a péptidos virales del SARS-CoV-2 inducían una mayor respuesta en células humanas CD8, medida como producción de IFN- γ mediante citometría de flujo, en PBMCs de donantes sanos que previamente habían estado expuestos al SARS-CoV-2, bien a través de la vacunación o de la infección. Además, tras haber demostrado en trabajos previos, la capacidad de las células dendríticas para endocitar las MSMPs^{49,63}, observamos como la respuesta específica de las células CD4 también aumentaba considerablemente cuando co-cultivamos PBLs con células dendríticas derivadas de monocitos (moDCs) primadas previamente. Estos resultados nos demuestran que los péptidos están siendo procesados y presentados a través del complejo de histocompatibilidad II (MHC-II). Estas partículas, permanecen en endosomas tardíos (Rab7A+) de células dendríticas humanas, donde se cargan los péptidos, durante al menos 14h⁶³.

Con el fin de conocer mejor los mecanismos moleculares implicados en la respuesta inmunitaria asociada al uso de MSMPs decidimos analizar el perfil transcripcional de los esplenocitos aislados de ratones inmunizados con los complejos vacunales de estudio. De forma general, observamos cambios significativos en la transcripción de un alto número de genes tras comparar el uso de ambos adyuvantes con la inoculación de PBS. Este alto número de genes desregulados entre los diferentes grupos no se corresponde con lo observado previamente por nuestro grupo en un experimento similar, donde

únicamente 47 genes se encontraban desregulados si comparáramos la inoculación de PBS frente a la de MSMPs⁶³. Mientras que, en nuestro ensayo encontramos cambios en la transcripción de 2890 genes. Esta diferencia observada entre ambos estudios puede deberse, en parte, al modelo murino utilizado, CBA/J respecto a BALB/c, cuyas diferencias quedan recogidas en la **tabla D1**. También hay que tener en cuenta el protocolo de inmunización seguido en cada caso (5 inmunizaciones respecto a las 2 de este trabajo, recibiendo en ambos casos un boost siete días antes del sacrificio). En nuestro caso utilizamos el modelo BALB/c con dos dosis separadas 30 días y una tercera dosis separada 7 meses, mientras que, en el trabajo de I. Real se usó el modelo CBA/J con dosis separadas cada 15 días durante un periodo de 35 días y una última dosis 2 meses después.

CARACTERÍSTICA	BALB/c	CBA/J
Perfil Inmunológico	Respuesta Th2	Respuesta Th1-Th2
Haplotipo MHC	H2d	H2k
Utilidad en investigación	Enfermedades infecciosas Anticuerpos monoclonales	Inflamación Autoinmunidad

Tabla D1: Principales diferencias inmunológicas entre la cepa BALB/c y CBA/J. Información recogida de Jackson Laboratory¹⁶⁴.

En este trabajo tras comparar el bazo de ratones inmunizados solo con PBS con el bazo de ratones inmunizados con MSMPs observamos como existe una gran cantidad de vías desreguladas en el caso de la inmunización con MSMPs. Dentro de estas vías nos gustaría destacar la vía relacionada con la formación de trampas extracelulares de neutrófilos, cuyos genes se encuentran regulados al alza en el bazo de ratones inmunizados con MSMPs siete días después de la última dosis. Este trabajo demuestra la capacidad de las MSMPs para favorecer el reclutamiento de los neutrófilos a la zona de inmunización e inducir la formación de trampas extracelulares de neutrófilos. Sin embargo, la regulación al alza de esta vía nos estaría indicando la posible capacidad de las MSMPs para migrar al bazo y activar los neutrófilos presentes en este órgano.

De manera general, observamos como ratones inmunizados con MSMPs presentan una regulación al alza de *Plcg1*, gen que juega un papel importante en la transducción de señales intracelulares a través de los receptores tirosin-quinasa y que se expresa de

forma amplia en el organismo^{165,166} participando en diferentes vías de señalización asociadas a receptores en células T y receptores de tipo Toll.

Finalmente, en el análisis de ARN-seq no se observó ningún cambio transcripcional de genes implicados en la respuesta celular como *Ifn γ* , el cuál habíamos visto que aumentaba en ratones inmunizados con MSMPs-S1. IFN- γ es una de las citoquinas más importantes del sistema inmunitario al encargarse de la señalización entre sus células¹⁶⁷, por ello su regulación es un proceso altamente complejo¹⁶⁸. Este gen no se expresa de forma constitutiva, sino que su expresión depende de la presencia o ausencia de estímulos que puedan ser perjudiciales para el organismo y que puedan desencadenar la activación del sistema inmunitario¹⁶⁸. En nuestro estudio, la ausencia de estimulación de los esplenocitos una vez extraídos, así como, el transcurso de siete días desde la última dosis podrían ser las responsables de no observar variaciones en la expresión de este gen entre los diferentes grupos.

Con todos los resultados obtenidos podemos concluir que las micropartículas de silicio mesoporoso (MSMPs) tienen una elevada capacidad para estimular la respuesta humoral, muy similar a la del hidróxido de aluminio, al igual que una elevada capacidad para estimular la respuesta celular en este caso, de manera más eficaz que el hidróxido de aluminio, confirmando que las MSMPs tienen un elevado potencial para ser utilizadas como adyuvantes en futuras vacunas.

Nuestros resultados indican que las MSMPs son capaces de inducir una potente respuesta inmunitaria tanto celular como humoral frente a la proteína S1. Por esta razón decidimos realizar estudios de protección frente a la infección viral en ratones k18-hACE2. El análisis de diferentes parámetros como la supervivencia, las variaciones en el peso y los síntomas clínicos nos demuestra como las MSMPs, al igual que el hidróxido de aluminio, fueron capaces de proteger frente al desarrollo grave de la enfermedad gracias a la inmunidad humoral y celular generada.

La presencia de carga viral en los pulmones de los ratones después del reto viral demostraba que todos habían sido infectados por el virus del SARS-CoV-2, independientemente del complejo vacunal utilizado. Sin embargo, sí que se observa una carga ligeramente inferior en los grupos inmunizados con los adyuvantes, dejando de

manifiesto una mínima protección parcial. La carga observada en este órgano, y la ausencia de diferencia entre los distintos grupos, se puede deber a la alta carga viral, medida como PFU, utilizada para la infección, considerada letal y muy superior a la obtenida durante una infección natural¹⁶⁹. Los resultados obtenidos 4 días después de la infección concuerdan con los datos obtenidos en ensayos paralelos realizados por diferentes investigadores, los cuales evaluaban distintos candidatos vacunales frente al mismo virus^{169,170}. En un ensayo muy similar Larraga V. y cols (2022). observaron que, tras evaluarse de nuevo la presencia del virus 15 días después de la infección, la carga viral en este órgano disminuía gracias a la respuesta humoral y celular que se había observado previamente tras la vacunación¹⁶⁹. Con estos datos pensamos que, si la presencia del virus se hubiese evaluado de nuevo 15 días después de la infección observaríamos como los ratones inmunizados con ambos complejos adyuvantes presentarían una menor carga viral en los pulmones pudiendo llegar a observar posibles diferencias entre ambos adyuvantes.

Posteriormente, se evaluó la carga viral en otros órganos por los que el virus tiene cierto tropismo, como el cerebro¹⁷¹, observándose la ausencia de virus en aquellos individuos que habían sido inmunizados con cualquiera de los dos complejos vacunales, pero no en los individuos inmunizados exclusivamente con el antígeno, los cuales tenían una carga viral prácticamente idéntica a la de los grupos control. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por diversos grupos al estudiar diferentes candidatos vacunales^{169,170}. Se ha demostrado como la presencia del virus del SARS-CoV-2 en el cerebro está relacionada con la muerte neuronal y la aparición de microinfartos cerebrales, los cuales destruyen lentamente el órgano y condicionan la vida de los pacientes que lo sufren. La presencia del virus en el cerebro explicaría los síntomas neurológicos observados tras la infección por COVID-19 como confusión, olvido y pérdida del olfato y gusto entre otros¹⁷¹. La disminución de la carga viral en el cerebro de ratones inmunizados con cualquiera de los adyuvantes demuestra que las MSMPs, al igual que el Al(OH)₃, son capaces de estimular al sistema inmunitario favoreciendo el aclaramiento viral y, evitando así, la infección de otros órganos.

En el caso del corazón no se detectó carga viral en ninguno de los grupos infectados, lo que nos lleva a concluir que el virus no es capaz de infectar este órgano. Sin embargo,

en los ensayos realizados por V. Larraga, sí que se detectó carga viral 4 días después de la exposición al virus¹⁶⁹. Ambos ensayos se realizaron con la misma carga viral (PFU), con la misma variante y con el mismo modelo murino, de manera que, los resultados de la carga viral en los grupos control debería ser idéntica en ambos ensayos.

Los datos de protección obtenidos no nos permitieron observar diferencias significativas entre los adyuvantes, aunque sí que podemos concluir que las MSMPs conjugadas con el antígeno confieren una elevada protección frente al SARS-CoV-2, de la misma manera que el hidróxido de aluminio. La ausencia de diferencias entre ambos se puede deber, en parte, al protocolo establecido para realizar el reto viral, y es que, la infección de estos animales se produjo a los 45 días de la primera dosis vacunal, y a este tiempo no hay diferencias en torno a la respuesta humoral, ni a la neutralización entre ambos adyuvantes. Teniendo en cuenta los datos de respuesta inmunitaria a largo plazo y, para determinar de forma inequívoca si las MSMPs son capaces de proteger frente a la infección mejor que el hidróxido de aluminio, sería necesario infectar a ratones inmunizados siete meses después de la primera dosis, pues es a este tiempo donde se observaron las principales diferencias entre ambos adyuvantes.

2. Los neutrófilos y la proteína adaptadora MyD88 son fundamentales en el mecanismo de acción de las MSMPs.

Conocer qué ocurre en la zona de inmunización es fundamental para comprender el mecanismo que utilizan los adyuvantes para estimular al sistema inmunitario. Previamente nuestro grupo demostró como las MSMPs eran capaces de estimular y activar a células dendríticas, macrófagos M1 y macrófagos M2^{50,63}. Esto nos llevó a pensar que, en modelos *in vivo*, la presencia de MSMPs en el organismo estimularía la llegada de dichas células induciendo su activación y diferenciación, constituyendo el primer paso para la generación de esa respuesta humoral y celular que se había observado al inmunizar ratones con el complejo MSMPs-S1.

La diferencia observada, no solo con relación al tiempo, sino también a la forma del infiltrado se debe al efecto que tiene cada adyuvante sobre el tejido y las células del sistema inmunitario. Por un lado, las MSMPs se distribuyen por todo el tejido conjuntivo, y entre las fibras musculares generando un infiltrado mucho más difuso, mientras que

por el otro lado, el hidróxido de aluminio se acumula en el sitio de inoculación de manera visible en los análisis histológicos. Este depósito formado por el hidróxido de aluminio condiciona su acción, ya que parece ser fundamental para que pueda activar y reclutar a células del sistema inmunitario^{172,173}, por lo que todas las células que forman el infiltrado quedan restringidas a su alrededor. Transcurridas 24 horas el depósito de aluminio, se reabsorbe dejando una lesión en el tejido, mientras que las MSMPs permanecen, aumentando potencialmente, el tiempo de exposición al antígeno. Ensayos previos realizados en nuestro grupo demostraron como 7 días después de la inoculación, las MSMPs permanecían en el tejido, aunque en menor proporción⁶³.

Después de la inoculación de ambos adyuvantes las primeras células que llegan a la zona de inmunización son los neutrófilos, los cuales permanecen transcurridas 24 horas, en el caso de las MSMPs, pero desaparecen transcurrido este tiempo en el caso del hidróxido de aluminio. Las diferencias observadas entre las MSMPs y el Al(OH)₃ nos llevaron a pensar en la posible interacción entre los neutrófilos y las MSMPs que podría condicionar el resto de la respuesta inmunitaria. Esta hipótesis se desarrolló a lo largo del trabajo y se discutirá más adelante.

Diversos investigadores demostraron como el hidróxido de aluminio era capaz de generar un ambiente pro-inflamatorio tras 24 horas, que atraía a monocitos, macrófagos y células dendríticas^{173,174}. Sin embargo, en nuestro caso 24 horas después de la inoculación, el depósito desaparece y con él el infiltrado generado. Las diferencias observadas en torno al hidróxido de aluminio pueden deberse, al estado físico en el cual se encuentra el adyuvante. Cuando este se suministra en forma de sales, estas se agregan formando nanopartículas, las cuales estimularían a los neutrófilos y otras células inmunes induciendo una inflamación¹⁷⁵. En nuestro caso, el hidróxido se administró en forma de gel, de manera que no se produce esa agregación y el gel es reabsorbido rápidamente sin generar un infiltrado de células duradero.

En el caso de las MSMPs observamos sobre todo la presencia de células innatas como neutrófilos y macrófagos. Previamente en modelos *in vitro* nuestro grupo demostró que las MSMPs eran endocitadas por macrófagos y células dendríticas generando en ellos activación y liberación de citoquinas^{50,63}. Esta activación de macrófagos que observamos *in vitro*, junto con el infiltrado observado *in vivo* tanto de macrófagos como de

neutrófilos, explicaría la presencia de células T que observamos en el infiltrado después de 24 horas.

Si nos centramos en los neutrófilos y en su interacción con ambos adyuvantes observamos como 4 horas después de la inoculación el infiltrado generado por ambos está constituido principalmente por neutrófilos, al ser este grupo celular el primero en acudir en presencia de daño o infección¹²⁵. Además, mediante hematoxilina/eosina, observamos su asociación con las MSMPs, corroborando los resultados obtenidos *in vitro* donde demostramos que las MSMPs eran fagocitadas por neutrófilos humanos.

A las 24 horas nos centramos exclusivamente en el infiltrado generado por MSMPs, ya que como se ha mencionado previamente, el infiltrado generado por el hidróxido de aluminio desaparece. Cuando detectamos la presencia de neutrófilos utilizando el marcador de la elastasa, enzima característica de los neutrófilos, se observa una disminución de esta, lo que nos estaría indicando la disminución de neutrófilos en el infiltrado. Sin embargo, cuando analizamos el porcentaje de células positivas para mieloperoxidasa (MPO), otra enzima característica de los neutrófilos, observamos un mayor número de células positivas para este marcador. Esta discrepancia observada se puede deber a la diferencia que presentan ambas enzimas en relación a su vida media, siendo la vida media de la elastasa de unas pocas horas, mientras que, la de la mieloperoxidasa mucho mayor, pudiendo llegar a ser de incluso varios días debido a su baja susceptibilidad a la degradación^{176,177}. Además, la presencia de MPO en el tejido nos estaría indicando la presencia de NETs en esas zonas, corroborándose la capacidad de las MSMPs para inducir NETs, como se había demostrado en ensayos *in vitro*⁶³. La MPO se libera al exterior durante la formación de NETs, junto a la Histona 3 (H3), que además de liberarse junto con las fibras de DNA, se citrulina, siendo la presencia de H3cit un marcador fundamental de la formación de NETs¹⁷⁸. Nuestros datos indicaron que las MSMPs son capaces de inducir la formación de NETs, entre 4 y 24 horas después de su inoculación, mientras que, el hidróxido de aluminio no es capaz de generar estas redes. Como se menciona en el apartado anterior es la naturaleza particulada la que induce la formación de NETs dado que se ha observado como cristales de sílice o calcio¹⁷⁹ son capaces de inducir esta respuesta en ensayos *in vitro*.

Los resultados obtenidos *in vivo* se corresponden con los ensayos realizados *in vitro*, volviéndose a demostrar la capacidad de las MSMPs para estimular los neutrófilos, induciendo la formación de NETs, y la limitación del hidróxido de aluminio, en formato de gel, para estimular a estas células, midiendo la estimulación a través de la formación de NETs. Sin embargo, revisando la literatura publicada en torno al mecanismo de acción del hidróxido de aluminio encontramos como este material es capaz de estimular a los neutrófilos a través de la formación de NETs^{174,175}, contribuyendo estas estructuras al efecto del alumbre en vacunas¹⁶⁰. La diferencia observada entre nuestro ensayo y la literatura se puede deber, una vez más, al formato en el cual se presenta el hidróxido de aluminio en el complejo vacunal¹⁷⁵, y es que, las nanopartículas, independientemente del material del que estén hechas, son capaces de activar a los neutrófilos a través de mecanismos de desgranulación, estrés oxidativo o formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)¹⁸⁰.

Con el fin de estudiar el papel de los neutrófilos en el mecanismo de acción de los adyuvantes analizados decidimos utilizar el modelo de ratón iDTRMRP8xCRE, que permite deplecionar los neutrófilos de forma temporal en el momento de la inmunización. Estos experimentos mostraron una disminución drástica de los niveles de IgG1 específicos frente a la región RBD en los ratones deplecionados de neutrófilos e inmunizados utilizando MSMPs como adyuvante. En contraste, cuando utilizamos hidróxido de aluminio, los neutrófilos parecen ser prescindibles para montar una respuesta específica de anticuerpos IgG1. En este sentido, ensayos previos demostraron como ratones deficientes PAD4, proteína que impulsa la formación de NETs, inmunizados con hidróxido de aluminio presentaban una respuesta humoral disminuida en comparación con los ratones WT¹⁸¹. De nuevo, las diferencias observadas en torno al hidróxido de aluminio en nuestro caso son posiblemente debidas al formato utilizado.

Estos datos junto con la presencia de células B en la zona de la inmunización nos hacen pensar que existe una posible interacción entre MSMPs, neutrófilos y células B, la cual se desarrollaría a través de citoquinas. Una de las citoquinas que podría estar implicada en esta interacción podría ser BAFF, la cual es liberada por neutrófilos activados¹⁸², y es capaz de unirse a receptores específicos que se encuentran en las células B (BAFF-R)¹⁸³ **(Figura D1)**.

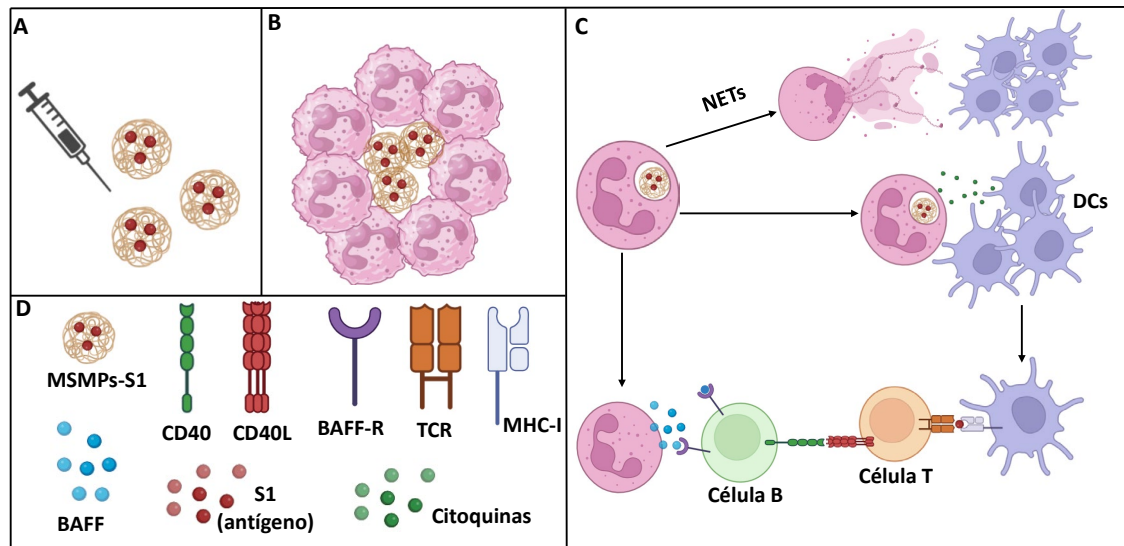


Figura D1: Mecanismo de acción de las MSMPs a través de su interacción con los neutrófilos. **A)** Inoculación de las MSMPs-S1 vía intramuscular. **B)** Reclutamiento de neutrófilos en la zona del infiltrado. **C)** Efecto de las MSMPs sobre los neutrófilos y la interacción directa de estos con células B e indirecta con células T a través de las células dendríticas (DCs). **D)** Simbología utilizada para describir la interacción entre MSMPs, neutrófilos, células B y células T. Imagen realizada en Biorender.

En el bazo de los ratones deplecionados de neutrófilos inmunizados con MSMPs también observamos una drástica disminución de linfocitos T productores de IFN- γ . Esta disminución de la respuesta celular en ausencia de neutrófilos junto con el infiltrado de células T en la zona de inmunización, nos sugiere una posible interacción entre estas células, habiendo tres posibles explicaciones para esta interacción. Por un lado, estaría la teoría de una interacción directa entre MSMPs, neutrófilos y células T, la cual es bastante improbable debido a la corta vida de los neutrófilos y al tiempo que tarda la respuesta adaptativa en comenzar. Por otro lado, se podría dar una interacción entre MSMPs, neutrófilos, células T y células B, o bien, células dendríticas (las cuales sabemos que también endocitan MSMPs) siendo esta la interpretación más plausible. En este caso, los neutrófilos endocitarían a las MSMPs cargadas con el antígeno y al activarse por distintos mecanismos, uno de ellos la formación de trampas extracelulares, estarían favoreciendo su interacción con las células dendríticas¹⁸⁴ aumentando así la disponibilidad y presentación del antígeno a estas, condicionándose indirectamente la activación de las células T (**Figura D1**). Todos estos datos nos ayudan a empezar a comprender el mecanismo de acción de las MSMPs.

Continuando con el mecanismo de acción, quisimos estudiar si está mediado por los TLRs presentes en las células innatas. La activación de los receptores Toll-Like (TLRs), es

fundamental para la activación de células dendríticas y, en consecuencia, la activación de células B y T^{8,185}. Cuando se descubrió que ciertos adyuvantes también eran capaces de activar a los TLRs se abrió una nueva vía de conocimiento acerca del mecanismo de acción de los mismos. Por ejemplo, el hidróxido de aluminio es independiente de TLR y su mecanismo de acción se debe principalmente a la activación del inflamasoma (NLRP3), aunque a pesar de ser el primer adyuvante aprobado sigue habiendo mucha controversia en torno a su mecanismo de acción^{5,21,160,173}. Otros adyuvantes, como CpG o el sistema AS04, sí que ejercen su función a través de TLRs, activando TLR9 y TLR4 respectivamente^{5,36}.

Para determinar si las MSMPs ejercían su acción a través de TLRs, o bien eran independientes de estas vías usamos dos modelos de ratón knock-out, uno de los cuales tenía silenciada la proteína adaptadora MyD88, de manera que se bloqueaba la señalización de todos los TLRs menos de TLR3 y parte de TLR4 y, otro que presentaba silenciada exclusivamente la vía de TLR4. Tras ensayos de inmunización observamos como los ratones KO MyD88 que habían sido inmunizados con el complejo MSMPs-S1 presentaban una disminución considerable tanto de la respuesta humoral como celular. La ausencia de respuesta en este grupo se puede deber a la no estimulación de la respuesta innata al verse inhibida las vías de TLR, pero también a la disminución de células T CD8 efectoras y de memoria como consecuencia del silenciamiento de MyD88¹⁸⁶, ya que estudios previos habían demostrado como la ausencia de MyD88 disminuía la expansión clonal y la función efectora de las células T en ratones vacunados¹⁸⁷. Por otro lado, los ratones KO TLR4 inmunizados con el complejo MSMPs-S1 presentaban prácticamente la misma respuesta humoral y celular que los ratones WT, de manera que, las MSMPs no interactúan con este TLR. En el caso del hidróxido de aluminio, se observó la misma respuesta en ratones KO MyD88 que en ratones WT, lo que concuerda con lo establecido acerca de su mecanismo de acción a través del inflamasoma.

Estos resultados sugieren tres posibles mecanismos de acción para nuestro adyuvante. Por un lado, puede ser que las MSMPs ejerzan su función de manera dependiente de TLR, excluyendo las vías de TLR4 y TLR3, por lo que quedaría por determinar a través de que vía de TLR ejercen su función las MSMPs. Si continuamos con la hipótesis establecida

de que las MSMPs necesitan de los neutrófilos para ejercer su acción adyuvante, excluiríamos a TLR7 como diana de las MSMPs, al no estar presentes en los neutrófilos¹³⁹. Si tenemos en cuenta la capacidad de las células dendríticas de endocitar a las MSMPs en el interior de los endosomas⁶³, la explicación más plausible en este caso sería que las MSMPs fuesen capaces de activar a TLRs endógenos como son TLR7/TLR8 y TLR9. Si determinamos que las MSMPs solo activan una vía específica de TLR que debe estar presente tanto en neutrófilos como en macrófagos y células dendríticas, podríamos proponer la hipótesis de que el mecanismo de acción de las MSMPs se basa en la activación de TLR8 o TLR9. Teniendo en cuenta, que TLR8 carece de función en los ratones¹⁸⁸, las MSMPs estarían activando exclusivamente a TLR9 (**Figura D2**).

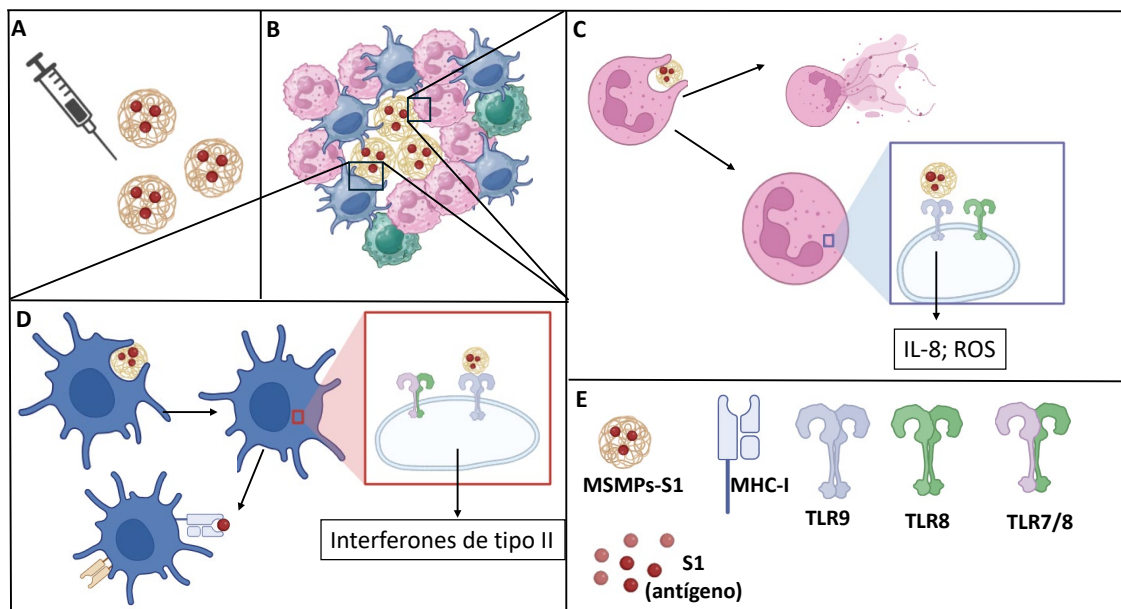


Figura D2: Mecanismo de acción de las MSMPs a través de su interacción con los TLRs. A) Inoculación de las MSMPs-S1 vía intramuscular. **B)** Reclutamiento de neutrófilos, dendríticas y macrófagos en la zona del infiltrado. **C)** Efecto de las MSMPs sobre los neutrófilos y la activación de TLR9 en los endosomas. **D)** Efecto de las MSMPs sobre células dendríticas, activación de TLR9 tras llegar a los endosomas y presentación cruzada del antígeno a través de MHC-I. **E)** Simbología utilizada para describir la interacción entre MSMPs, neutrófilos, células B y células T. Imagen realizada con Biorender.

Investigaciones previas realizadas con micropartículas de silicio nanoporoso demostraron como estas eran capaces de activar a TLR9 tras ser cargadas con ligandos estimulantes de este, induciendo una mayor estimulación de TLR9 que los ligandos solos o unidos a adyuvantes lipídicos⁶⁹. Para corroborar que las MSMPs ejercen su función a través de TLR9 se podrían inmunizar ratones KO para dicho TLR y estudiar como varia la respuesta humoral y celular en comparación con los ratones WT. De manera *in vitro*, se

podrían cultivar células dendríticas con inhibidores químicos de TLR9, como E6446¹⁸⁹ y ver mediante citometría de flujo la maduración y activación de este grupo celular. También se podrían usar anticuerpos monoclonales como IMO-3100¹⁹⁰, que actúen de antagonistas para dicho TLR.

Otro posible mecanismo de acción es que las MSMPs ejerzan su actividad adyuvante de forma independiente de TLRs, pero dependiente de la proteína MyD88, como ocurre con el adyuvante MF59⁵. Para comprobar si las MSMPs son capaces de activar alguna vía de TLR o bien solo dependen de MyD88 se podrían usar líneas celulares que presenten cada TLR de forma estable y que presenten un gen reporter que nos permita medir la activación de los distintos TLRs en presencia y ausencia de MSMPs y de controles positivos para cada TLR. Este ensayo también nos permitiría determinar si las MSMPs son capaces de estimular a TLR9²⁸. Estudios realizados con MF59 demostraron como en ratones KO MyD88 el reclutamiento de neutrófilos después de la inmunización se vio disminuido²⁸. De manera que, si la ausencia de MyD88 disminuye el reclutamiento de neutrófilos, y las MSMPs necesitan de estas células para ejercer su función, cabría esperar la disminución de la respuesta humoral y celular que hemos observado en ratones KO MyD88 inmunizados con MSMPs-S1.

Finalmente, quedaría por evaluar si las MSMPs pudiesen también ejercer su función a través del inflammasoma, como el hidróxido de aluminio. Diversos investigadores demostraron como nanopartículas de sílice eran capaces de inducir la liberación de citoquinas inflamatorias en PBMCs humanas gracias a la capacidad de estas de activar el inflammasoma¹⁹¹, pero también se ha demostrado como esta capacidad depende del tamaño de la partícula¹⁹², por lo que habría que demostrar si nuestras micropartículas de silicio, con un tamaño heterogéneo pero inferior a 5 µm serían capaces de activar esta vía.

En resumen, este trabajo muestra el potencial de las MSMPs para estimular el sistema inmunitario, en un complejo vacunal frente al virus del SARS-CoV-2 confiriendo una potente respuesta humoral, celular y de protección a los ratones vacunados. Con este trabajo ha quedado demostrado como las MSMPs estimulan la respuesta humoral de forma comparable al hidróxido de aluminio con una mejor respuesta Th1 y durabilidad en el tiempo. En el caso de la respuesta celular, se demostró como la capacidad de las

MSMPs para estimular dicha respuesta era superior a la capacidad del hidróxido de aluminio, y probablemente, superior a la de otros adyuvantes aprobados para uso humano. También, hemos demostrado como aumenta la respuesta citotóxica de memoria *in vitro*, en humanos.

Siguiendo la línea de trabajos anteriores, se demostró mediante modelos *in vivo*, la capacidad de las MSMPs de atraer y activar a células innatas como macrófagos y neutrófilos, comenzándose a estudiar el mecanismo de acción, con respecto al cual, quedan muchas incógnitas por resolver. Este trabajo demuestra cómo la capacidad adyuvante de las MSMPs es en gran parte dependiente de los neutrófilos. Además, de la dependencia de la transducción de señales a través de MyD88, siendo fundamental para el desarrollo de la respuesta inmunitaria inducida por las MSMPs. Aun así, sigue siendo necesaria la investigación en torno a este material para conocer cómo ejerce su función sobre los neutrófilos y células dendríticas y cómo condicionan la respuesta adaptativa.

IX. CONCLUSIONES

1. Las MSMPs conjugadas a la proteína S1 son capaces de estimular la respuesta humoral específica de manera similar al hidróxido de aluminio en ratones BALB/c inmunizados frente al SARS-CoV-2. La respuesta con MSMPs mejora tras una dosis de recuerdo a los siete meses.
2. Las MSMPs aumentan la producción de IgG2a después de la dosis de recuerdo, en ratones inmunizados frente al SARS-CoV-2. De manera que, las MSMPs estimulan la respuesta Th1.
3. Las MSMPs potencian la actividad neutralizante frente al SARS-CoV-2 en ratones BALB/c después de dos dosis de inmunización, de manera similar al hidróxido de aluminio. Tras una dosis de recuerdo con MSMPs-S1 a los siete meses, se obtiene la mayor actividad neutralizante, mientras que los ratones inmunizados con hidróxido de aluminio la pierden.
4. Las MSMPs-S1 son capaces de potenciar la respuesta T CD8+ de forma más eficaz que el hidróxido de aluminio en ratones BALB/c inmunizados frente al SARS-CoV-2.
5. Las MSMPs conjugadas con la subunidad S1 ofrecen protección eficaz frente a la enfermedad grave o muerte por SARS-CoV-2. Mejoran el aclaramiento viral en órganos diana y disminuye los síntomas clínicos de los individuos infectados.
6. Las MSMPs generan un infiltrado de células en la zona de inmunización que perdura hasta pasadas 24 horas, formado inicialmente por neutrófilos.
7. Las MSMPs son capaces de activar a los neutrófilos induciendo en ellos la formación de trampas extracelulares (NETs), tanto en modelos *in vivo* como en *in vitro*.
8. Las MSMPs necesitan a los neutrófilos para ejercer su actividad adyuvante, puesto que ratones iDTRMRP8xCRE deplecionados de neutrófilos carecen de respuesta humoral y celular tras la inmunización con el complejo MSMPs-S1.
9. Las MSMPs ejercen su mecanismo de acción a través de la proteína adaptadora MyD88 como indica el hecho de que los ratones KO MyD88 inmunizados con el complejo MSMPs-S1 presentan una respuesta humoral y celular drásticamente disminuida.

10. Las MSMPs conjugadas a péptidos virales del SARS-CoV-2 aumentan la respuesta T de células T CD8+específicas de memoria en PBMCs humanos de individuos previamente expuestos al SARS-CoV-2.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Guimarães LE, Baker B, Perricone C, Shoenfeld Y. Vaccines, adjuvants and autoimmunity. *Pharmacol Res.* 2015;100:190-209. doi:10.1016/j.phrs.2015.08.003
2. Zepp F. Principles of vaccine design-Lessons from nature. *Vaccine.* 2010;28 Suppl 3:C14-24. doi:10.1016/j.vaccine.2010.07.020
3. Sato Y, Sato H. Development of acellular pertussis vaccines. *Biol J Int Assoc Biol Stand.* 1999;27(2):61-69. doi:10.1006/biol.1999.0181
4. Di Pasquale A, Preiss S, Tavares Da Silva F, Garçon N. Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. *Vaccines.* 2015;3(2):320-343. doi:10.3390/vaccines3020320
5. Pulendran B, S Arunachalam P, O'Hagan DT. Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants. *Nat Rev Drug Discov.* 2021;20(6):454-475. doi:10.1038/s41573-021-00163-y
6. Shoenfeld Y, Agmon-Levin N. "ASIA" - autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants. *J Autoimmun.* 2011;36(1):4-8. doi:10.1016/j.jaut.2010.07.003
7. Zhao T, Cai Y, Jiang Y, et al. Vaccine adjuvants: mechanisms and platforms. *Signal Transduct Target Ther.* 2023;8(1):283. doi:10.1038/s41392-023-01557-7
8. Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity.* 2010;33(4):492-503. doi:10.1016/j.immuni.2010.10.002
9. Batista-Duharte A, Lastre M, Pérez O. Adyuvantes inmunológicos. Determinantes en el balance eficacia-toxicidad de las vacunas contemporáneas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32(2):106-114. doi:10.1016/j.eimc.2012.11.012
10. Edelman R. An update on vaccine adjuvants in clinical trial. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1992;8(8):1409-1411. doi:10.1089/aid.1992.8.1409
11. Schijns VE. Immunological concepts of vaccine adjuvant activity. *Curr Opin Immunol.* 2000;12(4):456-463. doi:10.1016/s0952-7915(00)00120-5
12. Jennings R, Simms JR, Heath AW. Adjuvants and delivery systems for viral vaccines--mechanisms and potential. *Dev Biol Stand.* 1998;92:19-28
13. Duthie MS, Windish HP, Fox CB, Reed SG. Use of defined TLR ligands as adjuvants within human vaccines. *Immunol Rev.* 2011;239(1):178-196. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00978.x
14. O'Hagan DT, van der Most R, Lodaya RN, Coccia M, Lofano G. "World in motion" - emulsion adjuvants rising to meet the pandemic challenges. *NPJ vaccines.* 2021;6(1):158. doi:10.1038/s41541-021-00418-0
15. Roth GA, Gale EC, Alcántara-Hernández M, et al. Injectable Hydrogels for Sustained Codelivery of Subunit Vaccines Enhance Humoral Immunity. *ACS Cent Sci.* 2020;6(10):1800-1812. doi:10.1021/acscentsci.0c00732
16. Adu-Berchie K, Mooney DJ. Biomaterials as Local Niches for Immunomodulation. *Acc Chem Res.* 2020;53(9):1749-1760. doi:10.1021/acs.accounts.0c00341
17. Burny W, Callegaro A, Bechtold V, et al. Different Adjuvants Induce Common Innate Pathways That Are Associated with Enhanced Adaptive Responses against a Model Antigen in Humans. *Front Immunol.* 2017;8:943. doi:10.3389/fimmu.2017.00943

18. Brewer JM, Conacher M, Hunter CA, Mohrs M, Brombacher F, Alexander J. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling. *J Immunol.* 1999;163(12):6448-6454
19. Gavin AL, Hoebe K, Duong B, et al. Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of toll-like receptor signaling. *Science.* 2006;314(5807):1936-1938. doi:10.1126/science.1135299
20. Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature.* 2008;453(7198):1122-1126. doi:10.1038/nature06939
21. Li H, Nookala S, Re F. Aluminum hydroxide adjuvants activate caspase-1 and induce IL-1beta and IL-18 release. *J Immunol.* 2007;178(8):5271-5276. doi:10.4049/jimmunol.178.8.5271
22. Hutchison S, Benson RA, Gibson VB, Pollock AH, Garside P, Brewer JM. Antigen depot is not required for alum adjuvanticity. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2012;26(3):1272-1279. doi:10.1096/fj.11-184556
23. Munks MW, McKee AS, Macleod MK, et al. Aluminum adjuvants elicit fibrin-dependent extracellular traps in vivo. *Blood.* 2010;116(24):5191-5199. doi:10.1182/blood-2010-03-275529
24. Gherardi RK, Coquet M, Cherin P, et al. Macrophagic myofasciitis lesions assess long-term persistence of vaccine-derived aluminium hydroxide in muscle. *Brain.* 2001;124(Pt 9):1821-1831. doi:10.1093/brain/124.9.1821
25. O'Hagan DT, Ott GS, Nest G Van, Rappuoli R, Giudice G Del. The history of MF59(®) adjuvant: a phoenix that arose from the ashes. *Expert Rev Vaccines.* 2013;12(1):13-30. doi:10.1586/erv.12.140
26. Fox CB, Haensler J. An update on safety and immunogenicity of vaccines containing emulsion-based adjuvants. *Expert Rev Vaccines.* 2013;12(7):747-758. doi:10.1586/14760584.2013.811188
27. Calabro S, Tortoli M, Baudner BC, et al. Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. *Vaccine.* 2011;29(9):1812-1823. doi:10.1016/j.vaccine.2010.12.090
28. Seubert A, Calabro S, Santini L, et al. Adjuvanticity of the oil-in-water emulsion MF59 is independent of Nlrp3 inflammasome but requires the adaptor protein MyD88. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(27):11169-11174. doi:10.1073/pnas.1107941108
29. Mosca F, Tritto E, Muzzi A, et al. Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(30):10501-10506. doi:10.1073/pnas.0804699105
30. Stertman L, Palm AKE, Zarnegar B, et al. The Matrix-M™ adjuvant: A critical component of vaccines for the 21(st) century. *Hum Vaccin Immunother.* 2023;19(1):2189885. doi:10.1080/21645515.2023.2189885
31. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2004;75(2):163-189. doi:10.1189/jlb.0603252

-
32. Welsby I, Detienne S, N’Kuli F, et al. Lysosome-Dependent Activation of Human Dendritic Cells by the Vaccine Adjuvant QS-21. *Front Immunol.* 2016;7:663. doi:10.3389/fimmu.2016.00663
 33. Magnusson SE, Reimer JM, Karlsson KH, Lilja L, Bengtsson KL, Stertman L. Immune enhancing properties of the novel Matrix-M™ adjuvant leads to potentiated immune responses to an influenza vaccine in mice. *Vaccine.* 2013;31(13):1725-1733. doi:10.1016/j.vaccine.2013.01.039
 34. Campbell JD, Cho Y, Foster ML, et al. CpG-containing immunostimulatory DNA sequences elicit TNF-alpha-dependent toxicity in rodents but not in humans. *J Clin Invest.* 2009;119(9):2564-2576. doi:10.1172/JCI38294
 35. Bode C, Zhao G, Steinhagen F, Kinjo T, Klinman DM. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines.* 2011;10(4):499-511. doi:10.1586/erv.10.174
 36. Guiducci C, Ott G, Chan JH, et al. Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation. *J Exp Med.* 2006;203(8):1999-2008. doi:10.1084/jem.20060401
 37. Billingsley MM, Singh N, Ravikumar P, Zhang R, June CH, Mitchell MJ. Ionizable Lipid Nanoparticle-Mediated mRNA Delivery for Human CAR T Cell Engineering. *Nano Lett.* 2020;20(3):1578-1589. doi:10.1021/acs.nanolett.9b04246
 38. Didierlaurent AM, Morel S, Lockman L, et al. AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *J Immunol.* 2009;183(10):6186-6197. doi:10.4049/jimmunol.0901474
 39. Morel S, Didierlaurent A, Bourguignon P, et al. Adjuvant System AS03 containing α -tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity. *Vaccine.* 2011;29(13):2461-2473. doi:10.1016/j.vaccine.2011.01.011
 40. Garçon N, Di Pasquale A. From discovery to licensure, the Adjuvant System story. *Hum Vaccin Immunother.* 2017;13(1):19-33. doi:10.1080/21645515.2016.1225635
 41. Lal H, Cunningham AL, Godeaux O, et al. Efficacy of an adjuvanted herpes zoster subunit vaccine in older adults. *N Engl J Med.* 2015;372(22):2087-2096. doi:10.1056/NEJMoa1501184
 42. Audran R, Peter K, Dannull J, et al. Encapsulation of peptides in biodegradable microspheres prolongs their MHC class-I presentation by dendritic cells and macrophages in vitro. *Vaccine.* 2003;21(11-12):1250-1255. doi:10.1016/s0264-410x(02)00521-2
 43. Langer R, Cleland JL, Hanes J. New advances in microsphere-based single-dose vaccines. *Adv Drug Deliv Rev.* 1997;28(1):97-119. doi:10.1016/s0169-409x(97)00053-7
 44. Li X, Wang X, Ito A. Tailoring inorganic nanoadjuvants towards next-generation vaccines. *Chem Soc Rev.* 2018;47(13):4954-4980. doi:10.1039/c8cs00028j
 45. Zhao L, Seth A, Wibowo N, et al. Nanoparticle vaccines. *Vaccine.* 2014;32(3):327-337. doi:10.1016/j.vaccine.2013.11.069
 46. Zhu M, Du L, Zhao R, et al. Cell-Penetrating Nanoparticles Activate the Inflammasome to Enhance Antibody Production by Targeting Microtubule-Associated Protein 1-Light Chain 3 for Degradation. *ACS Nano.* 2020;14(3):3703-3717. doi:10.1021/acsnano.0c00962
-

47. Sekimukai H, Iwata-Yoshikawa N, Fukushi S, et al. Gold nanoparticle-adjuvanted S protein induces a strong antigen-specific IgG response against severe acute respiratory syndrome-related coronavirus infection, but fails to induce protective antibodies and limit eosinophilic infiltration in lungs. *Microbiol Immunol.* 2020;64(1):33-51. doi:10.1111/1348-0421.12754
48. Wang T, Zou M, Jiang H, Ji Z, Gao P, Cheng G. Synthesis of a novel kind of carbon nanoparticle with large mesopores and macropores and its application as an oral vaccine adjuvant. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci.* 2011;44(5):653-659. doi:10.1016/j.ejps.2011.10.012
49. Vallet-Regí M, Balas F, Arcos D. Mesoporous materials for drug delivery. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2007;46(40):7548-7558. doi:10.1002/anie.200604488
50. Jiménez-Periáñez A, Abos Gracia B, López Relañó J, et al. Mesoporous Silicon Microparticles Enhance MHC Class I Cross-Antigen Presentation by Human Dendritic Cells. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013. doi:10.1155/2013/362163
51. Ow H, Larson DR, Srivastava M, Baird BA, Webb WW, Wiesner U. Bright and stable core-shell fluorescent silica nanoparticles. *Nano Lett.* 2005;5(1):113-117. doi:10.1021/nl0482478
52. Colilla M, Balas F, Manzano M, Vallet-Regí M. Novel method to synthesize ordered mesoporous silica with high surface areas. *Solid State Sci.* 2008;10(4):408-415. doi:10.1016/j.solidstatesciences.2007.12.009
53. Niculescu VC. Mesoporous Silica Nanoparticles for Bio-Applications. *Front Mater.* 2020;7(February):1-14. doi:10.3389/fmats.2020.00036
54. Niu Y, Popat A, Yu M, Karmakar S, Gu W, Yu C. Recent Advances in the Rational Design of silica-based Nanoparticles for Gene Therapy. *Ther Deliv.* 2012;3(10):1217-1237. doi:10.4155/tde.12.98
55. Vallet-Regí M, Rámila A, del Real RP, Pérez-Pariente J. A New Property of MCM-41: Drug Delivery System. *Chem Mater.* 2001;13(2):308-311. doi:10.1021/cm0011559
56. Castillo RR, Lozano D, González B, Manzano M, Izquierdo-Barba I, Vallet-Regí M. Advances in mesoporous silica nanoparticles for targeted stimuli-responsive drug delivery: an update. *Expert Opin Drug Deliv.* 2019;16(4):415-439. doi:10.1080/17425247.2019.1598375
57. Lu J, Liong M, Li Z, Zink JL, Tamanoi F. Biocompatibility, biodistribution, and drug-delivery efficiency of mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy in animals. *Small.* 2010;6(16):1794-1805. doi:10.1002/smll.201000538
58. Xu C, Lei C, Yu C. Mesoporous Silica Nanoparticles for Protein Protection and Delivery. *Front Chem.* 2019;7:290. doi:10.3389/fchem.2019.00290
59. Montalvo-Quirós S, Vallet-Regí M, Palacios A, et al. Mesoporous Silica Nanoparticles as a Potential Platform for Vaccine Development against Tuberculosis. *Pharmaceutics.* 2020;12(12). doi:10.3390/pharmaceutics12121218
60. Sreeharsha N, Philip M, Krishna SS, et al. Multifunctional Mesoporous Silica Nanoparticles for Oral Drug Delivery. *Coatings.* 2022;12(3). doi:10.3390/coatings12030358

-
61. López-Gomez A, Real-Arévalo I, Martín-Palma R, Martínez-Naves E, Del Moral MG. Manufacture of Mesoporous Silicon Microparticles (MSMPs) as Adjuvants for Vaccine Delivery. *Methods Mol Biol.* 2023;2673:123-130. doi:10.1007/978-1-0716-3239-0_8
 62. Salonen J, Laitinen L, Kaukonen AM, et al. Mesoporous silicon microparticles for oral drug delivery: loading and release of five model drugs. *J Control release Off J Control Release Soc.* 2005;108(2-3):362-374. doi:10.1016/j.jconrel.2005.08.017
 63. Arévalo IR. *Estudio de La Respuesta Inmunitaria Frente Al Complejo Silicio Mesoporoso-Ca10 (MSMPs-Ca10) Como Vacuna Antineoplásica.* Universidad Complutense; 2022.
 64. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature.* 2007;449(7161):419-426. doi:10.1038/nature06175
 65. Jiménez-Periáñez A, Abos Gracia B, López Relañó J, et al. Mesoporous silicon microparticles enhance MHC class I cross-antigen presentation by human dendritic cells. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013. doi:10.1155/2013/362163
 66. Pastor E, Matveeva E, Valle-Gallego A, Goycoolea FM, Garcia-Fuentes M. Protein delivery based on uncoated and chitosan-coated mesoporous silicon microparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2011;88(2):601-609. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.07.049
 67. Serda RE, Gu J, Bhavane RC, et al. The association of silicon microparticles with endothelial cells in drug delivery to the vasculature. *Biomaterials.* 2009;30(13):2440-2448. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.01.019
 68. Goodman RP, Heilemann M, Doose S, Erben CM, Kapanidis AN, Turberfield AJ. Reconfigurable, braced, three-dimensional DNA nanostructures. *Nat Nanotechnol.* 2008;3(2):93-96. doi:10.1038/nnano.2008.3
 69. Mai J, Li Z, Xia X, et al. Synergistic Activation of Antitumor Immunity by a Particulate Therapeutic Vaccine. *Adv Sci (Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Ger.)* 2021;8(12):2100166. doi:10.1002/advs.202100166
 70. Yamada A, Sasada T, Noguchi M, Itoh K. Next-generation peptide vaccines for advanced cancer. *Cancer Sci.* 2013;104(1):15-21. doi:10.1111/cas.12050
 71. Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(8):557-569. doi:10.1038/nri3254
 72. Böttger R, Hoffmann R, Knappe D. Differential stability of therapeutic peptides with different proteolytic cleavage sites in blood, plasma and serum. *PLoS One.* 2017;12(6):e0178943. doi:10.1371/journal.pone.0178943
 73. Frickenstein AN, Hagood JM, Britten CN, et al. Mesoporous Silica Nanoparticles: Properties and Strategies for Enhancing Clinical Effect. *Pharmaceutics.* 2021;13(4). doi:10.3390/pharmaceutics13040570
 74. Skrastina D, Petrovskis I, Lieknina I, et al. Silica nanoparticles as the adjuvant for the immunisation of mice using hepatitis B core virus-like particles. *PLoS One.* 2014;9(12):e114006. doi:10.1371/journal.pone.0114006
 75. Adam A, Shi Q, Wang B, et al. A modified porous silicon microparticle potentiates protective systemic and mucosal immunity for SARS-CoV-2 subunit vaccine. *Transl Res.* 2022;249:13-27. doi:10.1016/j.trsl.2022.06.004
 76. Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17(3):181-192. doi:10.1038/s41579-018-0118-9
-

77. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19(3):141-154. doi:10.1038/s41579-020-00459-7
78. Wu JT, Leung K, Leung GM. Nowcasting and forecasting the potential domestic and international spread of the 2019-nCoV outbreak originating in Wuhan, China: a modelling study. *Lancet (London, England).* 2020;395(10225):689-697. doi:10.1016/S0140-6736(20)30260-9
79. García-Arriaza J, Garaigorta U, Pérez P, et al. COVID-19 Vaccine Candidates Based on Modified Vaccinia Virus Ankara Expressing the SARS-CoV-2 Spike Protein Induce Robust T- and B-Cell Immune Responses and Full Efficacy in Mice. *J Virol.* 2021;95(7). doi:10.1128/JVI.02260-20
80. Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022;23(1):3. doi:10.1038/S41580-021-00418-X
81. Alejandro García A, Pavón Romero GF, Carreto Binaghi LE, Bandera Anzaldo J, Alvarado Amador I. Etiología y fisiopatología del SARS-CoV-2. *Rev Latinoam Infectología Pediátrica.* 2020;33(s1):5-9. doi:10.35366/96667
82. Qiang XL, Xu P, Fang G, Liu WB, Kou Z. Using the spike protein feature to predict infection risk and monitor the evolutionary dynamic of coronavirus. *Infect Dis poverty.* 2020;9(1):33. doi:10.1186/s40249-020-00649-8
83. Gómez CE, Perdiguero B, Esteban M. Emerging SARS-CoV-2 Variants and Impact in Global Vaccination Programs against SARS-CoV-2/COVID-19. *Vaccines.* 2021;9(3):1-13. doi:10.3390/VACCINES9030243
84. Organización Mundial de la Salud. COVID-19. Published 2024. Accessed November 25, 2024. <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases?n=c>
85. Felsenstein S, Herbert JA, McNamara PS, Hedrich CM. COVID-19: Immunology and treatment options. *Clin Immunol.* 2020;215:108448. doi:10.1016/j.clim.2020.108448
86. Shang J, Ye G, Shi K, et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature.* 2020;581(7807):221-224. doi:10.1038/S41586-020-2179-Y
87. Bakhiet M, Taurin S. SARS-CoV-2: Targeted managements and vaccine development. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2021;58:16-29. doi:10.1016/j.cytogfr.2020.11.001
88. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol.* 2015;1282:1-23. doi:10.1007/978-1-4939-2438-7_1
89. Masters PS, Kuo L, Ye R, Hurst KR, Koetzner CA, Hsue B. Genetic and molecular biological analysis of protein-protein interactions in coronavirus assembly. *Adv Exp Med Biol.* 2006;581:163-173. doi:10.1007/978-0-387-33012-9_29
90. Siu YL, Teoh KT, Lo J, et al. The M, E, and N structural proteins of the severe acute respiratory syndrome coronavirus are required for efficient assembly, trafficking, and release of virus-like particles. *J Virol.* 2008;82(22):11318-11330. doi:10.1128/JVI.01052-08
91. Guo YR, Cao QD, Hong ZS, et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status. *Mil Med Res.* 2020;7(1):11. doi:10.1186/s40779-020-00240-0

-
92. Dabanch J. Emerging Sars-Cov-2. Basic Information About Epidemiology, Origin Source, Structure and Pathogenicity of Sars-Cov-2 for Clinicians. *Rev Medica Clin Las Condes*. 2021;32(1):14-19. doi:10.1016/j.rmcl.2020.12.003
 93. Matheson NJ, Lehner PJ. How does SARS-CoV-2 cause COVID-19? *Science*. 2020;369(6503):510-511. doi:10.1126/science.abc6156
 94. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020;181(2):271-280.e8. doi:10.1016/j.cell.2020.02.052
 95. Luring AS, Hodcroft EB. Genetic Variants of SARS-CoV-2-What Do They Mean? *JAMA*. 2021;325(6):529-531. doi:10.1001/jama.2020.27124
 96. Karlsson EK, Kwiatkowski DP, Sabeti PC. Natural selection and infectious disease in human populations. *Nat Rev Genet*. 2014;15(6):379-393. doi:10.1038/nrg3734
 97. Davies NG, Abbott S, Barnard RC, et al. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science*. 2021;372(6538). doi:10.1126/science.abg3055
 98. Campbell F, Archer B, Laurenson-Schafer H, et al. Increased transmissibility and global spread of SARS-CoV-2 variants of concern as at June 2021. *Euro Surveill Bull Eur sur les Mal Transm = Eur Commun Dis Bull*. 2021;26(24). doi:10.2807/1560-7917.ES.2021.26.24.2100509
 99. Mistry P, Barmania F, Mellet J, et al. SARS-CoV-2 Variants, Vaccines, and Host Immunity. *Front Immunol*. 2021;12:809244. doi:10.3389/fimmu.2021.809244
 100. Walensky RP, Walke HT, Fauci AS. SARS-CoV-2 Variants of Concern in the United States-Challenges and Opportunities. *JAMA*. 2021;325(11):1037-1038. doi:10.1001/jama.2021.2294
 101. Wibmer CK, Ayres F, Hermanus T, et al. SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma. *Nat Med*. 2021;27(4):622-625. doi:10.1038/s41591-021-01285-x
 102. Zhou Z, Zhu Y, Chu M. Role of COVID-19 Vaccines in SARS-CoV-2 Variants. *Front Immunol*. 2022;13:898192. doi:10.3389/fimmu.2022.898192
 103. Liu Y, Rocklöv J. The reproductive number of the Delta variant of SARS-CoV-2 is far higher compared to the ancestral SARS-CoV-2 virus. *J Travel Med*. 2021;28(7). doi:10.1093/jtm/taab124
 104. Willett B, Grove J, MacLean O, et al. The hyper-transmissible SARS-CoV-2 Omicron variant exhibits significant antigenic change, vaccine escape and a switch in cell entry mechanism. *medRxiv*. Published online 2022. doi:10.1101/2022.01.03.21268111
 105. Nishiura H, Ito K, Anzai A, Kobayashi T, Piantham C, Rodríguez-Morales AJ. Relative Reproduction Number of SARS-CoV-2 Omicron (B.1.1.529) Compared with Delta Variant in South Africa. *J Clin Med*. 2021;11(1). doi:10.3390/jcm11010030
 106. Wang L, Berger NA, Kaelber DC, Davis PB, Volkow ND, Xu R. Comparison of outcomes from COVID infection in pediatric and adult patients before and after the emergence of Omicron. *medRxiv Prepr Serv Heal Sci*. Published online January 2022. doi:10.1101/2021.12.30.21268495
-

107. Fiolet T, Kherabi Y, MacDonald CJ, Ghosn J, Peiffer-Smadja N. Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics, efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern: a narrative review. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2022;28(2):202-221. doi:10.1016/j.cmi.2021.10.005
108. Doria-Rose N, Suthar MS, Makowski M, et al. Antibody Persistence through 6 Months after the Second Dose of mRNA-1273 Vaccine for Covid-19. *N Engl J Med.* 2021;384(23):2259-2261. doi:10.1056/NEJMc2103916
109. Barouch DH, Stephenson KE, Sadoff J, et al. Durable Humoral and Cellular Immune Responses 8 Months after Ad26.COV2.S Vaccination. *N Engl J Med.* 2021;385(10):951-953. doi:10.1056/NEJMc2108829
110. Alu A, Chen L, Lei H, Wei Y, Tian X, Wei X. Intranasal COVID-19 vaccines: From bench to bed. *EBioMedicine.* 2022;76:103841. doi:10.1016/j.ebiom.2022.103841
111. (AEMPs) AE del M. Vacunas frente al SARS-CoV-2. Accessed February 21, 2025. <https://www.aemps.gob.es/la-aemps/ultima-informacion-de-la-aemps-acerca-del-covid-19/vacunas-contrala-covid-19/informacion-de-vacunas-autorizadas/#>
112. Jackson LA, Anderson EJ, Roupael NG, et al. An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 - Preliminary Report. *N Engl J Med.* 2020;383(20):1920-1931. doi:10.1056/NEJMoa2022483
113. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science.* 2004;303(5663):1526-1529. doi:10.1126/science.1093620
114. Park JW, Lagniton PNP, Liu Y, Xu RH. mRNA vaccines for COVID-19: what, why and how. *Int J Biol Sci.* 2021;17(6):1446-1460. doi:10.7150/ijbs.59233
115. Naaber P, Tserel L, Kangro K, et al. Dynamics of antibody response to BNT162b2 vaccine after six months: a longitudinal prospective study. *Lancet Reg Heal Eur.* 2021;10:100208. doi:10.1016/j.lanepe.2021.100208
116. Pardi N, Hogan MJ, Naradikian MS, et al. Nucleoside-modified mRNA vaccines induce potent T follicular helper and germinal center B cell responses. *J Exp Med.* 2018;215(6):1571-1588. doi:10.1084/jem.20171450
117. Wang Z, Schmidt F, Weisblum Y, et al. mRNA vaccine-elicited antibodies to SARS-CoV-2 and circulating variants. *Nature.* 2021;592(7855):616-622. doi:10.1038/s41586-021-03324-6
118. Goel RR, Painter MM, Apostolidis SA, et al. mRNA vaccines induce durable immune memory to SARS-CoV-2 and variants of concern. *Science.* 2021;374(6572):abm0829. doi:10.1126/science.abm0829
119. Golob JL, Lugogo N, Luring AS, Lok AS. SARS-CoV-2 vaccines: a triumph of science and collaboration. *JCI insight.* 2021;6(9). doi:10.1172/jci.insight.149187
120. Pollard AJ, Launay O, Lelievre JD, et al. Safety and immunogenicity of a two-dose heterologous Ad26.ZEBOV and MVA-BN-Filo Ebola vaccine regimen in adults in Europe (EBOVAC2): a randomised, observer-blind, participant-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Infect Dis.* 2021;21(4):493-506. doi:10.1016/S1473-3099(20)30476-X

-
121. Mellet J, Pepper MS. A COVID-19 Vaccine: Big Strides Come with Big Challenges. *Vaccines*. 2021;9(1). doi:10.3390/vaccines9010039
 122. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 2010;33(5):657-670. doi:10.1016/j.immuni.2010.11.011
 123. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol*. 2010;31(8):318-324. doi:10.1016/j.it.2010.05.006
 124. Liew PX, Kubes P. The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiol Rev*. 2019;99(2):1223-1248. doi:10.1152/physrev.00012.2018
 125. Ley K, Hoffman HM, Kubes P, et al. Neutrophils: New insights and open questions. *Sci Immunol*. 2018;3(30). doi:10.1126/sciimmunol.aat4579
 126. Sadik CD, Kim ND, Luster AD. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol*. 2011;32(10):452-460. doi:10.1016/j.it.2011.06.008
 127. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532-1535. doi:10.1126/science.1092385
 128. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2007;176(2):231-241. doi:10.1083/jcb.200606027
 129. Yipp BG, Petri B, Salina D, et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med*. 2012;18(9):1386-1393. doi:10.1038/nm.2847
 130. Urban CF, Ermert D, Schmid M, et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog*. 2009;5(10):e1000639. doi:10.1371/journal.ppat.1000639
 131. Wang Y, Li M, Stadler S, et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol*. 2009;184(2):205-213. doi:10.1083/jcb.200806072
 132. Jorch SK, Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat Med*. 2017;23(3):279-287. doi:10.1038/nm.4294
 133. Edwards NJ, Hwang C, Marini S, et al. The role of neutrophil extracellular traps and TLR signaling in skeletal muscle ischemia reperfusion injury. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2020;34(12):15753-15770. doi:10.1096/fj.202000994RR
 134. Vorobjeva N V, Pinegin B V. Neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and role in health and disease. *Biochemistry (Mosc)*. 2014;79(12):1286-1296. doi:10.1134/S0006297914120025
 135. Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature*. 2004;430(6996):257-263. doi:10.1038/nature02761
 136. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801. doi:10.1016/j.cell.2006.02.015
 137. Lim KH, Staudt LM. Toll-like receptor signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(1):a011247. doi:10.1101/cshperspect.a011247
 138. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010;140(6):805-820. doi:10.1016/j.cell.2010.01.022
-

-
139. Prince LR, Whyte MK, Sabroe I, Parker LC. The role of TLRs in neutrophil activation. *Curr Opin Pharmacol*. 2011;11(4):397-403. doi:10.1016/j.coph.2011.06.007
 140. Bowie A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol*. 2000;67(4):508-514. doi:10.1002/jlb.67.4.508
 141. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2001;2(8):675-680. doi:10.1038/90609
 142. Ulevitch RJ. Therapeutics targeting the innate immune system. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(7):512-520. doi:10.1038/nri1396
 143. Charles River. BALB/c mice. Published 2025. <https://www.criver.com/products-services/find-model/balbc-mouse?region=3661>
 144. Laboratory TJ. B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2PrImn/J. Published 2025. <https://www.jax.org/strain/034860>
 145. Laboratory TJ. B6.129P2(SJL)-Myd88tm1.1Defr/J. Published 2025. <https://www.jax.org/strain/009088>
 146. Laboratory TJ. *B6(Cg)-Tlr4tm1.2Karp/J*. 2024. <https://www.jax.org/strain/029015>
 147. Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y.M., Wang, W., Song, Z.G., Hu Y, Tao, Z.W., Tian, J.H., Pei, Y.Y., Yuan, M.L., Zhang, Y.L., Dai FH, Liu, Y., Wang, Q.M., Zheng, J.J., Xu, L., Holmes, E.C. and Zhang YZ. MN908947.3 A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MN908947>
 148. Verma SK, Mahajan P, Singh NK, et al. New-age vaccine adjuvants, their development, and future perspective. *Front Immunol*. 2023;14:1043109. doi:10.3389/fimmu.2023.1043109
 149. Clements CJ, Griffiths E. The global impact of vaccines containing aluminium adjuvants. *Vaccine*. 2002;20 Suppl 3:S24-33. doi:10.1016/s0264-410x(02)00168-8
 150. Hudu SA, Shinkafi SH, Umar S. An overview of recombinant vaccine technology, adjuvants and vaccine delivery methods. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2016;8(11):19-24. doi:10.22159/ijpps.2016v8i11.14311
 151. Lin Q, Zhu L, Ni Z, Meng H, You L. Duration of serum neutralizing antibodies for SARS-CoV-2: Lessons from SARS-CoV infection. *J Microbiol Immunol Infect*. 2020;53(5):821-822. doi:10.1016/j.jmii.2020.03.015
 152. García-Pérez J, González-Pérez M, Castillo de la Osa M, et al. Immunogenic dynamics and SARS-CoV-2 variant neutralisation of the heterologous ChAdOx1-S/BNT162b2 vaccination: Secondary analysis of the randomised CombiVacS study. *EClinicalMedicine*. 2022;50:101529. doi:10.1016/j.eclinm.2022.101529
 153. Navarro-Tovar G, Rocha-García D, Wong-Arce A, Palestino G, Rosales-Mendoza S. Mesoporous Silicon Particles Favor the Induction of Long-Lived Humoral Responses in Mice to a Peptide-Based Vaccine. *Materials (Basel)*. 2018;11(7). doi:10.3390/MA11071083
 154. Lindblad EB. Aluminium adjuvants--in retrospect and prospect. *Vaccine*. 2004;22(27-28):3658-3668. doi:10.1016/j.vaccine.2004.03.032
 155. Virginio VG, Bandeira NC, Leal FMDA, Lancellotti M, Zaha A, Ferreira HB. Assessment of
-

- the adjuvant activity of mesoporous silica nanoparticles in recombinant *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen vaccines. *Heliyon*. 2017;3(1):e00225. doi:10.1016/j.heliyon.2016.e00225
156. Qiao L, Chen M, Li S, et al. A peptide-based subunit candidate vaccine against SARS-CoV-2 delivered by biodegradable mesoporous silica nanoparticles induced high humoral and cellular immunity in mice. *Biomater Sci*. 2021;9(21):7287-7296. doi:10.1039/d1bm01060c
157. Huber VC, McKeon RM, Brackin MN, et al. Distinct contributions of vaccine-induced immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2a antibodies to protective immunity against influenza. *Clin Vaccine Immunol*. 2006;13(9):981-990. doi:10.1128/CVI.00156-06
158. Vukovic N, Segués A, Huang S, Waterfall M, Sijts AJAM, Zaiss DM. Mouse IgG2a Isotype Therapeutic Antibodies Elicit Superior Tumor Growth Control Compared with mIgG1 or mIgE. *Cancer Res Commun*. 2023;3(1):109-118. doi:10.1158/2767-9764.CRC-22-0356
159. Choi JY, Smith DM. SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Yonsei Med J*. 2021;62(11):961-968. doi:10.3349/ymj.2021.62.11.961
160. Reichinger D, Reithofer M, Hohagen M, et al. A Biomimetic, Silaffin R5-Based Antigen Delivery Platform. *Pharmaceutics*. 2022;15(1). doi:10.3390/pharmaceutics15010121
161. Enjuanes L, Zuñiga S, Castaño-Rodríguez C, Gutierrez-Alvarez J, Canton J, Sola I. Molecular Basis of Coronavirus Virulence and Vaccine Development. *Adv Virus Res*. 2016;96:245-286. doi:10.1016/bs.aivir.2016.08.003
162. Channappanavar R, Zhao J, Perlman S. T cell-mediated immune response to respiratory coronaviruses. *Immunol Res*. 2014;59(1-3):118-128. doi:10.1007/s12026-014-8534-z
163. Yang LT, Peng H, Zhu ZL, et al. Long-lived effector/central memory T-cell responses to severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) S antigen in recovered SARS patients. *Clin Immunol*. 2006;120(2):171-178. doi:10.1016/j.clim.2006.05.002
164. Jackson Laboratory. <https://www.jax.org/>
165. Jang HJ, Suh PG, Lee YJ, Shin KJ, Cocco L, Chae YC. PLC γ 1: Potential arbitrator of cancer progression. *Adv Biol Regul*. 2018;67:179-189. doi:10.1016/j.jbior.2017.11.003
166. Roh TH, Chae MK, Ko JS, Kikkawa DO, Jang SY, Yoon JS. Phospholipase C- γ as a Potential Therapeutic Target for Graves' Orbitopathy. *Endocrinol Metab*. 2023;38(6):739-749. doi:10.3803/EnM.2023.1780
167. Wheelock EF. Interferon-Like Virus-Inhibitor Induced in Human Leukocytes by Phytohemagglutinin. *Science*. 1965;149(3681):310-311. doi:10.1126/science.149.3681.310
168. Fenimore J, A Young H. Regulation of IFN- γ Expression. *Adv Exp Med Biol*. 2016;941:1-19. doi:10.1007/978-94-024-0921-5_1
169. Alcolea PJ, Larraga J, Rodríguez-Martín D, et al. Non-replicative antibiotic resistance-free DNA vaccine encoding S and N proteins induces full protection in mice against SARS-CoV-2. *Front Immunol*. 2022;13:1023255. doi:10.3389/fimmu.2022.1023255
170. Ávila-Nieto C, Vergara-Alert J, Amengual-Rigo P, et al. Immunization with V987H-stabilized Spike glycoprotein protects K18-hACE2 mice and golden Syrian hamsters upon SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun*. 2024;15(1):2349. doi:10.1038/s41467-024-46714-w

171. Song E, Zhang C, Israelow B, et al. Neuroinvasion of SARS-CoV-2 in human and mouse brain. *J Exp Med*. 2021;218(3). doi:10.1084/jem.20202135
172. Batista-Duharte A, Lastre M, Pérez O. [Immunological adjuvants. Determinant factors in the efficacy-toxicity ratio of the contemporary vaccines]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014;32(2):106-114. doi:10.1016/j.eimc.2012.11.012
173. He P, Zou Y, Hu Z. Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. *Hum Vaccin Immunother*. 2015;11(2):477. doi:10.1080/21645515.2014.1004026
174. Karacs J, Reithofer M, Kitzmüller C, et al. Adjuvants and Vaccines Used in Allergen-Specific Immunotherapy Induce Neutrophil Extracellular Traps. *Vaccines*. 2021;9(4). doi:10.3390/vaccines9040321
175. Reithofer M, Karacs J, Strobl J, et al. Alum triggers infiltration of human neutrophils ex vivo and causes lysosomal destabilization and mitochondrial membrane potential-dependent NET-formation. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2020;34(10):14024-14041. doi:10.1096/fj.202001413R
176. Kargapolova Y, Geißen S, Zheng R, Baldus S, Winkels H, Adam M. The Enzymatic and Non-Enzymatic Function of Myeloperoxidase (MPO) in Inflammatory Communication. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. 2021;10(4). doi:10.3390/antiox10040562
177. Jia W, Mao Y, Luo Q, Wu J, Guan Q. Targeting neutrophil elastase is a promising direction for future cancer treatment. *Discov Oncol*. 2024;15(1):167. doi:10.1007/s12672-024-01010-3
178. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(3):159-175. doi:10.1038/nri3399
179. Desai J, Foresto-Neto O, Honarpisheh M, et al. Particles of different sizes and shapes induce neutrophil necroptosis followed by the release of neutrophil extracellular trap-like chromatin. *Sci Rep*. 2017;7(1):15003. doi:10.1038/s41598-017-15106-0
180. Lin MH, Lin CF, Yang SC, Hung CF, Fang JY. The Interplay Between Nanoparticles and Neutrophils. *J Biomed Nanotechnol*. 2018;14(1):66-85. doi:10.1166/jbn.2018.2459
181. Stephen J, Scales HE, Benson RA, Erben D, Garside P, Brewer JM. Neutrophil swarming and extracellular trap formation play a significant role in Alum adjuvant activity. *NPJ vaccines*. 2017;2:1. doi:10.1038/s41541-016-0001-5
182. Scapini P, Nardelli B, Nadali G, et al. G-CSF-stimulated neutrophils are a prominent source of functional BLyS. *J Exp Med*. 2003;197(3):297-302. doi:10.1084/jem.20021343
183. Reyes S LI, León B F, Rozas V MF, González J P, Naves P R. BAFF: Una citoquina reguladora de linfocitos B implicada en autoinmunidad y cáncer linfoide. *Rev Med Chil*. 2006;134(9):1175-1184. doi:10.4067/s0034-98872006000900014
184. Ludwig IS, Geijtenbeek TBH, van Kooyk Y. Two way communication between neutrophils and dendritic cells. *Curr Opin Pharmacol*. 2006;6(4):408-413. doi:10.1016/j.coph.2006.03.009
185. Reed SG, Orr MT, Fox CB. Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nat Med*. 2013;19(12):1597-1608. doi:10.1038/nm.3409

-
186. Rahman AH, Zhang R, Blosser CD, et al. Antiviral memory CD8 T-cell differentiation, maintenance, and secondary expansion occur independently of MyD88. *Blood*. 2011;117(11):3123-3130. doi:10.1182/blood-2010-11-318485
 187. Rahman AH, Cui W, Larosa DF, et al. MyD88 plays a critical T cell-intrinsic role in supporting CD8 T cell expansion during acute lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Immunol*. 2008;181(6):3804-3810. doi:10.4049/jimmunol.181.6.3804
 188. Kugelberg E. Innate immunity: Making mice more human the TLR8 way. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(1):6. doi:10.1038/nri3587
 189. Ueda H, Yamaguchi O, Taneike M, et al. Administration of a TLR9 Inhibitor Attenuates the Development and Progression of Heart Failure in Mice. *JACC Basic to Transl Sci*. 2019;4(3):348-363. doi:10.1016/j.jacbts.2019.01.002
 190. Lai CY, Su YW, Lin KI, Hsu LC, Chuang TH. Natural Modulators of Endosomal Toll-Like Receptor-Mediated Psoriatic Skin Inflammation. *J Immunol Res*. 2017;2017:7807313. doi:10.1155/2017/7807313
 191. Gómez DM, Urcuqui-Inchima S, Hernandez JC. Silica nanoparticles induce NLRP3 inflammasome activation in human primary immune cells. *Innate Immun*. 2017;23(8):697-708. doi:10.1177/1753425917738331
 192. Baron L, Gombault A, Fanny M, et al. The NLRP3 inflammasome is activated by nanoparticles through ATP, ADP and adenosine. *Cell Death Dis*. 2015;6(2):e1629. doi:10.1038/cddis.2014.576

AVISO IMPORTANTE – El Curriculum Vitae no podrá exceder de 4 páginas. Para rellenar correctamente este documento, lea detenidamente las instrucciones disponibles en la web de la convocatoria.

IMPORTANT – The Curriculum Vitae cannot exceed 4 pages. Instructions to fill this document are available in the website.

Fecha del CVA 3/03/2025

Part A. DATOS PERSONALES

Nombre	Ana		
Apellidos	López Gómez		
Sexo (*)	Mujer	Fecha de nacimiento (dd/mm/yyyy)	16/06/1997
DNI, NIE, pasaporte	05209833B		
Dirección email	anlope22@ucm.es	URL Web	www.linkedin.com/in/ana-lópez-gómez
Open Researcher and Contributor ID (ORCID) (*)	0000-0002-4601-8324		

* datos obligatorios

A.1. Situación profesional actual

Puesto	CRA TRAINEE		
Fecha inicio	10/02/2025		
Organismo/ Institución	ADKNOMA HEALTHCARE		
Departamento/ Centro			
País	España	Teléfono	690698645
Palabras clave	Ensayos clínicos, monitorización		

A.2. Situación profesional anterior (incluye interrupciones en la carrera investigadora, de acuerdo con el Art. 14. b) de la convocatoria, indicar meses totales)

Periodo	Puesto/ Institución/ País / Motivo interrupción
2024	Personal Laboral Investigador, Universidad Complutense de Madrid, España Fin de proyecto
2022-2023	Personal Laboral Investigador, Universidad Complutense de Madrid, España Fin de proyecto
2021-2022	Personal de Apoyo a la Investigación, Universidad Complutense de Madrid, España Fin de proyecto
2020-2021	Personal de Apoyo a la Investigación, Universidad Complutense de Madrid, España Fin de proyecto

(Incorporar todas las filas que sean necesarias)

A.3. Formación Académica

Grado/Master/Tesis	Universidad/Pais	Año
Doct Investigación Biomédica	Universidad Complutense de Madrid, España	2022-act



Master en monitorización de ensayos clínicos	ESAME	2024-act
Master en Biología Sanitaria	Universidad Complutense de Madrid, España	2019-2021
Grado en Biología	Universidad Autónoma de Madrid, Espa	2015-2019

(Incorporar todas las filas que sean necesarias)

Parte B. RESUMEN DEL CV (máx. 5000 caracteres, incluyendo espacios): **MUY IMPORTANTE: se ha modificado el contenido de este apartado para progresar en la adecuación a los principios DORA. Lea atentamente las “Instrucciones para cumplimentar el CVA”**

Durante los últimos cuatro años, se ha dedicado a la investigación en el departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. En este periodo, ha participado activamente en varios proyectos relacionados con el SARS-CoV-2, destacando mi contribución al macroproyecto europeo denominado REACT (Reacción y Anticipación de la Covid-19), gracias al cual ha podido desarrollar su tesis doctoral.

Su trabajo en el departamento de Inmunología ha estado centrado en el estudio de la respuesta inmunitaria celular y humoral en individuos vacunados y modelos animales inmunizados, así como en el estudio y desarrollo del silicio mesoporoso como nuevo adyuvante. Ha adquirido experiencia en una gran variedad de técnicas, incluyendo citometría de flujo, cultivos celulares, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, así como, en el manejo de animales de experimentación.

De forma simultánea, durante su último año en la facultad de Medicina, colaboró con la empresa *Peaches Biontech* en el análisis histológico de muestras de tumores de páncreas de pacientes, así como, en el análisis, mediante citometría de flujo, de marcadores tumorales de proliferación y agotamiento de esos mismos pacientes.

Ha presentado su trabajo en varios congresos nacionales e internacionales, y ha contribuido a la literatura científica con la publicación de diversos artículos, incluyendo una revisión y un capítulo de libro como primera autora. También ha colaborado en la dirección de estudiantes de diferentes niveles académicos, como máster o técnicos de laboratorio, en conjunto con sus supervisores.

Estas experiencias le han permitido desarrollar y mejorar habilidades en gestión de proyectos, trabajo en equipo, liderazgo y comunicación tanto en inglés como en español.

Desde el punto de vista académico y formativo, ha asistido a diferentes seminarios dentro del programa de doctorado de Investigación biomédica que le han permitido conocer nuevas líneas de investigación tanto dentro como fuera del campo de la inmunología. Además ha ayudado a la divulgación del conocimiento científico a través de la contribución en el desarrollo de proyectos de innovación docente dentro del grado de medicina.

Actualmente se está formando como monitora de ensayos clínicos para continuar aportando su granito de arena a la investigación sanitaria y a la mejora de la calidad de vida de pacientes que sufren diferentes enfermedades.

Part C. LISTADO DE APORTACIONES MÁS RELEVANTES (últimos 10 años)- Pueden incluir publicaciones, datos, software, contratos o productos industriales, desarrollos clínicos, publicaciones en conferencias, etc. Si estas aportaciones tienen DOI, por favor inclúyalo.



C.1. Publicaciones más importantes en libros y revistas con “peer review” y conferencias (ver instrucciones).

AC: autor de correspondencia; (nº x / nº y): posición / autores totales

Si aplica, indique el número de citaciones y promedio por año

Juarez, I., Pérez-Flores, I., Aiffil Meneses, A. S., **Lopez-Gomez, A.**, Calvo Romero, N., Rodríguez-Cubillo, B., Moreno de la Higuera, M. A., Peix-Jiménez, B., Gonzalez-Garcia, R., Amorós-Pérez, B., Rivas-Pardo, B., Baos-Muñoz, E., Arribi Vilela, A., Gómez Del Moral, M., Sánchez-Fructuoso, A. I., & Martínez-Naves, E. (2025). Immunosuppressive Therapy Modifies Anti-Spike IgG Subclasses Distribution After Four Doses of mRNA Vaccination in a Cohort of Kidney Transplant Recipients. *Vaccines*, 13(2), 123. <https://doi.org/10.3390/vaccines13020123>

López-Gomez, A., Real-Arévalo, I., Martín-Palma, R., Martínez-Naves, E., del Moral, M.G. (2023). Manufacture of Mesoporous Silicon Microparticles (MSMPs) as Adjuvants for Vaccine Delivery. In: Reche, P.A. (eds) Computational Vaccine Design. *Methods in Molecular Biology*, vol 2673. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3239-0_8

Lopez-Gomez A, Pelaez-Prestel HF, Juarez I. Approaches to evaluate the specific immune responses to SARS-CoV-2. *Vaccine*. 2023 Oct 13;41(43):6434-6443. doi: 10.1016/j.vaccine.2023.09.033. Epub 2023 Sep 27. PMID: 37770298.

Pérez-Flores I, Juarez I, Aiffil Meneses AS, **Lopez-Gomez A**, Romero NC, Rodriguez-Cubillo B, Moreno de la Higuera MA, Peix-Jiménez B, Gonzalez-Garcia R, Baos-Muñoz E, Vilela AA, Gómez Del Moral M, Martínez-Naves E, Sanchez-Fructuoso AI. Role of mTOR inhibitor in the cellular and humoral immune response to a booster dose of SARS-CoV-2 mRNA-1273 vaccine in kidney transplant recipients. *Front Immunol*. 2023 Feb 2;14:1111569. doi: 10.3389/fimmu.2023.1111569. PMID: 36817489; PMCID: PMC9931894.

C.2. Congresos, indicando la modalidad de su participación (conferencia invitada, presentación oral, póster)

XII Jornada Científica de la Sociedad de Inmunología de la Comunidad de Madrid

Poster

Las vacunas basadas en Microparticulas de Silicio Mesoporoso protegen frente a la infección por SARS-CoV-2. **A. López Gómez**, J. Ausio Cendra, R. Martín Palma, N. Sevilla, E. Martínez Naves, M. Gómez Del Moral.

XXIII Congreso de la Sociedad Española de Histología e Ingeniería tisular

Comunicación oral

NETs formation in response to the use of Mesoporous Silicon Microparticles as an adjuvant for a SARS-CoV-2 vaccine in mice. J. Ausio Cendra, **A. López Gómez**, E. Martínez Naves, N. Cuesta Rubio, M. Gómez Del Moral.



Congreso Europeo de Inmunología 2024

Comunicación oral

Mesoporous Silicon Microparticles as a new adjuvant in a vaccine against the SARS-CoV-2 virus. **A. López Gómez**, J. Ausio Cendra, N. Cuesta Rubio, A. Garcia Culebras, R. Martín Palma, E. Martínez Naves, M. Gómez Del Moral.

44 Congreso de la Sociedad Española de Inmunología (SEI) 2023

Comunicación oral

Estudio del papel de los neutrófilos en la inestímulo frente al SARS-COV-2 con Micropartículas de Silicio Mesoporoso (MSMPs). **A. López Gómez**, I. Real Arévalo, I. Juárez, S. Vazquez Reyes, A. Garcia Culebras, R. Martín Palma, E. Martínez Naves, M. Gómez Del Moral.

XI Congreso de la Sociedad de Inmunología de la Comunidad de Madrid (SICAM) 2023

Poster

Las Micropartículas de Silicio Mesoporoso (MSMPs) activan neutrófilos y monocitos, induciendo CD40. **Ana López-Gómez**, Irene Real Arévalo, Ignacio Juárez, Raquel González García, Beatriz Martín Adrados, Raúl Martín-Palma, Eduardo Martínez-Naves, Manuel Gómez del Moral

43 Congreso de la Sociedad Española de Inmunología (SEI) 2022

Comunicación oral

Mesoporous silicon microparticles (MSMPs) enhance cellular and humoral immune response to SARS-COV-2. **A. López Gómez**, I. Real Arévalo, E. Mayol Hornero, I. Juárez, B. Martín Adrados, R. González García, R. Martín Palma, E. Martínez Naves, M. Gómez Del Moral

Comunicación oral

Mycophenolate & mTOR inhibitors treatment affects the response to mRNA-1273 vaccination in patients with renal transplantation. I. Juárez, I. Pérez-Flores, **A. López-Gómez**, R. González-García, B. Peix-Jiménez, M. Gómez Del Moral, A. Sánchez-Fructuoso, E. Martínez-Nave

Poster

Humoral and cellular responses to BNT162b2 vaccination after haploidentical allogeneic bone marrow transplant in a patient with Sezary Syndrome. **A. López Gómez**, I. Juárez, N. Rossi, L. Horndler, R. González García, N. Martínez-Quiles, B. Alarcón Sánchez, M. Gómez Del Moral, E. Martínez-Naves, J.R. Regueiro



X Congreso de la Sociedad de Inmunología de la Comunidad de Madrid (SICAM) 2022

Comunicación oral

Las micropartículas de silicio mesoporoso (MSMPs) aumentan la respuesta inmunitaria frente al SARS-CoV2. **Ana López Gómez**, Irene Real Arévalo, Elsa Mayol, Ignacio Juárez, Beatriz Martín, Eduardo Martínez-Naves, Manuel Gómez del Moral

Poster

Respuesta celular y humoral tras la vacunación con mRNA-1273 en una cohorte de pacientes con trasplante renal. Ignacio Juárez Martín, Isabel Pérez Flores, **Ana López Gómez**, Beatriz Amorós Pérez, Manuel Gómez del Moral, Ana Isabel Sánchez, Eduardo Martínez Naves

C.3. Proyectos o líneas de investigación en los que ha participado, indicando su contribución personal. En el caso de investigadores jóvenes, indicar líneas de investigación de las que hayan sido responsables .

En todos los proyectos he participado como personal investigador.

PLI1/23-1/2023-18 Protección frente a la infección por SARS-CoV-2 y enfermedades infectocontagiosas.

PID2022-136662OB-I00 Desarrollo de una vacuna de epítomos frente al rinovirus

PR38/21-24 ANTICIPA-CM Anticipación y prevención de COVID-19 en la Comunidad de Madrid

COV20/01101-CM (VIDA COVID) Silicio mesoporoso nanoestructurado como plataforma para el desarrollo de una vacuna para el Covid19

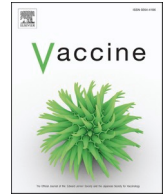
C.4. Participación en actividades de transferencia de tecnología/conocimiento y explotación de resultados *Incluya las patentes y otras actividades de propiedad industrial o intelectual (contratos, licencias, acuerdos, etc.) en los que haya colaborado. Indique: a) el orden de firma de autores; b) referencia; c) título; d) países prioritarios; e) fecha; f) entidad y empresas que explotan la patente o información similar, en su caso.*

He participado como ayudante de profesores de departamento en proyectos de innovación docente

Desarrollo de trípticos informativos sobre temáticas de Inmunología en Medicina

Proyecto N°271: Charlas de investigación como vehículo para la integración de conceptos y la mejora del aprendizaje en ciencias de la salud.

Proyecto N°374: I Olimpiadas de Histología UCM. Aplicación del aprendizaje basado en juegos en el conocimiento de la Histología en el grado en Medicina.



Review

Approaches to evaluate the specific immune responses to SARS-CoV-2

Ana Lopez-Gomez, Hector F. Pelaez-Prestel^{*}, Ignacio Juarez

Department of Immunology, Ophthalmology and ENT, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

SARS-CoV-2
Cellular response
Antibodies
S-protein
COVID-19
ACE2

ABSTRACT

The SARS-CoV-2 pandemic has a huge impact on public health and global economy, meaning an enormous scientific, political, and social challenge. Studying how infection or vaccination triggers both cellular and humoral responses is essential to know the grade and length of protection generated in the population. Nowadays, scientists and authorities around the world are increasingly concerned about the arrival of new variants, which have a greater spread, due to the high mutation rate of this virus. The aim of this review is to summarize the different techniques available for the study of the immune responses after exposure or vaccination against SARS-CoV-2, showing their advantages and limitations, and proposing suitable combinations of different techniques to achieve extensive information in these studies. We wish that the information provided here will help other scientists in their studies of the immune response against SARS-CoV-2 after vaccination with new vaccine candidates or infection with upcoming variants.

1. Introduction

Coronavirus 19 disease (COVID-19) is an infectious disease caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and responsible for the last pandemic [1]. SARS-CoV-2 is an enveloped RNA virus belonging to the *betacoronavirus* family where we find other coronaviruses such as MERS, SARS-CoV or viruses responsible for common colds [2].

SARS-CoV-2 is made up of different proteins which are essential for the cellular and humoral response after infection or vaccination [1]. These proteins are the Nucleocapsid phosphoprotein (N), the Membrane glycoprotein (M), the Envelope protein (E) and the Spike glycoprotein (S). The last one is responsible for the entry of the virus into the cells due to its ability to bind to ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2) present in many of our cells, such as type II alveolar epithelial cells of the lung, stratified epithelial cells of the esophagus, enterocytes of the ileum and colon and myocardial cells among others [3]. This is the reason why

most vaccines are based on the S protein [1].

1.1. Cross-reactivity

Among all human coronaviruses, there are four strains, excluding SARS-CoV-2, with a seasonal cycle of infectivity: HCoV-HKU1, -OC43, -229E and -NL63 [4]. These strains show similarities in their Membrane, Envelope and Nucleocapsid proteins in more than 90 % with SARS-CoV-2, but only around 25–30 % with the Spike protein. Therefore, it is not surprising that there may be cross-reactivity with those antigens of high similarity, which would hinder the determination of specific antibodies against SARS-CoV-2 in these cases [5].

T cell cross-reactivity is characterized by the recognition of two or more peptide-MHC complexes by a single TCR. In other words, T cell can recognize antigens from a pathogen without previous contact, due to the antigenic similarity between proteins belonging to different pathogens, especially those belonging to the same family [6]. Cross-reactivity of

Abbreviations: ACE2, Angiotensin-converting enzyme 2; ADCC, Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity; AIM, Activation Induced Marker; CLIA, Chemiluminescent Assay; COVID-19, Coronavirus 19 disease; DTP, Diphtheria, Tetanus, and Pertussis vaccine; E, Envelope; ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; ELISPOT, Enzyme-linked ImmunoSpot; FLISA, Fluorophore Linked Immunosorbent Assay; HEK, Human Embryonic Kidney Cells; HIV, Human Immunodeficiency Virus; HRP, Horseradish Peroxidase; ICS, Intracellular Cytokine Assay; ILCs, Innate Lymphocyte Cells; K18, Cytokeratin 18 gene; LDH, Lactate Dehydrogenase; LFIA, Lateral Flow Immunoassay; M, Membrane; MERS, Middle East Respiratory Syndrome-related coronavirus; MHC, Major Histocompatibility Complex; MLV, Murine Leukemia Virus; mRNA, Messenger Ribonucleic Acid; N, Nucleocapsid; NK, Natural Killer; NHP, NonHuman Primate; PBMCs, Peripheral Blood Mononuclear Cells; qPCR, Quantitative Polymerase Chain Reaction; RBD, Receptor Binding Domain; S, Spike; SARS-COV, Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus; Tc, T cytotoxic cells; TCR, T Cell Receptor; Th, T helper cells; VSV, Vesicular stomatitis virus.

^{*} Corresponding author.

E-mail address: hpelaez@ucm.es (H.F. Pelaez-Prestel).

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2023.09.033>

Received 6 March 2023; Received in revised form 12 July 2023; Accepted 19 September 2023

Available online 27 September 2023

0264-410X/© 2023 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

specific T cells against SARS-CoV-2 antigens has been observed in 20–50 % healthy unexposed donors when their cells were incubated with viral peptide megapools [4–8], that include several overlapping peptides that cover a complete viral protein. Interestingly, cross-reactivity with different allergens such as pollen or serum albumin [9], and other vaccines, such as DTP vaccine has also been reported [10]. Therefore, it is not surprising that cellular assays show positive response results in non-exposed individuals, so SARS-CoV-2 specific response analysis should be evaluated in a complementary manner.

2. Cellular response

The response to a viral infection is based on the recognition of viral antigens by different cells of the immune system, which generate an effector and memory response, known as the cellular response, in contrast to the humoral (antibody-based) response. Cellular response is fundamental to control SARS-CoV-2 infection and COVID-19 symptomatology and mortality [11]. The differences in SARS-CoV-2 response between patients may be due to virus infectivity and immune system inter-personal variability. Type I IFNs and their signaling pathways are activated during infection, triggering a adaptive immune response, in which B and T cells play the main role, producing antibodies and controlling viral dissemination [12].

T-cell response involves a wide variety of mechanisms and molecules (histocompatibility molecules, peptide processing, antigenic presentation, etc) [11], making cellular response a complex event to study [13]. This response is characterized by IFN- γ , IL-2 and TNF- α production [14] which are T helper (Th1) and T cytotoxic (Tc) related cytokines [15]. It has been previously demonstrated that Th1 response is necessary to control SARS-CoV and MERS-CoV viral infections [13]. Memory T cells are particularly important as a low number of these cells can lead to an increased susceptibility to SARS-CoV-2 infection and severe COVID-19 disease [16].

To develop a protective immunity, vaccines against SARS-CoV-2 should generate a long and effective T cellular response, apart from the production of neutralizing antibodies [17]. In addition, the T cell response must be polarized towards a Th1 phenotype and favor the activation of CD8 T cells, avoiding the T helper 2 (Th2) response [18]. In the case of SARS-CoV-2, the early development of a cytotoxic cellular response has been correlated with greater effectiveness in eliminating the virus and milder disease [4].

2.1. T Cell stimulation

To study the specific response of T cells, it is necessary to use specific peptides from the proteins of the pathogen of interest, being SARS-CoV-2 the main focus of this review [19]. By applying bioinformatics techniques, it is possible to predict specific epitopes for T cells (both CD4 and CD8) and identify those that are more likely to be presented by MHC (class II and I, respectively), and recognized by a TCR. For example, Grifoni et al. [19] generated a megapool of 221 epitopes, which covers the total protein content of the virus. Several megapools are available for studying cellular response against SARS-CoV-2, such as 15 overlapping peptides covering S-protein, an NCAP pool containing 120 peptides from de Nucleocapsid protein or a 420-peptide pool with 11 amino acid overlap which cover the entire S, N and M proteins [17–19]. In order to expand SARS-CoV-2 specific T cells, PBMCs must be stimulated with SARS-CoV-2 peptides for 5–10 days, with regular replacement of the medium [20].

2.2. Determination of cellular response

SARS-CoV-2-specific response can be determined in expanded T cells by several approaches, which will be described below. The advantage and disadvantage of each technique are collected in Table 1.

The study of the T response is essential to determine the effectiveness

Table 1

Advantages and disadvantages of the techniques used to study the cellular response to SARS-CoV-2.

Technique	Advantages	Disadvantages
ELISpot	Quantitative Standardizable Cost-effective	Just one cytokine per sample Doesn't give information about specific cell type
	Adaptive to different cell types and cytokines	Normally require cell expansion Complex test
ICS	Several subpopulations at the same sample Multiplex cytokines Highly sensitive	Sometimes require cell expansion Expensive technique
	Sensitive technique Multiplex cytokines and cell population	Expensive technique Not available in all centers
Whole Blood Stimulation	Easy and fast technique	Antigen must be immunodominant
	Detect general and specific response	

and efficacy of vaccines, as well as to study the immune response during infection. It has been shown that 10 days after vaccination, many individuals generate a robust CD8+ T cell response against SARS-COV-2 which contributes to the protection against subsequent infections. Studying T cell response after vaccination can help to identify people who might benefit from a new dose or new vaccine formulation if they had developed a poor T cell response. ELISpot and Intracellular cytokine assay (ICS) are currently the most widely used techniques for the study of this type of response [4].

2.2.1. Enzyme-linked immunospot (ELISpot)

ELISpot is a functional test for antigen-specific T cells that allows measuring the proportion of T cells that produce cytokines against some antigens, like S, M or N proteins of SARS-CoV-2 [15]. It was 35 years ago when ELISpot assay was first published [22] and it has drastically expanded, being one of the most widely employed assays to measure vaccine-induced responses [15].

This assay has been mainly used to measure cellular response after diseases or vaccination in the general population [21–23]. However, there is a weak correlation between IFN- γ production and vaccine response, so detection of more types of cytokine-producing T cells may be necessary to determine a complete response [21,22]. Also, the expansion of PBMCs with specific peptides will improve this correlation [24]. Depending on the focus of the study, a first step to isolate specific cell types (CD8 or CD4 T cells, B cells, etc) could be necessary to properly identify the populations involved in the response, contrary to those techniques that allow to identify the populations without this first step, such as intracellular cytokine staining by flow cytometry [2,24].

ELISpot is a quantitative technique and standardizable process, which could allow the establishment of thresholds of responding individuals [25]. Also, it is a cost-effective technique, leading to the analysis of big cohorts of individuals, and can be adapted to a wide variety of cell types (CD8 and CD4 T cells, B cells) and cytokines (IFN- γ , IL-2, IL-10, etc). On the other hand, this technique does not give much information about the specific cell type that is producing the cytokines and cannot be used to analyze multiple cytokines in the same sample [13,23].

ELISpot is commonly used to study cellular response measuring IFN- γ after vaccination or infection using peptides from S, N or M proteins. It would be expected the production of IFN- γ against the N protein only in infected individuals [13,26]. This technique also can be used for immunization assays in mice.

Several works had used ELISpot to study SARS-CoV-2 specific T cell response in different contexts, such as cancer [27–30] or immunodeficiency diseases [31]. ELISpot can also be employed to study specific B cell response (see B-cell response section).

2.2.2. Intracellular cytokine assay (ICS)

As mentioned above, cytokine production is one of the main assays employed to determine the response against SARS-CoV-2 infection or vaccination, as T and B cells produce cytokines, such as IFN- γ , IL-2 or TNF- α , upon their activation by viral-specific peptides. However, cellular responses are highly heterogeneous, and the interindividual genetic diversity (especially pronounced in MHC molecules) may result in different cellular subtypes responding to these stimuli [32] or different cytokines produced in responses upon activation [27,33].

Therefore, a technique that can identify in a single assay this variety of responses is highly useful. Intracellular flow cytometry allows this type of approach. By using several antibodies in the same sample, it is possible to identify different cytokines and the cellular subtypes that produce them, without the need for prior antibody-mediated cell isolation processes. This methodology allows to analyze several populations in a complex sample, which gives data about the T cell specificity of the response (CD4 or CD8 T cells), state of maturation of the responses (effector, memory) and, depending on the origin of the sample, the involvement of other minor populations, with a possible role in the response to COVID-19 disease (ILCs, tissue resident T cells) [18,34]. Also, it is a highly sensitive technique [20].

On the other hand, differences between conditions sometimes are subtle enough, requiring an additional expansion step to increase the SARS-CoV-2 specific T cell population. Moreover, it is a complex test, which requires specialized personnel for data collection and interpretation, as well as costly equipment and the consequent expense in reagents (mainly antibodies) used for the detection of the different markers. Thus, we believe that this methodology is more appropriate for scientific research than clinical practice with larger cohorts of patients [18,23].

This assay is used to evaluate cellular response after vaccination or infection and how it changes over the time. It is observed that cellular response lasts up to 8 months after infection, and CD4+ response against SARS-CoV2 proteins is higher than CD8+ response except against N protein [32]. On the other hand, B cell response and antibody production also can be studied by flow cytometry using antibodies anti IgA, IgM and IgG with different fluorophores [35], as we will describe below. This demonstrates the wide variety of data that can be obtained with this technique.

2.2.3. Activation induced marker (AIM) assay

AIM assays are used to identify antigen specific T cells independently of cytokine production [19].

For this assay, it is necessary to stimulate PBMCs with a spike protein pool, as we previously described in this review. The specific CD4+ T cells activation was studied as CD4+ OX40+ and CD137+ cells detected by flow cytometry [36]. OX40 and CD137 are costimulatory receptors that are expressed on activated T cells, and they belong to the TNF receptor family [37]. To study specific cytotoxic T cells activation, CD80, CD69 and CD137 markers can be included in the panel [36]. In addition, long memory effector T cell populations could be analyzed by CD45RA expression analysis [4]. This assay could be combined with the intracellular staining assay, obtaining in a single assay a wide variety of data related to cellular response.

The advantages and disadvantages are similar to those of the intracellular assay, and some of the disadvantages of both studies can be solved by combining both techniques, with the disadvantage of increasing the cost of performing the assay and the need for more complex technical instruments.

As mentioned above, this technique allows the study of different markers such as cell surface markers, activation markers and chemokine receptors at the same time depending on the equipment used [2,37]. For example, higher expression of activation markers and chemokine receptors is observed in mice immunized against SARS-CoV-2 than in non-immunized mice [38]. In the case of SARS-CoV-2, as in other diseases, elevated expression of activation markers is correlated with more severe

disease development [4].

2.2.4. Whole blood stimulation

For this assay 6–10 mL of venous blood is required. 1 mL of this blood is stimulated with peptides and then plasma is harvested [19,38,39]. To detect cytokines a specific ELISA kit of each cytokine is needed following the manufacturer's instructions [39]. Also, cytokines can be detected from plasma 6 h after stimulation [40].

This technique can be used to study general response to SARS-CoV-2 or specific T cell response. In the last case, the nature of the antigen is fundamental, as T cell immunodominant antigens are distributed between S1 and S2, it is very important to stimulate with peptides pools that include the complete S protein [41].

3. Humoral response

One of the main measures of an effective response to vaccination or SARS-CoV-2 infections is the determination of antibodies against the S and N proteins of the virus. In this field, there is a wide diversity of methodologies that allow the identification of antibodies of different isotypes (mainly IgG, IgM and IgA), as well as the ability of these antibodies to block the interaction of the S protein with its ligand on human endothelial cells, the angiotensin-converting enzyme receptor 2 (ACE2), which is the main mechanism of SARS-CoV-2 entry in the host. We will also include in this section methodologies aimed at determining specific B cells against SARS-CoV-2 molecules, since the B response is directly linked to the humoral response [42].

As we described previously, cross-reactivity is relevant in the clinical practice and for determining the prevalence of antibodies in comprehensive studies, where specific antibodies against all SARS-CoV-2 proteins (N, M, E and S) are determined, limiting the detection of responses due to infection in studies that differentiate vaccine-related response of that coming from COVID-19 disease. Therefore, we believe that non-spike specific antibody determination should be supported by additional data, confirming infection in particular cases, such as the periods between doses of vaccination, where avoiding the bias of individuals who have been infected is particularly relevant. These alternative methods could involve confirming COVID-19 by the appearance of clinical signs compatible with the disease, positive SARS-CoV-2 antigen testing or positive PCR of suspected cases.

3.1. Determination of serum antibodies

There are several methods that allow the identification of the humoral response to SARS-CoV-2, many of which are based on the antibody-antigen recognition with minor advantages and disadvantages that condition the use of these techniques in different contexts (Table 2). Some of these are Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA), chemiluminescent ELISA (CLIA), Fluorescent immunoassay (FIA), Fluorophore linked immunosorbent assay (FLISA) or Lateral Flow Immunoassay (LFIA) [43].

3.1.1. Enzyme-Linked ImmunoSorbent assay (ELISA)

This technology is an immunoassay method in which immobilized antigens are detected by antibodies bound to an enzyme capable of producing a colorimetric product, measurable by absorbance. In the case of SARS-CoV-2, the antigen to be detected is one of the viral proteins, and the test sample is patient sera. This technique allows to identify both complete proteins (S, N, M) and subunits (e.g. S1 and S2) or specific domains (e.g. RBD), as well as to quantitatively determine the levels of these antibodies, by means of an antibody pattern of known concentration. This method, as well as the ones described later in this section, have satisfactory clinical performances, especially for IgG, IgA, and total antibodies, requiring a cut-off optimization [44,45].

Table 2

Advantages and disadvantages of the techniques used to study humoral response to SARS-CoV-2.

Technique	Advantages	Disadvantages
ELISA	Quantitative	Just one isotype (IgG, IgA, etc) per assay
	User-friendly	High rate of false positive/negative
	Cost-effective	
CLIA	High specificity and sensitivity	Just one isotype (IgG, IgA, etc) per assay
FIA	Quantitative	Expensive technique
	Multiplex antibodies at the same sample	Fluorescence detection equipment is required
LFIA	Quantitative	Expensive technique
	Fast	Qualitative
Flow Cytometry	User friendly	Just one isotype (IgG, IgA, etc) per assay
	Inexpensive	
	High sensitivity	Flow cytometer is required
	Complementary technique	Appropriated controls are required
ADCC	Multiplex antibodies at the same sample	
	Different methodologies can be used	Limiting used to basic research
	Determination of a specific type of mechanism	
	Complementary technique	

3.1.2. Chemiluminescence immunoassay (CLIA)

The main difference between this technique and ELISA is the use of a chemiluminescent-conjugated secondary antibody, allowing the detection of SARS-CoV-2 specific antibodies by the emission of photons producing light in a specific detector. Although CLIA has a high concordance with ELISA, this technique has a higher specificity and sensitivity for the detection of IgM and IgG, and actually is the most widely employed for the clinical diagnosis [46].

3.1.3. Fluorescence-linked immunosorbent assay (FLISA, also abbreviated as FIA)

As for CLIA and ELISA, FLISA maintains the same antigen–antibody binding rationale, this time using a fluorescent secondary antibody for the detection of serum antibodies.

One of the main advantages of this methodology is the possibility of using several fluorescent antibodies at the same time, thus determining several antibody isotypes in the same test sample [47]. However, fluorescence detection equipment in different channels is not common in all hospitals, so its use is more limited to research in specialized centers, and its use in clinical is less frequent.

3.1.4. Lateral flow immunoassay (LFIA)

With the same basis as the ELISA and its derived techniques, this test allows the detection of specific antibodies against the SARS-CoV-2 virus, with different tests to determine the different isotypes (mainly IgG and IgM) and against different antigens (Spike, Nucleoprotein), which can even be performed simultaneously on the same antigenic strip [48].

As main advantages, it is a fast, user-friendly, and inexpensive test, with capacity to be used as an on-site monitoring system for diagnosis [49]. However, although of great utility for clinical use, its usefulness is limited for laboratory studies, since it is a qualitative technique, and to individual samples.

3.1.5. Recombinant Spike + cells and flow cytometry

The methods described above employ recombinant proteins, which do not always represent the native conformation of proteins in their natural state (e.g., cell membrane-bound Spike protein). As a result, relevant antibodies that detect conformational epitopes presented in natural forms can be missed. Technology that allows proteins to be

expressed natively may be particularly relevant for studying, for example, conformational epitopes, or the neutralizing ability of antibodies under natural conditions.

In this line, several cells with the ability to express the Spike protein on their surface have been developed, mainly for biochemical and characterization studies [50–52] but for this review we will focus on the use of Jurkat-Spike cells as a tool to study specific antibodies against the S protein.

3.2. Jurkat-Spike

These cells express the Spike protein in its original trimeric conformation, allowing the study of antibodies capable of binding to this structure and blocking the original ACE2-Spike binding under native conditions [53], using flow cytometry.

The main advantages are the fact of studying the original native protein, using flow cytometry as a complementary technique to ELISA for the detection of antibodies. The ability to study the blocking of the original Spike-ACE2 binding and the detection of several immunoglobulins isotypes in the same sample [54]. However, its main limitation lies in the need of a flow cytometer for the analysis of the results and the use of appropriate controls to adjust the detection thresholds.

3.2.1. Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC)

After infection, part of the SARS-CoV-2 virus membrane can integrate into the host cell membrane, including part of its proteins, and release their genetic material in the cytoplasm of the cells. In this way, infected cells can express, among others, the Spike protein natively in their membrane, allowing the action of anti-Spike antibodies generated during infection or after vaccination, and potentially leading to antibody-dependent cytotoxicity through NK cells [55].

Some studies have focused on this mechanism to conduct research in various cohorts and settings [56,57], using different methods for the determination of antibody-mediated cytotoxicity. Generically, this methodology consists of using cells expressing the Spike protein on their surface (such as those mentioned in the previous section), a source of antibodies (convalescent patient sera) and cells with the capacity to induce cytotoxicity upon recognition of the Fab region of the anti-Spike antibodies, producing lysis of the target cell. ADCC can be detected by various methodologies, such as intracellular LDH release [58] or flow cytometry with cell death markers [59]. The main advantage of this technique is the determination of a specific type of mechanism, related but not strictly studied by the previously described methods, although this technique has low clinical utility, limiting its use to basic and translational research.

3.3. Neutralizing antibodies

It is well known that SARS-CoV-2 infects human cells by the interaction between its Spike glycoprotein and human ACE2 [60]. Thus, the goal of the current vaccines is eliciting neutralizing antibodies that bind to the Spike glycoprotein impairing the interaction with host cells. In fact, the levels of neutralizing antibodies are highly predictive of immune protection from SARS-CoV-2 infection [61]. Therefore, one of the easiest methods to determine if humoral immune response protects against SARS-CoV-2 severe disease is to measure neutralizing antibodies. They can be measured mainly by three techniques: Plaque reduction neutralization test (PRNT), SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization or SARS-CoV-2 pseudoviruses used in cell cultures in vitro. Nevertheless, all these strategies rely on the same fact: SARS-CoV-2 binds through its Spike glycoprotein to ACE2 to infect human cells. These techniques are summarized in Fig. 1.

3.3.1. Plaque reduction neutralization test (PRNT)

The plaque reduction neutralization test (PRNT) is considered as the gold standard to determine the level of neutralizing antibodies for many

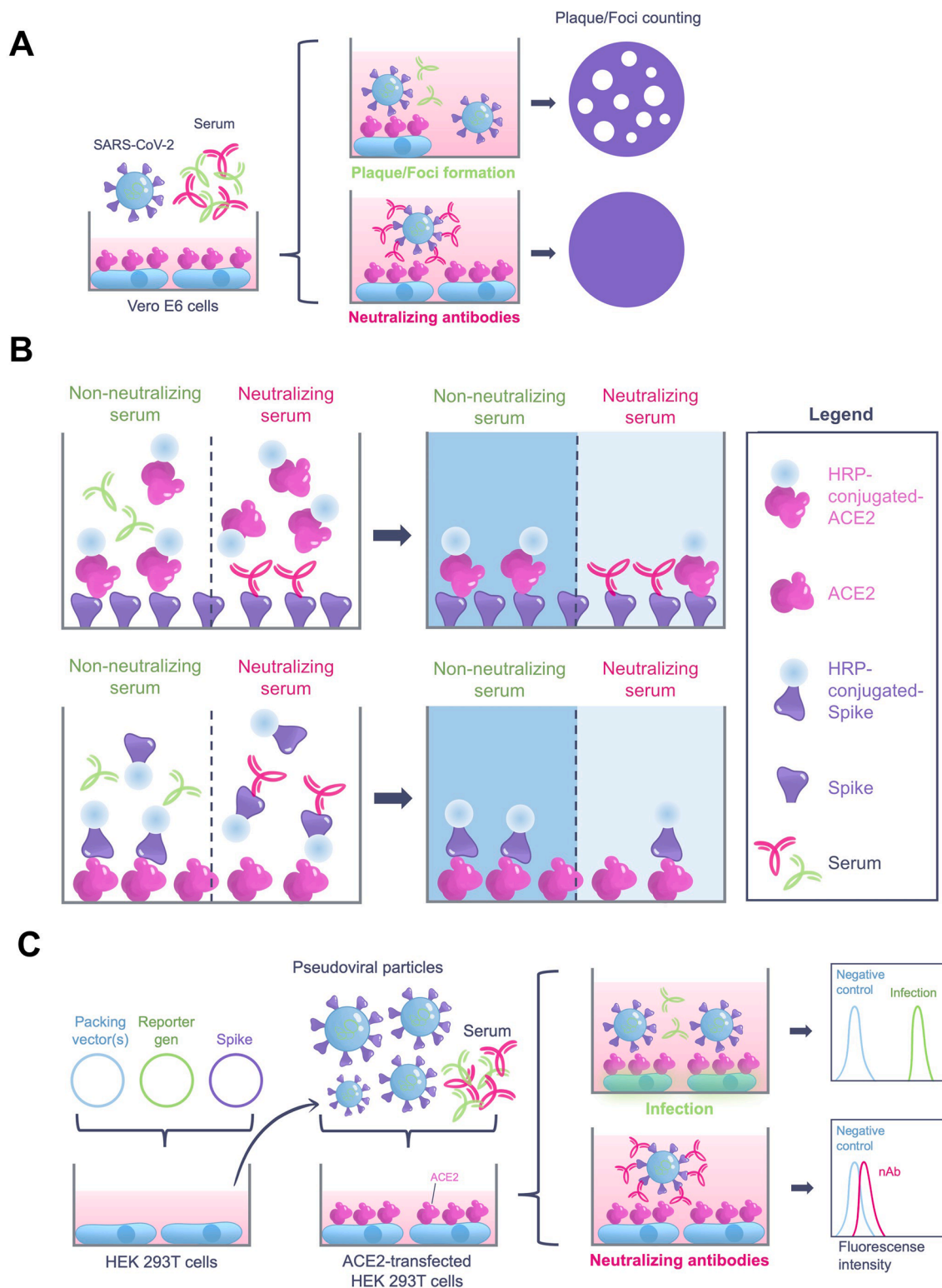


Fig. 1. Detection of neutralizing antibodies. (A) Plaque reduction neutralization test (PRNT): SARS-CoV-2 viruses are incubated with serum containing neutralizing antibodies. Vero E6 cells are infected, and plaques/foci are formed and counted, obtaining the titer of neutralizing antibodies. (B) SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization assay: ELISA plates are coated with the Spike glycoprotein, which is blocked by neutralizing antibodies and then, soluble HRP-conjugated hACE2 is used to determine binding (up). Also, ELISA plates can be coated with hACE2 and anti-SARS-CoV-2 neutralizing antibodies prevent HRP-conjugated Spike glycoprotein from binding to hACE2 (down). Either way, the signal inversely correlates with the neutralizing activity of the serum. (C) SARS-CoV-2 pseudoviruses: HEK 293 T cells are transfected with the plasmids needed for the production of lentiviral SARS-CoV-2 like particles. Then, these viruses are used to infect ACE2-transfected cells and determine the neutralizing activity of a serum.

viral diseases. This classic methodology is based on the cytolytic activity of the virus which forms plaques and foci in the cell culture [62]. For SARS-CoV-2 investigation, the Vero E6 cell line is used since it expresses the ACE2 receptor on its surface. As described by Bewley et al. [63], this methodology allows to determine a percentage of neutralization, expressed as foci neutralization capacity, using the virus-only control (VOC) as reference of 100 % foci formation (100 % unneutralized). The main drawback of this method is the need of a biosafety level 3 facility, so they also described a methodology to use a pseudotyped virus neutralization assay, that can be performed with lower biocontainment (Biosafety Level 2 facilities).

3.3.2. SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization

This technique is a plate-based method similar to an ELISA, where the binding of purified hACE2 to the Spike glycoprotein is determined after incubation with a serum containing neutralizing antibodies. The anti-SARS-CoV-2 neutralizing antibodies can block the Spike, impairing the binding to ACE2. Two approaches can be followed to set up this method. On the one hand, the ELISA plate is coated with hACE2 and the anti-SARS-CoV-2 neutralizing antibodies block HRP-conjugated RBD protein from binding to hACE2 [64]. On the other hand, ELISA plates are coated with the Spike protein, which is blocked by neutralizing antibodies and then, soluble luciferase-conjugated hACE2 is used to determine binding [65]. Either way, the signal inversely correlates with the neutralizing activity of the serum. Different companies have developed commercial kits based on this idea [66,67], but this methodology can be also set up in the laboratory. This methodology has been employed in different works to measure the neutralizing capacity of sera from vaccinated or COVID-19 seropositive individuals [33], and the result is showed as percent of neutralization.

3.3.3. SARS-CoV-2 pseudoviruses

This method to evaluate neutralizing antibody levels consists of an in vitro model that replicates SARS-CoV-2 infection. In order to set this model two elements are needed. On the one hand cell lines over-expressing ACE2 (usually ACE2 transfected HEK-293T). On the other hand, SARS-CoV-2 pseudoviruses that carry the Spike glycoprotein, which mediate cell infection, and a reporter gen to label infected cells.

Regarding the latter part, there are several packing systems to produce SARS-CoV-2 pseudoviruses, which can be found reviewed by Chen et al [68]. The three main systems available are: human immunodeficiency virus (HIV-1)-based lentiviral packaging system; the murine leukemia virus (MLV)-based packaging system; and the vesicular stomatitis virus (VSV) packaging system. Nevertheless, the first one is the most used. Crawford et al [69] report a detailed methodology to easily set up this model. In brief, it consists of transfecting packing cells (usually HEK 293T) with the packing vector(s) encoding non-surface proteins for lentivirus production, a plasmid encoding SARS-CoV-2 Spike glycoprotein and one plasmid encoding the lentiviral backbone expressing a reporter gene. Then, the packing cells produce the viruses, which can be collected from the supernatant a few days later. Many works use these pseudoviruses to infect in vitro ACE2 expressing cells in the presence of human serums from different sources to evaluate the presence of neutralizing antibodies [66,69–71].

However, this model has far more applications like the development of new antibodies [72] or peptide-based therapies [73], or the screening of small-molecule inhibitors and already approved drugs against SARS-CoV-2 [74–76].

Serum is the sample of choice to analyze humoral response, since secreted antibodies are found there. However, SARS-CoV-2 specific B cells can be also tested. In fact, is particularly interesting the presence of memory B cells. Under physiological conditions, memory B cells do not secrete antibodies. However, during infection these cells undergo clonal expansion and differentiate into antibody-secreting plasma cells and memory and germinal center B cells [77]. To assess the presence of a B cell population SARS-CoV-2-specific, several studies use flow

cytometry as preferential method. In this case - like in the cellular response section - samples are PBMCs. In addition, PBMCs can be enriched for B cells by negative selection using a pan-B cell isolation kit [78]. In any case, cells are stained using a panel of antibodies that allow to discriminate memory B cells which can include anti-CD3, anti-CD14, anti-CD56, anti-CD20, anti-CD19, anti-CD38 and anti-CD27. Then, a fluorescent-spike or RBD is used to label the spike specific-B cells. A gating strategy is depicted in Fig. 2A.

ELISPOT is the other method used to study SARS-CoV-2 memory B cells. In this case PBMCs must be first stimulated with a polyclonal B cell stimulator like R848 to induce antibody production from resting memory B cells. Then, these cells are harvest and cultured in a plate pre-coated with RBD or spike to detect specific antibody production (Fig. 2B) [79].

Many studies have followed these strategies to examine the presence of memory B cells after vaccination. Muecksch et al concluded that the third dose of mRNA vaccines against SARS-CoV-2 expands persisting clones of memory B [78]. Ciabattini et al also observed the presence of these cells six months after mRNA vaccination [80]. As well, Jeffery-Smith et al used this strategy to confirm that SARS-CoV-2-specific memory B cells persist in the elderly despite the loss of detectable neutralizing antibodies [79].

Moreover, other methodologies have been described for determining the specific memory B response, as well as for the determination of the BCR repertoire through deep sequencing [81]. While these data are of relevance for the investigation of the long-term B response and the affinity of the BCR for different variables, their practice is less employable in a clinical setting, due to the difficulty in implementing these techniques on a routine basis.

4. Protection against SARS-COV-2 infection

As mentioned in the previous sections, several techniques can be used to determine the humoral and cellular immune response elicited by the SARS-CoV-2 infection or vaccination. However, the lack of standardized thresholds makes it difficult to relate the data of humoral or cellular immunity with real protection or mild infection [82]. As important as knowing if there is cellular or humoral immunity, is to test if this immunity confers real protection against the infection, specially, when the outcome of SARS-CoV-2 variants constantly challenge the immune response elicited by the current vaccines [83].

The term “protection” can be applied either to protection against mucosal infection, protection against serious disease and protection against transmission to others.

Some authors explained the relationship between neutralization level and protection to SARS-CoV-2 and symptomatology. In the work by Khoury et al. [61], the authors described protection as the evasion from infection or protection to severe infection. They evaluated the mean neutralization levels and the protective efficacy of seven vaccines, reported from phase 1, 2, and 3 trials, as well as from a seropositive convalescent cohort. They estimated neutralization level for 50 % protection against detectable SARS-CoV-2 infection at 20.2 %, while the estimated neutralization level required for 50 % protection from severe infection is significantly lower, at 3 %.

Other authors also mentioned that protection also can measured as the ability to attenuate the magnitude and duration of viremia, as long as the virus transmissibility [84], indicating the importance of measuring all types of response (total humoral response, neutralizing activity, and cellular response) to have a global measure of protection against SARS-CoV-2 infection and COVID-19 severity.

In this section we review the methods that can be used to determine protection against SARS-CoV-2 infection, focusing on the use of animal models. In addition, it will be discussed the relevance of epidemiological studies to understand the evolution of this disease and how this could give information about global protection.

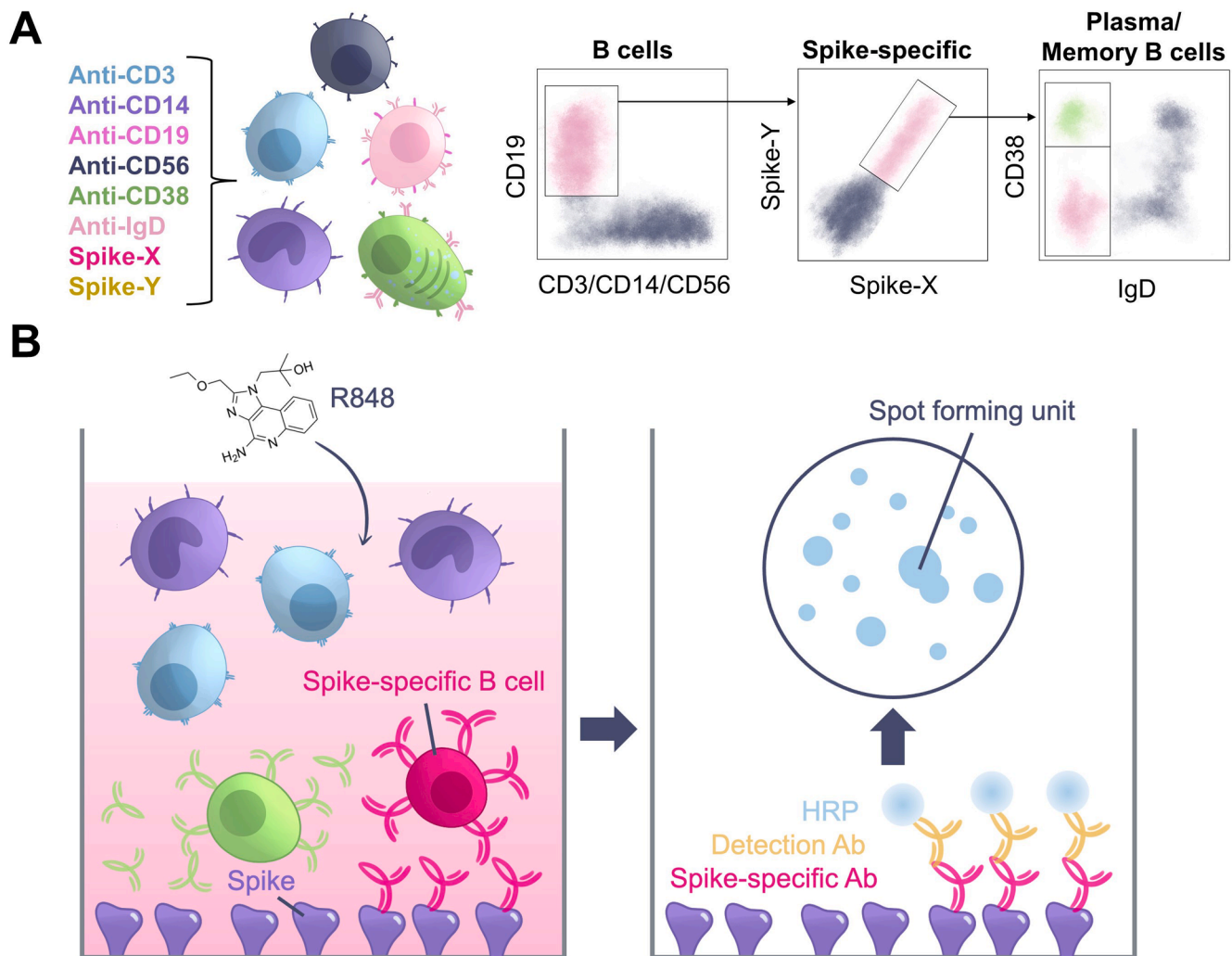


Fig. 2. Study of memory B cells. (A) Gating strategy to study Spike-specific B cells. PBMCs are stained using anti-CD3, anti-CD14, anti-CD19, anti-CD56, anti-CD38, anti-IgD antibodies and fluorescent-labelled SARS-CoV-2 spike glycoproteins. First, B cells are discriminated as a population CD19⁺ and CD3⁻ CD14⁻ and CD56⁻. Then, within the B cells population, Spike⁺ cells are selected, as these cells are specific for the spike glycoprotein of SARS-CoV-2. Finally, memory and plasma B cells can be distinguished by the expression of CD38 and IgD. Plasma B cells are CD38⁺IgD⁻, while memory B cells are CD38⁺IgD⁺. Gating strategy from Ciabattini et al [80]. (B) ELISpot assay for the detection of memory B cells. Plates are coated with the Spike glycoprotein and PBMCs are cultured in the presence of R848 to induce antibody secretion. Then, Spike-specific antibodies are detected, measured as spot forming units (SFU).

4.1. Animal models

4.1.1. Mice models

Mouse is the most used species as model for SARS-CoV-2 *in vivo* studies, despite conventional mice strains cannot be infected with SARS-CoV-2, as its ACE2 receptors differ significantly from the human ACE2, impairing the binding of the virus. To avoid this inconvenience, other species like ferret, syrian hamster, non-human-primate, or fruit bat, have been also used as models. Muñoz-Fonteda et al and Chu et al [85] reviewed the relevance of these models.

Nevertheless, genetically modified mice are the gold standard model for SARS-CoV-2 *in vivo* studies, by introducing hACE2 expression through transgenic, knock-in or viral-vector transduction. Among these models, the K18-hACE2 model, developed by McCray et al in 2007, is currently one of the most used animal models for SARS-CoV-2 investigations [86]. In the K18-hACE2 mice, expression of hACE2 is driven by the human cytokeratin 18 gene (K18) for high-level expression of hACE2 in epithelial cells [86]. K18-hACE2 mice inoculated intranasally with SARS-CoV-2 develop lethal infection causing death and sharing many features with severe COVID-19 infection [87–89].

This model has been used to evaluate the effectiveness of new

therapies and vaccine candidates, as it provides a global idea of protection against SARS-CoV-2. For instance, An et al demonstrated that intranasal immunization with a parainfluenza virus 5 vaccine expressing the SARS-CoV-2 Spike protein, protects k18-hACE2 mice against lethal infection [90]. Oosten et al demonstrated that S1-Nanoparticle Vaccine also protects these mice preventing death [91]. Yiang et al tested the protective activity of Moderna mRNA-1273 vaccine against the new SARS-CoV-2 variants [92,93]. These are only three examples, but many other works can be found where the same strategy is applied. In all these studies, protection is referred to as a set of parameters including viral titers in lung, weight loss or levels of neutralizing antibodies.

4.1.2. Non-Human primate (NHP) models

Non-human primates (NHP) are physiologically, immunologically, and genetically more similar to humans than small animals such as mice or rats [94], so they ought to be the best model to use for pre-clinical trials. However, their use has some inconveniences like their cost, their difficult stabling or the need for specialized personnel to handle it. One of the most important differences between NHP and mice, in relation to the development of vaccines against SARS-CoV-2, is that mice do not have ACE2 receptors, whereas NHP do [95].

Different species of primates such as African green monkeys, *Rhesus macaques* or *Cynomolgus macaques*, can be used for the study of SARS-CoV-2. These animals are very useful for the study of new treatments against COVID-19 and pre-clinical analysis of different vaccines. For example, *Rhesus macaques* were used to evaluate the efficacy of the mRNA-1273 COVID-19 vaccine, more commonly known as Moderna vaccine and strong humoral and cellular response, type Th1 was observed [95,96]. Moreover, the use of NHP allows the evaluation of early markers of protection and immune response [97].

Marie et al used *Cynomolgus macaques*, to study the effects of a new vaccine based on RBD domain and CD40, which target the antigen directly to dendritic cells. This type of studies follows the same protocol as mouse models. They immunized macaques twice four weeks apart and then boosted the animals two weeks before infection, proving that infection is prevented after vaccination [97].

5. Epidemiological studies

Although the studies of protection against SARS-CoV-2 virus infection, described in the previous section are very relevant for determining the effectiveness of vaccines or protection against new variants or strains of the virus, the real measures of protection come from the population data generated worldwide, both from infections (especially in the first waves) and for determining the efficiency of immunity mediated by vaccination.

In this field, there is a great diversity of public databases, and due to the rapid spread of the virus and the high percentage of global vaccination, it is possible to extract a great diversity of epidemiological data, such as the frequency of primary infections, reinfections, morbidity, mortality, and virus infection rate [98,99].

5.1. Infection rate, evolution of transmissibility and variants

The SARS-CoV-2 virus has undergone several mutations that have modified, among others, different amino acids of the Spike protein, which are essential for virus binding to ACE2 and its entry into endothelial cells. These mutations have given rise to different variants, which have changed, among other things, the infection rate of the virus, as well as the efficiency of the initial vaccination regimens [100,101].

Although genetic determination (genotyping) of infections is the unequivocal test to determine the type of variant causing an infection, this methodology is costly and cannot be performed routinely. So, knowing the predominant variant at the time of infection [102], as well as the symptomatology associated with it, is the method most used in epidemiological studies to study the effect of the different variants on cellular and humoral responses in large population groups [103].

As an example of this, several authors have determined the frequency of infection of the different variants and its variation over time has been used to determine the prevalence of SARS-CoV-2 variants without relying entirely on genetic data (more complicated to obtain in large cohorts), extracting in turn data on hospitalization [104], morbidity and vaccination efficacy [100].

Therefore, epidemiological studies are particularly relevant for estimating the effects of the studies related to humoral, cellular, and protective response, described in the previous sections, applied to the general population. We believe that this type of study is the perfect complement to the data obtained in the laboratory, combining all the clinical and laboratory data, and transferring them to the general population. As an example, the article by Menges et al combines cellular and humoral response data with clinical and demographic data, determining that there are several mechanisms by which protection against SARS-CoV-2 infection can be achieved, due to the high complexity of the immune response after vaccination or infection [105]. In this same work, protection against different variants (Wildtype, Delta, and Omicron) is determined, emphasizing that the majority variant during sampling was the original, and providing data on hospitalization,

severity of infection and reinfection.

6. Conclusion

This review has included the most relevant methodologies for assessing both immune response and demographic implication against SARS-CoV-2 virus. Many of the methodologies explained throughout the manuscript can be used both in clinical practice and in the context of laboratory research and can complement each other. Although for clinical practice, those methods with greater reproducibility (such as the determination of antibodies in peripheral blood) and demographic data (compatible symptomatology, knowledge of the predominant variants and morbidity of the disease) are the most useful for prevention, treatment and prescription of new vaccination regimens, the studies with a multidisciplinary approach are those that provide greater information on the overall response and protection against reinfection.

The methodologies described here focus on the study of the SARS-CoV-2 virus, but we believe that this type of approach is scalable and applicable to other types of viral infections and vaccination schedules, although the specific case of COVID-19 has made it possible to test, within a short time frame, the technical possibilities for studying the response to infections from many points of view.

Funding

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

CRedit authorship contribution statement

Ana Lopez-Gomez: Writing – original draft. **Hector F. Pelaez-Prestel:** Writing – original draft. **Ignacio Juarez:** Conceptualization, Writing – original draft.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper. No funding was required for this work. H. F. P-P was supported by FPU 2019 Grant.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

References

- [1] Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* Jan. 2022;23(1):3–20. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>.
- [2] García-Arriaza J, et al. COVID-19 vaccine candidates based on modified vaccinia virus Ankara expressing the SARS-CoV-2 spike induce robust T- and B-cell immune responses and full efficacy in mice. *J Virol* Jan. 2021;95(7). <https://doi.org/10.1128/JVI.02260-20>.
- [3] Soto GP. “Presencia y Expresión del Receptor ACE2 (Target de SARS-CoV-2) en Tejidos Humanos y Cavidad Oral. Posibles Rutas de Infección en Órganos Orales Presence and Expression of ACE2 Receptor (Target of SARS-CoV-2) in Human Tissues and Oral Cavity. Possible Routes Infection in Oral Organs.” 2020.
- [4] Moss P. “The T cell immune response against SARS-CoV-2,” *Nature Immunology*, vol. 23, no. 2. Nature Research, pp. 186–193, Feb. 01, 2022. doi: 10.1038/s41590-021-01122-w.
- [5] Zedan HT, Nasrallah GK. Is preexisting immunity to seasonal coronaviruses limited to cross-reactivity with SARS-CoV-2? A seroprevalence cross-sectional study in north-eastern France. *EBioMedicine* Sep. 2021;71:103580. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103580>.
- [6] Petrova G, Ferrante A, Gorski J. Cross-reactivity of T cells and its role in the immune system. *Crit Rev Immunol* 2012;32(4):349–72. <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v32.i4.50>.
- [7] Le Bert N, et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature* Aug. 2020;584(7821):457–62. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2550-z>.

- [8] Braun J, et al. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. *Nature Nov.* 2020;587(7833):270–4. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2598-9>.
- [9] Balz K, et al. Homologies between SARS-CoV-2 and allergen proteins may direct T cell-mediated heterologous immune responses. *Sci Rep Feb.* 2021;11(1):4792. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84320-8>.
- [10] Reche PA. Potential cross-reactive immunity to SARS-CoV-2 from common human pathogens and vaccines. *Front Immunol* 2020;11(October):1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.586984>.
- [11] Poland GA, Ovsyannikova IG, Kennedy RB. SARS-CoV-2 immunity: review and applications to phase 3 vaccine candidates. *Lancet Nov.* 2020;396(10262):1595–606. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32137-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32137-1).
- [12] Alipoor SD, et al. COVID-19: Molecular and Cellular Response. *Front Cell Infect Microbiol* 2021;11:563085. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.563085>.
- [13] Yuan FF, et al. “Influence of HLA gene polymorphisms on susceptibility and outcome post infection with the SARS-CoV virus. *Virologica Sinica*, vol. 29, no. 2. Netherlands, pp. 128–130, Apr. 2014. doi: 10.1007/s12250-014-3398-x.
- [14] Sekine T, et al. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. *Cell Oct.* 2020;183(1):158–168.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.017>.
- [15] Slota M, Lim J-B, Dang Y, Disis ML. ELISpot for measuring human immune responses to vaccines. *Expert Rev Vaccines Mar.* 2011;10(3):299–306. <https://doi.org/10.1586/erv.10.169>.
- [16] Yuan B, et al. Recurrence of positive SARS-CoV-2 viral RNA in recovered COVID-19 patients during medical isolation observation. *Sci Rep* 2020;10(1):1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68782-w>.
- [17] DiPiazza AT, Graham BS, Ruckwardt TJ. T cell immunity to SARS-CoV-2 following natural infection and vaccination. *Biochem Biophys Res Commun Jan.* 2021;538:211–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.10.060>.
- [18] Anderson EJ, et al. Safety and immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA-1273 vaccine in older adults. *N Engl J Med Dec.* 2020;383(25):2427–38. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2028436>.
- [19] Grifoni A, et al. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell Jun.* 2020;181(7):1489–1501.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.015>.
- [20] Villemonteix J, et al. Comparison between enzyme-linked immunospot assay and intracellular cytokine flow cytometry assays for the evaluation of T cell response to SARS-CoV-2 after symptomatic COVID-19. *Immun Inflamm Dis Oct.* 2022;10(10):e617.
- [21] Scurr MJ, et al. Magnitude of venous or capillary blood-derived SARS-CoV-2-specific T cell response determines COVID-19 immunity. *Nat Commun Sep.* 2022;13(1):5422. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32985-8>.
- [22] Czerkinsky CC, Nilsson LA, Nygren H, Ouchterlony O, Tarkowski A. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods Dec.* 1983;65(1–2):109–21. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90308-3](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90308-3).
- [23] Gray CM, et al. Human immunodeficiency virus-specific gamma interferon enzyme-linked immunospot assay responses targeting specific regions of the proteome during primary subtype C infection are poor predictors of the course of viremia and set point. *J Virol Jan.* 2009;83(1):470–8. <https://doi.org/10.1128/JVI.01678-08>.
- [24] Calarota SA, et al. HIV-1-specific T cell precursors with high proliferative capacity correlate with low viremia and high CD4 counts in untreated individuals. *J Immunol May* 2008;180(9):5907–15. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.9.5907>.
- [25] Ong DSY, Fragkou PC, Schweitzer VA, Chemaly RF, Moschopoulos CD, Skevaki C. How to interpret and use COVID-19 serology and immunology tests. *Clin Microbiol Infect Jul.* 2021;27(7):981–6. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.05.001>.
- [26] Freer G, Rindi L. Intracellular cytokine detection by fluorescence-activated flow cytometry: basic principles and recent advances. *Methods May* 2013;61(1):30–8. <https://doi.org/10.1016/j.jymeth.2013.03.035>.
- [27] Pomsch M, Fisenkci N, Horn PA, Kraemer M, Lindemann M. Evidence of extensive cellular immune response after SARS-CoV-2 vaccination in ocrelizumab-treated patients with multiple sclerosis. *Neurol Res Pract Nov.* 2021;3(1):60. <https://doi.org/10.1186/s42466-021-00158-5>.
- [28] Kakkassery H, Carpenter E, Patten PEM, Irshad S. Immunogenicity of SARS-CoV-2 vaccines in patients with cancer. *Trends Mol Med Dec.* 2022;28(12):1082–99. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2022.07.006>.
- [29] Fendler A, et al. Adaptive immunity and neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 variants of concern following vaccination in patients with cancer: the CAPTURE study. *Nat Cancer Dec.* 2021;2(12):1305–20. <https://doi.org/10.1038/s43018-021-00274-w>.
- [30] Shroff RT, et al. Immune responses to two and three doses of the BNT162b2 mRNA vaccine in adults with solid tumors. *Nat Med Nov.* 2021;27(11):2002–11. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01542-z>.
- [31] Vergori A, et al., “SARS-CoV-2 Specific Immune Response and Inflammatory Profile in Advanced HIV-Infected Persons during a COVID-19 Outbreak,” *Viruses*, vol. 14, no. 7, Jul. 2022, doi: 10.3390/v14071575.
- [32] Olafsdottir TA, et al. HLA alleles, disease severity, and age associate with T-cell responses following infection with SARS-CoV-2. *Commun Biol* 2022;5(1):1–14. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03893-w>.
- [33] Pérez-Flores I, et al. Role of mTOR inhibitor in the cellular and humoral immune response to a booster dose of SARS-CoV-2 mRNA-1273 vaccine in kidney transplant recipients. *Front Immunol Feb.* 2023;14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1111569>.
- [34] Silverstein NJ, et al. Innate lymphoid cells and COVID-19 severity in SARS-CoV-2 infection. *Elife* 2022;11:Mar. <https://doi.org/10.7554/eLife.74681>.
- [35] Hagin D, et al. Immunogenicity of Pfizer-BioNTech COVID-19 vaccine in patients with inborn errors of immunity. *J Allergy Clin Immunol Sep.* 2021;148(3):739–49. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.05.029>.
- [36] Dan JM, et al. A cytokine-independent approach to identify antigen-specific human germinal center t follicular helper cells and rare antigen-specific CD4+ T cells in blood. *J Immunol Aug.* 2016;197(3):983–93. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600318>.
- [37] Gaspar M, et al. CD137/OX40 bispecific antibody induces potent antitumor activity that is dependent on target coengagement. *Cancer Immunol Res Jun.* 2020;8(6):781–93. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-19-0798>.
- [38] Zhuang Z, et al. Mapping and role of T cell response in SARS-CoV-2-infected mice. *J Exp Med Apr.* 2021;218(4). doi: 10.1084/JEM.20202187.
- [39] Scurr MJ, et al. Whole blood-based measurement of SARS-CoV-2-specific T cells reveals asymptomatic infection and vaccine immunogenicity in healthy subjects and patients with solid-organ cancers. *Immunology Feb.* 2022;165(2):250–9. <https://doi.org/10.1111/imm.13433>.
- [40] Petrone L, et al. A whole blood test to measure SARS-CoV-2-specific response in COVID-19 patients. *Clin Microbiol Infect Feb.* 2021;27(2):286.e7–286.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.09.051>.
- [41] Renaudineau Y, et al. Novel T cell interferon gamma release assay (IGRA) using spike recombinant protein for COVID19 vaccine response and Nucleocapsid for SARS-Cov2 response. *Clin Immunol Apr.* 2022;237:108979. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2022.108979>.
- [42] Stefanski A-L, et al. B cell numbers predict humoral and cellular response upon SARS-CoV-2 vaccination among patients treated with rituximab. *Arthritis Rheumatol Jun.* 2022;74(6):934–47. <https://doi.org/10.1002/art.42060>.
- [43] Zheng X, et al. Accuracy of serological tests for COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Front Public Health* 2022;10:923525. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.923525>.
- [44] Tré-Hardy M, et al. Analytical and clinical validation of an ELISA for specific SARS-CoV-2 IgG, IgA, and IgM antibodies. *J Med Virol Feb.* 2021;93(2):803–11. <https://doi.org/10.1002/jmv.26303>.
- [45] Klumpp-Thomas et al. C. “Standardization of ELISA protocols for serosurveys of the SARS-CoV-2 pandemic using clinical and at-home blood sampling. *Nat Commun Jan.* 2021;12(1):113, doi: 10.1038/s41467-020-20383-x.
- [46] Chen D, et al. Comparison of chemiluminescence immunoassay, enzyme-linked immunosorbent assay and passive agglutination for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Ther Clin Risk Manag* 2018;14:1091–7. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S159227>.
- [47] Solaste A, et al. A Highly Sensitive and Specific SARS-CoV-2 Spike- and Nucleoprotein-Based Fluorescent Multiplex Immunoassay (FMIA) to Measure IgG, IgA, and IgM Class Antibodies. *Microbiol Spectr*, Dec. 2021;9(3):e0113121. doi: 10.1128/Spectrum.01131-21.
- [48] Li Z, et al. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *J Med Virol Sep.* 2020;92(9):1518–24. <https://doi.org/10.1002/jmv.25727>.
- [49] Khan MI, et al. Recent progress in nanostructured smart drug delivery systems for cancer therapy: a review. *ACS Appl Bio Mater Mar.* 2022;5(3):971–1012. <https://doi.org/10.1021/acsabm.2c00002>.
- [50] Coutard B, Valle C, de Lamballerie X, Canard B, Seidah NG, Decroly E. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res Apr.* 2020;176:104742. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104742>.
- [51] Johnson MC, et al. Optimized pseudotyping conditions for the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *J Virol Oct* 2020;94(21). <https://doi.org/10.1128/JVI.01062-20>.
- [52] Ou X, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun*, Mar. 2020;11(1):1620. doi: 10.1038/s41467-020-15562-9.
- [53] Horndler L, et al. “Flow cytometry multiplexed method for the detection of neutralizing human antibodies to the native SARS-CoV-2 spike protein.” *EMBO Mol Med Mar.* 2021;13(3):e13549. doi: 10.15252/emmm.202013549.
- [54] Zattoni IF, et al. Multiplexed flow cytometric approach for detection of anti-SARS-CoV-2 IgG, IgM and IgA using beads covalently coupled to the nucleocapsid protein. *Lett Appl Microbiol Jun.* 2022;74(6):863–72. <https://doi.org/10.1111/lam.13674>.
- [55] Ding S, et al. SARS-CoV-2 spike expression at the surface of infected primary human airway epithelial cells. *Viruses Dec* 2021;14(1). <https://doi.org/10.3390/v14010005>.
- [56] Hagemann K, et al. Natural killer cell-mediated ADCC in SARS-CoV-2-infected individuals and vaccine recipients. *Eur J Immunol Aug.* 2022;52(8):1297–307. <https://doi.org/10.1002/eji.202149470>.
- [57] Yu Y, et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity response to SARS-CoV-2 in COVID-19 patients. *Signal Transduct Target Ther*, Sep. 2021;6(1):346. doi: 10.1038/s41392-021-00759-1.
- [58] Hassenrück F, et al. Sensitive detection of the natural killer cell-mediated cytotoxicity of anti-CD20 antibodies and its impairment by B-cell receptor pathway inhibitors. *Biomed Res Int* 2018;2018:1023490. <https://doi.org/10.1155/2018/1023490>.
- [59] Tanaka M, et al. Development of a simple new flow cytometric antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) assay with excellent sensitivity. *J Immunol Methods Jan.* 2019;464:74–86. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2018.10.014>.
- [60] Shang J, et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature May* 2020;581(7807):221–4. <https://doi.org/10.1038/S41586-020-2179-Y>.

- [61] Khoury DS, et al. Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med Jul.* 2021;27(7):1205–11. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01377-8>.
- [62] Herrlein ML, et al. Comparative Investigation of Methods for Analysis of SARS-CoV-2-Spike-Specific Antisera. *Viruses*, Feb. 2022;14(2). doi: 10.3390/v14020410.
- [63] Bewley KR, et al. Quantification of SARS-CoV-2 neutralizing antibody by wild-type plaque reduction neutralization, microneutralization and pseudotyped virus neutralization assays. *Nature Protocols*, Jun. 01, 2021;16(6) *Nature Research*, pp. 3114–3140. doi: 10.1038/s41596-021-00536-y.
- [64] Tan CW, et al. A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2–spike protein–protein interaction. *Nat Biotechnol Sep.* 2020;38(9):1073–8. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0631-z>.
- [65] Kim SJ, et al. Homogeneous surrogate virus neutralization assay to rapidly assess neutralization activity of anti-SARS-CoV-2 antibodies. *Nat Commun Dec.* 2022;13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31300-9>.
- [66] Speer C, et al. Humoral responses to single-dose BNT162b2 mRNA vaccination in dialysis patients previously infected with SARS-CoV-2. *Front Med (Lausanne) Aug.* 2021;8. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.721286>.
- [67] Hofmann N, Grossegeisse M, Neumann M, Schaade L, Nitsche A. Evaluation of a commercial ELISA as alternative to plaque reduction neutralization test to detect neutralizing antibodies against SARS-CoV-2. *Sci Rep Dec.* 2022;12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07597-3>.
- [68] Chen M, Zhang XE. “Construction and applications of sars-cov-2 pseudoviruses: A mini review.” *Int J Biol Sci*, 2021;17(6) Ivyspring International Publisher, pp. 1574–1580. doi: 10.7150/ijbs.59184.
- [69] Crawford KHD, et al. Protocol and reagents for pseudotyping lentiviral particles with SARS-CoV-2 spike protein for neutralization assays. *Viruses May* 2020;12(5). <https://doi.org/10.3390/v12050513>.
- [70] Zettl F, et al. Rapid quantification of SARS-CoV-2-neutralizing antibodies using propagation-defective vesicular stomatitis virus pseudotypes. *Vaccines (Basel) Jul.* 2020;8(3):1–13. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030386>.
- [71] Schwarz M, et al. Rapid, scalable assessment of SARS-CoV-2 cellular immunity by whole-blood PCR. *Nat Biotechnol Nov.* 2022;40(11):1680–9. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01347-6>.
- [72] Iwanaga N, et al. Novel ACE2-IgG1 fusions with improved in vitro and in vivo activity against SARS-CoV2. *bioRxiv Jul.* 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.06.15.152157>.
- [73] Chen J, et al. Inhibition of sars-cov-2 pseudovirus invasion by ace2 protecting and spike neutralizing peptides: An alternative approach to covid19 prevention and therapy. *Int J Biol Sci* 2021;17(11):2957–69. <https://doi.org/10.7150/ijbs.61476>.
- [74] Yang L, et al. Identification of SARS-CoV-2 entry inhibitors among already approved drugs. *Acta Pharmacol Sin Aug.* 2021;42(8):1347–53. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-00556-6>.
- [75] Puhl AC, et al. Title: Repurposing the Ebola and Marburg Virus inhibitors tilorone, quinacrine and pyronaridine: in vitro activity against SARS-CoV-2 and potential mechanisms short running title: Ebola SARS-CoV-2 inhibitors. doi: 10.1101/2020.12.01.407361.
- [76] Zhu Y, Yu D, Yan H, Chong H, He Y. Design of potent membrane fusion inhibitors against SARS-CoV-2, an emerging coronavirus with high fusogenic activity, 2020, doi: 10.1128/JVI.
- [77] Victora GD, Nussenzweig MC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 2012;30:429–57. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075032>.
- [78] Muecksch F, et al. Increased memory B cell potency and breadth after a SARS-CoV-2 mRNA boost. *Nature* 2022;607(7917):128–34. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04778-y>.
- [79] Jeffery-Smith A, et al. SARS-CoV-2-specific memory B cells can persist in the elderly who have lost detectable neutralizing antibodies. *J Clin Invest Jan.* 2022;132(2). <https://doi.org/10.1172/JCI152042>.
- [80] Ciabattini A, et al. Evidence of SARS-CoV-2-specific memory B cells six months after vaccination with the BNT162b2 mRNA vaccine. *Front Immunol* 2021;12:740708. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.740708>.
- [81] Pettini E, Medagliani D, Ciabattini A. “Profiling the B cell immune response elicited by vaccination against the respiratory virus SARS-CoV-2. *Front Immunol* vol. 13. Frontiers Media S.A., Nov. 24, 2022. doi: 10.3389/fimmu.2022.1058748.
- [82] Eyre DW, et al. Stringent thresholds in SARS-CoV-2 IgG assays lead to under-detection of mild infections. *BMC Infect Dis Feb.* 2021;21(1):187. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-05878-2>.
- [83] Ballesteros-Sanabria L, Pelaez-Prestel HF, Ras-Carmona A, Reche PA. Resilience of spike-specific immunity induced by COVID-19 vaccines against SARS-CoV-2 variants. *Biomedicines*, vol. 10, no. 5, Apr. 2022, doi: 10.3390/biomedicines10050996.
- [84] Goldblatt D, Alter G, Crotty S, Plotkin SA. “Correlates of protection against SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease.” *Immunological Reviews*, vol. 310, no. 1. John Wiley and Sons Inc, pp. 6–26, Sep. 01, 2022. doi: 10.1111/imr.13091.
- [85] Muñoz-Fontela C, et al. Animal models for COVID-19. *Nature* 2020;586(7830):509–15. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2787-6>.
- [86] McCray PBJ, et al. Lethal infection of K18-hACE2 mice infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol Jan.* 2007;81(2):813–21. <https://doi.org/10.1128/JVI.02012-06>.
- [87] Yinda CK, et al. K18-hACE2 mice develop respiratory disease resembling severe COVID-19. *PLoS Pathog Jan.* 2021;17(1). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009195>.
- [88] Dong W, et al., “The K18-Human ACE2 Transgenic Mouse Model Recapitulates Non-severe and Severe COVID-19 in Response to an Infectious Dose of the SARS-CoV-2 Virus,” 2022. [Online]. Available: <https://www.worldometers.info/coronavirus/>.
- [89] Winkler ES, et al. SARS-CoV-2 infection of human ACE2-transgenic mice causes severe lung inflammation and impaired function. *Nat Immunol Nov.* 2020;21(11):1327–35. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0778-2>.
- [90] An D, et al., “Protection of K18-hACE2 mice and ferrets against SARS-CoV-2 challenge by a single-dose mucosal immunization with a parainfluenza virus 5-based COVID-19 vaccine,” 2021. [Online]. Available: <https://www.science.org>.
- [91] van Oosten L, et al. An S1-Nanoparticle Vaccine Protects against SARS-CoV-2 Challenge in K18-hACE2 Mice. *J Virol Jul.* 2022;96(14). <https://doi.org/10.1128/jvi.00844-22>.
- [92] Ying B, et al., “Protective activity of mRNA vaccines against ancestral and variant SARS-CoV-2 1 strains 2 3”, doi: 10.1101/2021.08.25.457693.
- [93] Ying B, et al. Boosting with variant-matched or historical mRNA vaccines protects against Omicron infection in mice. *Cell Apr.* 2022;185(9):1572–1587.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.03.037>.
- [94] Lu YR, et al. A preliminary study on the feasibility of gene expression profile of rhesus monkey detected with human microarray. *Transplant Proc Mar.* 2008;40(2):598–602. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2008.01.029>.
- [95] Trichel AM. Overview of Nonhuman Primate Models of SARS-CoV-2 Infection. *Compar. Med.* vol. 71, no. 5. American Association for Laboratory Animal Science, pp. 411–432, Oct. 01, 2021. doi: 10.30802/AALAS-CM-20-000119.
- [96] Corbett KS, et al. Evaluation of the mRNA-1273 Vaccine against SARS-CoV-2 in Nonhuman Primates. *N Engl J Med Oct.* 2020;383(16):1544–55. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2024671>.
- [97] Alexandre M, et al. Modelling the response to vaccine in nonhuman primates to define SARS-CoV-2 mechanistic correlates of protection. *Elife Jul.* 2022;11. <https://doi.org/10.7554/elife.75427>.
- [98] Wahlteiz O, et al. COVID-19 Open-Data a global-scale spatially granular meta-dataset for coronavirus disease. *Sci Data Dec.* 2022;9(1). <https://doi.org/10.1038/s41597-022-01263-z>.
- [99] Shu Y, McCauley J. “GISAID: Global initiative on sharing all influenza data – from vision to reality,” *Eurosurveillance*, vol. 22, no. 13. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Mar. 30, 2017. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.13.30494.
- [100] Lauring AS, et al. Clinical severity of, and effectiveness of mRNA vaccines against, covid-19 from omicron, delta, and alpha SARS-CoV-2 variants in the United States: Prospective observational study. *The BMJ Mar.* 2022;376. <https://doi.org/10.1136/bmj-2021-069761>.
- [101] Andrews N, et al. Covid-19 Vaccine Effectiveness against the Omicron (B.1.1.529) Variant. *N Engl J Med Apr.* 2022;386(16):1532–46. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2119451>.
- [102] Lambrou AS, et al. “Genomic Surveillance for SARS-CoV-2 Variants: Predominance of the Delta (B.1.617.2) and Omicron (B.1.1.529) Variants - United States, June 2021-January 2022.” United States, Feb. 2022. doi: 10.15585/mmwr.mm7106a4.
- [103] Menni C, et al. Symptom prevalence, duration, and risk of hospital admission in individuals infected with SARS-CoV-2 during periods of omicron and delta variant dominance: a prospective observational study from the ZOE COVID Study. *Lancet Apr.* 2022;399(10335):1618–24. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)00327-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00327-0).
- [104] Adjei S, et al. Mortality risk among patients hospitalized primarily for COVID-19 during the omicron and delta variant pandemic periods - united states, April 2020-June 2022. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep Sep.* 2022;71(37):1182–9. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7137a4>.
- [105] Menges D, et al. Heterogenous humoral and cellular immune responses with distinct trajectories post-SARS-CoV-2 infection in a population-based cohort. *Nat Commun Aug.* 2022;13(1):4855. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32573-w>.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Ritthideach Yorsaeng,
Chulalongkorn University, Thailand

REVIEWED BY
Thomas Jouve,
Centre Hospitalier Universitaire de
Grenoble, France
Biagio Pinchera,
University of Naples Federico II, Italy
Morteza Jafarinia,
Shiraz University of Medical Sciences, Iran

*CORRESPONDENCE
Ignacio Juarez
✉ ignajuar@ucm.es

†These authors share first authorship

‡These authors share senior authorship

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Vaccines and Molecular Therapeutics,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

RECEIVED 29 November 2022
ACCEPTED 13 January 2023
PUBLISHED 02 February 2023

CITATION
Pérez-Flores I, Juarez I, Aiffil Meneses AS,
Lopez-Gomez A, Romero NC, Rodriguez-
Cubillo B, Moreno de la Higuera MA, Peix-
Jiménez B, Gonzalez-Garcia R, Baos-
Muñoz E, Vilela AA, Gómez Del Moral M,
Martínez-Naves E and Sanchez-
Fructuoso AI (2023) Role of mTOR inhibitor
in the cellular and humoral immune
response to a booster dose of SARS-CoV-2
mRNA-1273 vaccine in kidney transplant
recipients.
Front. Immunol. 14:1111569.
doi: 10.3389/fimmu.2023.1111569

COPYRIGHT
© 2023 Pérez-Flores, Juarez, Aiffil Meneses,
Lopez-Gomez, Romero, Rodriguez-Cubillo,
Moreno de la Higuera, Peix-Jiménez,
Gonzalez-Garcia, Baos-Muñoz, Vilela,
Gómez Del Moral, Martínez-Naves and
Sanchez-Fructuoso. This is an open-access
article distributed under the terms of the
[Creative Commons Attribution License
\(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or
reproduction in other forums is permitted,
provided the original author(s) and the
copyright owner(s) are credited and that
the original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does not
comply with these terms.

Role of mTOR inhibitor in the cellular and humoral immune response to a booster dose of SARS-CoV-2 mRNA-1273 vaccine in kidney transplant recipients

Isabel Pérez-Flores^{1†}, Ignacio Juarez^{2*†},
Arianne S. Aiffil Meneses¹, Ana Lopez-Gomez²,
Natividad Calvo Romero¹, Beatriz Rodriguez-Cubillo¹,
María Angeles Moreno de la Higuera¹, Belen Peix-Jiménez¹,
Raquel Gonzalez-Garcia², Elvira Baos-Muñoz³, Ana Arribi Vilela³,
Manuel Gómez Del Moral⁴, Eduardo Martínez-Naves^{2‡}
and Ana Isabel Sanchez-Fructuoso^{1‡}

¹Nephrology Department, Institute San Carlos for Medical Research (Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), San Carlos Clinical University Hospital, Madrid, Spain, ²Immunology Department, Complutense University School of Medicine, Madrid, Spain, ³Microbiology Department, Institute San Carlos for Medical Research (Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), San Carlos Clinical University Hospital, Madrid, Spain, ⁴Department of Cell Biology, Complutense University School of Medicine, Madrid, Spain

Background: Immunocompromised patients have an increased risk of developing severe COVID disease, as well as a tendency to suboptimal responses to vaccines. The objective of this study was to evaluate the specific cellular and humoral adaptive immune responses of a cohort of kidney transplant recipients (KTR) after 3 doses of mRNA-1273 vaccine and to determinate the main factors involved.

Methods: Prospective observational study in 221 KTR (149 non infected), 55 healthy volunteers (HV) and 23 dialysis patients (DP). We evaluated anti-spike (by quantitative chemiluminescence immunoassay) and anti-nucleocapsid IgG (ELISA), percentage of TCD4⁺ and TCD8⁺ lymphocytes producing IFN γ against S-protein by intracellular flow cytometry after Spike-specific 15-mer peptide stimulation and serum neutralizing activity (competitive ELISA) at baseline and after vaccination.

Results: Among COVID-19 naïve KTR, 54.2% developed cellular and humoral response after the third dose (vs 100% in DP and 91.7% in HV), 18% only showed cell-mediated response, 22.2% exclusively antibody response and 5.6% none. A correlation of neutralizing activity with both the IgG titer ($r=0.485$, $p<0.001$) and the percentage of S-protein-specific IFN γ -producing CD8-T cells ($r=0.198$, $p=0.049$) was observed. Factors related to the humoral response in naïve KTR were: lymphocytes count pre-vaccination $>1000/\text{mm}^3$ [4.68 (1.72-12.73, $p=0.003$), eGFR >30 mL/min [7.34(2.72-19.84), $p<0.001$], mTOR inhibitors [6.40 (1.37-29.86), $p=0.018$]. Infected KTR developed a stronger serologic response than naïve patients (96.8 vs 75.2%, $p<0.001$).

Conclusions: KTR presented poor cellular and humoral immune responses following vaccination with mRNA-1273. The immunosuppression degree and kidney function of these patients play an important role, but the only modifiable factor with a high impact on humoral immunogenicity after a booster dose was an immunosuppressive therapy including a mTOR inhibitor. Clinical trials are required to confirm these results.

KEYWORDS

kidney transplantation, SARS-CoV-2 vaccine, immune response, COVID-19, mTOR

Introduction

The coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic has caused more than 6 million deaths worldwide (1), with immunocompromised individuals being particularly affected by severe conditions of this disease (2). Vaccination against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has been revealed as the most effective measure to control this pandemic, leading to a marked reduction in infections, hospital admissions and mortality (3). Individuals with COVID-19 who have undergone solid organ transplant (SOT) experience higher mortality and prolonged viral shedding compared with the general population (4–7). However, recipients of SOT were excluded from the initial licensing trials of these vaccines. Kidney transplant recipients (KTR), who undergo pharmacological immunosuppression as basic therapy to prevent transplant rejection, are at risk of a defective response to vaccination, as already occurs with other vaccines (8). In contrast to immunocompetent participants in vaccine trials (9), a low proportion of SOT recipients mount a positive antibody response to the second dose of SARS-CoV-2 messenger RNA (mRNA) vaccines. Studies have reported varying results in antibody response rates of approximately 5%–50% after two doses of mRNA vaccine in KTR (10–15). Due to this low response, an additional primary shot (third dose of mRNA COVID-19 vaccine for those receiving BNT162b2 or a booster dose of mRNA-1273) was recommended. Several published studies have reported the humoral immunogenicity of a three-dose vaccination schedule, but only a few have assessed the contribution of the cellular arm to vaccine-mediated protection (16–18). These results would allow us to determine if this regimen is sufficient to achieve a generalized response in these patients and would help us discern what type of immunosuppressive agents could cause a greater increase in the vaccine response.

Abbreviations: ACE2, angiotensin-converting enzyme 2; BAU, binding antibody units; CI, confidence interval; COVID-19, coronavirus disease 2019; CNI, calcineurine inhibitors; DP, dialysis patients; eGFR, estimated glomerular filtration rate; HV, healthy volunteers; IFN γ , Interferon gamma; IgG, immunoglobulin G; IQR, interquartile range; KTR, kidney transplant recipients; MPA, Mycophenolic acid; mRNA, messenger RNA; mTORi: mammalian Target Of Rapamycin inhibitors; OR, odds ratio; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; RBD, receptor-binding domain; RT, room temperature; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; SD, standard deviation; SOT, solid organ transplant.

In this study, we assessed antibody and cellular response after the third dose of mRNA-1273 vaccine in a cohort of KTR. We focused on the analysis of the cellular response and the neutralization capacity of the patients' sera after the third dose.

Methods

Study design and sample collection

We performed a prospective study of a cohort of 221 KTR who received 3 doses of mRNA-1273 vaccine (Moderna-NIAID). Two cohorts with the same vaccination regimen, 55 healthy volunteers (HV) and 23 dialysis patients (DP), were also included as internal controls for the study. Patients and controls who became infected previously or during follow-up were excluded from the analysis of vaccine effectiveness.

We collected blood samples prior to vaccination (P0), 15 days (P1) and three months (P2) after the administration of the second dose, and 2 months after the third dose (P3).

The study was performed in accordance with the ethical standards as laid down in the Declarations of Helsinki and approved by the local ethics committee. Written informed consent was obtained from all subjects before the blood samples were taken.

Patients

All KTR followed up in outpatient Kidney Transplantation Department between March 1 and April 15, 2021 and wanted to be vaccinated were included. All patients received the same kind of vaccine, mRNA-1273: a first and second dose (100 μ g each dose) between April 20 and May 30, 2021 and third vaccine dose (100 μ g) between September 20, and October 30, 2021. Inclusion criteria were: (1) being >18 years old, (2) History of kidney transplant for at least 6 months, and (3) Approval of informed consent to the study. As exclusion criteria; (1) having a history of malignancy, (2) SOT different from kidney, (3) primary immunodeficiency disease, (4) having a previous history of allergy to any inactivated vaccine, and (4) having an unexplained 37.5°C fever or any symptoms of infection.

Controls

To characterize the impact of posttransplant immunosuppression on the ability of vaccination to elicit SARS-CoV-2-specific immunity,

we used a control group of 78 non-immunocompromised, 55 healthy volunteers (HV) and 23 dialysis patients (DP). HV were healthcare workers who received mRNA-1273 and wanted to participate in the study. DP group was made up of 12 patient on hemodialysis and 11 on peritoneal dialysis who also received Moderna-NIAID vaccine. We obtained samples from HV at equivalent time intervals under the same conditions as KTR. For DP, only the sample corresponding to the third dose (P3) was obtained.

For both patients and controls, meeting any of the exclusion criteria throughout the study implied the individual's exit from the study, as shown in the study flowchart (Figure 1).

SARS-CoV-2 serology

Sera were obtained and stored at -80°C until use. Quantitative SARS-CoV-2 anti-spike (S) IgG test (SARS-CoV-2 IgG II Quant; Abbott Diagnostics) was performed in the Abbott Architect device in accordance with the manufacturer's recommendations. This antibody test is based on the principle of chemiluminescence microparticle immunoassay test. As the test gives data as AU/mL units, we applied a conversion factor in order to ease the comparison with other

standardized serologic assessments, and quantitative results are given in BAU/mL (binding antibody units per mL, $\text{BAU/mL} = \text{AU/mL} \times 0.142$). Samples with $\text{BAU/mL} \geq 7.1$ are considered positive for SARS-CoV-2 IgG antibodies, the manufacturer-suggested thresholds (detection range, 2.8–16480 BAU/mL; positive agreement, 99.4%; negative agreement, 99.6%).

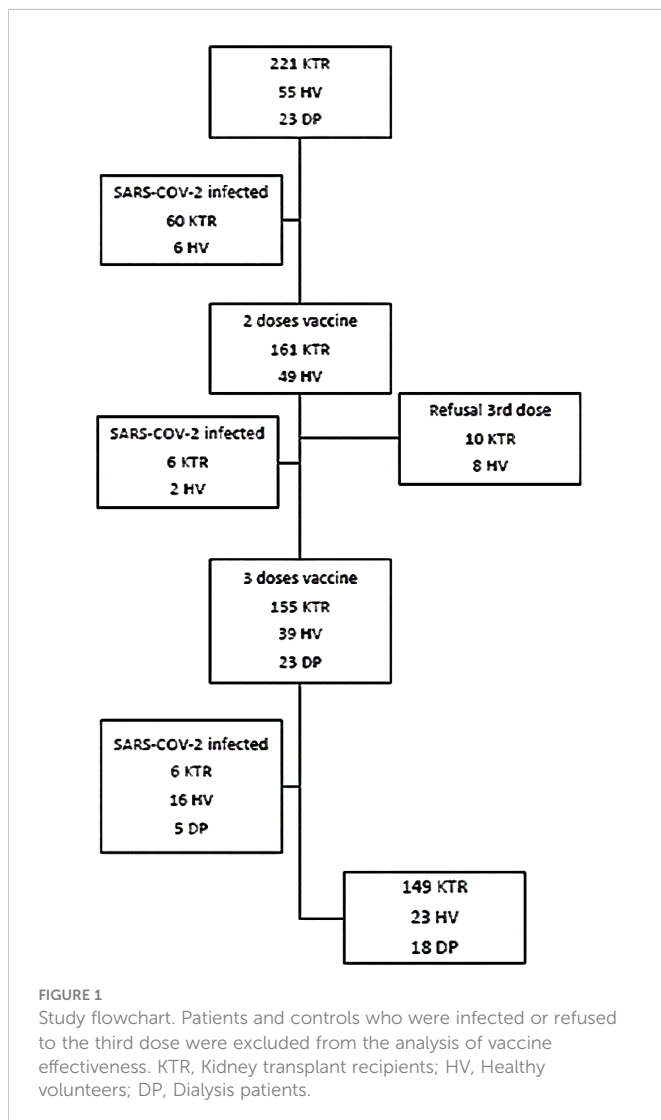
To determine which subjects had been infected prior to vaccination or in periods between sample collections, the presence of anti-Nucleoprotein (N) antibodies was tested by ELISA. Briefly, 96-well flat-bottom plates were coated with $2 \mu\text{g/mL}$ SARS-CoV-2 N-protein and 1:100 dilutions of the sera were incubated for 30 minutes at room temperature (RT), washed 5 times and detected with a goat anti-human IgG HRP-conjugated antibody (ThermoFisher Scientific). ELISA was developed with TMB and HCl and measured at 430 nm. To establish the cut-off of anti-N antibodies, we used the value of the mean plus twice the standard deviation (95% CI) of the absorbance value at 430nm of 8 pre-pandemic sera (PCR negative, anti-S IgG negative and with no COVID-19 compatible symptoms) per ELISA plate.

Cell-mediated immunity

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained by density gradient isolation with Lymphocyte Separation Medium reagent (Corning Life Sciences). Cells were maintained in RPMI 1640 (Corning Life Sciences) supplemented with 10% FBS (Gibco), 100 mg/mL streptomycin (Gibco), and 100U/mL penicillin (Gibco). Cells were stimulated with 15-mer overlapping peptide-pool covering immunodominant domain surface Spike-protein (PepTivator[®] SARS-CoV-2 Prot-S, Miltenyi Biotec) or with 10% DMSO for 6 hours at 37°C and 5% CO_2 in the presence of Brefeldin A (Thermo-Scientific) during the last 4 hours of the assay. After stimulation, surface staining with anti-CD3-FITC (UCHT1), CD4-PE (OKT4) and CD8-PE/Cy7 (SK1) antibodies (Biolegend) was performed for 30 minutes at 4°C . After staining, they were fixed with 4% PFA for 30 min and permeabilized with 0.05% PBS Tween-20 (Thermo-Scientific) for 30 min at RT. Cells were stained with anti-IFN γ -APC antibody (B27) (Biolegend) for 30 min at RT. Staining was acquired on a FACSCalibur cytometer and analyzed with FlowJo v10 software (BD Life Sciences). Since the lower limit of detection for conventional flow cytometry techniques is ~ 0.02 to 0.05%, we set 0.05% as the lower limit for considering the cellular response positive for both T-CD4 and T-CD8.

ACE2-RBD neutralizing activity of the sera

To determine the ACE2-Spike (RBD) neutralizing activity of sera, we employed a competitive ELISA assay. 96 well-plate were coated with $2 \mu\text{g/mL}$ of recombinant RBD (Miltenyi Biotec) for 16h and incubated with $100 \mu\text{L}$ of the sera (1:25) for 1h at RT. After incubation, the plate was washed 5 times with 0.05% PBS-Tween and $0.5 \mu\text{g/mL}$ of recombinant ACE2-biotin (Miltenyi Biotec) was added at 37°C for 1 hour. After a washing step, a final incubation with $1 \mu\text{g/mL}$ of streptavidin-HRP (Biolegend) was performed for 1 hour at 37°C . The interaction was retrieved with TMB and HCl (Thermo-Scientific) and absorbance is measured at 450 nm. To establish the maximum ACE2-RBD interaction,



a pre-pandemic serum previously tested negative for anti-Spike antibody (0 BAU/mL) was used. From the maximum absorbance data, the decrease in signal of each serum with respect to the maximum was extrapolated to obtain the percentage neutralization data of each sample.

Statistical analysis

Quantitative data were reported as mean and standard deviation (SD) or the median with interquartile range (IQR). Qualitative variables were expressed as absolute and relative frequencies.

Categorical variables were compared using the χ^2 test. The Student's *t* test or the Mann-Whitney U test was used for continuous variables. Repeated measures were compared with the Wilcoxon signed-rank test or the McNemar test, as appropriate. Correlations between continuous variables were evaluated with Spearman's rho. Logistic regression served for assessment of factors related to immune response. All factors showing a univariate association with a *p*-value < 0.100 were entered in the final multivariate model. All calculations were performed using GraphPad Prism version 8.0 (GraphPad) and SPSS version 25.0 (IBM). *P* < 0.05 (2-sided) was considered statistically significant.

Results

Study population

Antibody response to the vaccine was determined in a total of 221 KTR and cellular immunity in 213 of them (viable T cells could not be obtained in 8 samples). Fifty-two patients (23.5%) had a history of prior COVID-19 diagnosed 12 months ago, 11 of them met criteria for severe COVID-19. Eight KTR became infected between the first and second dose of vaccine, six patients after the second dose and six after the third (9%), all of them with mild symptoms (Figure 1). The main clinical, analytic, and demographic characteristics of this cohort, *naïve* and infected KTR, are described in Table 1S. There were not significant differences in laboratory parameters during follow up in both groups (data not shown).

Non transplant control group made up of HV were younger than KTR [30 (± 8) vs 57 (± 15) years, *p* < 0.001], while DP were similar in age [56 (± 13) years]. The incidence of SARS-CoV-2 infection, assessed by PCR or positivity against N-protein in HV was 11% (6/55) at baseline, 4% (2/49) after the second dose and 34% (16/47) after the third dose and 5/23 in DP after the third dose (Figure 1). Patients and controls who were infected were also analyzed to see if there were differences between them, but they were excluded from the analysis of vaccine effectiveness.

SARS-CoV-2-specific cell-mediated immunity and correlation with total and neutralizing titers against the S-protein after the third vaccine dose

The proportion of positive S-protein-specific cell-mediated response after the third dose were lower in KTR compared to DP

and HV ones: 59.3% of KTR showed reactive CD4-T cells vs 88.2% of HV and 100% of DP (*p* = 0.008); 66% of KTR showed reactive CD8-T cells vs 100% in DP and 91.7% in HV (*p* = 0.004). CD4 or CD8 reactivity was present in 76.7% of KTR vs 100% in DP and 91.7% in HV, *p* = 0.033 (Figures 2A, B). There were not significant differences in the intensity of cellular response between groups (Figure 2C).

Analyzing humoral and cellular response in COVID-19 naïve KTR, 54.2% (78/144) had both responses, 18% (26/144) mounted cell-mediated responses without IgG response, 22.2% (32/144) only developed antibody response and 5.6% (8/144) did not develop any response.

In COVID-19 naïve KTR with positive cellular response, there was a significant correlation between the percentage of S-protein-specific IFN γ -producing CD8-T cells and total anti-S IgG titers after the third dose (P3: *r* = 0.210, *p* = 0.043) and between the percentage of S-protein-specific IFN γ -producing CD8-T cells and neutralizing titers against the S-protein (P3: *r* = 0.307, *p* = 0.004). No correlation was found between CD4-T cells and humoral response. In the univariate analysis we did not find any parameter that could predict the cellular response (Table 1).

SARS-CoV-2 IgG antibody response and serum ACE2-RBD neutralizing activity. Strong impact of immunosuppressive therapy

Using the manufacturer-suggested thresholds, the rate of IgG seropositivity in COVID-19 naïve KTR was 44.1% (74/161) at 15 days (P1) and 58% (90/155) at 3 months (P2) after the second dose. This rate increased to 76.5% (114/149) at 2 months after the booster dose (P3). Significant differences in the humoral response were observed with the control group: 100% positivity in the three points in HV and 100% in DP after the third dose (*p* < 0.001) (Figure 3A). Likewise, the serum anti-spiked IgG titers were higher in HV compared to KTR after the second (*p* < 0.001) and the third dose (*p* < 0.001) (Figure 3B). The evolution of IgG titers also differed between the control population and the KTRs (*p* < 0.001). Some KTR showed a delay in antibody production as seen on (Supplementary Figure 1).

The factors associated with humoral immunogenicity in KTR are describe in Tables 1, 2.

Antibody titers were correlated to kidney function measured by estimated glomerular filtration rate (eGFR) (P1: *r* = 0.333, P2: *r* = 0.482, P3: *r* = 0.550, *p* < 0.001). KTR with better renal function pre-vaccination (eGFR > 30 mL/min/1.73 m²) achieved a higher humoral response rate than those with lower renal function after the second and third dose (P1: 48.3 vs 27.3%, *p* = 0.032; P2: 63.5 vs 34.4%, *p* = 0.003; P3: 84.5 vs 42.4%, *p* < 0.001).

On the other hand, those patients with lymphocyte count greater than 1000/mm³ were almost five times more likely to respond after the second [P2: OR 4.46 (1.64-12.13 CI), *p* = 0.003] and third dose [P3: OR 4.68 (1.72-12.73 CI), *p* = 0.003]. A correlation between lymphocyte count and antibody titers were also detected (P1: *r* = 0.185, *p* = 0.017; P2: *r* = 0.263, *p* = 0.001, P3: *r* = 0.284, *p* < 0.001).

Finally, the immunosuppressive therapy also had an influence on the antibody as can be seen in Tables 1, 2. Non-responders after the second dose were more frequently under MPA (P1: 82.9 vs 33.9%,

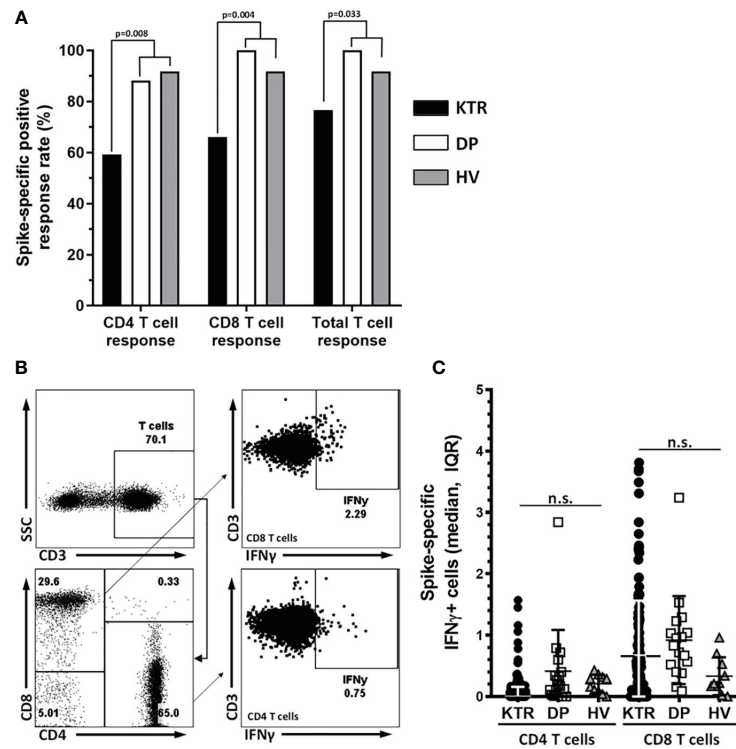


FIGURE 2

Cellular response rate after the third dose of vaccine. (A) Cellular response rate in CD4, CD8 and total T lymphocytes. A spike-specific response of IFN γ producing T-cells (%) >0.05 was considered as positive. The Y axis represents the response rate in CD4, CD8 and total T lymphocytes, for each subgroup of patients. (B) DotPlots show the gating strategy to analyze the response to interferon gamma after stimulation of PBMC with the protein S peptide pool in CD8 and CD4 T cells. (C) Graph shows Spike-specific IFN γ + cells in CD4 and CD8 T cells median and IQR of KTR, DP and HV after three doses of vaccination. The median percentage of IFN γ -producing CD4-T cells were 0.17% (0-0.90 IQR) in KTR, 0.20% (0.07-0.50 IQR) in DP and 0.29% (0.09-0.35 IQR) in HV ($p=0.820$). In the case of CD8-T cell response the median percentages were: 0.41% (0-1.06 IQR) in KTR, 0.83% (0.46-1.13 IQR) in DP and 0.23% (0.17-0.65 IQR) in HV ($p=0.054$). n.s., non significant.

$p<0.001$; P2: 82.9 vs 50.4%, $p=0.001$; P3: 91.9 vs 77.5%, $p=0.053$) or had previously received thymoglobulin (P1: 52.3 vs 38.2%, $p=0.082$; P2: 71.9 vs 47.7%, $p=0.003$; P3: 74.3 vs 50.9%, $p=0.016$), whereas responders after the booster dose were more likely to receive mTOR inhibitor (mTORi) (P1: 76.7 vs 32.3%, $p<0.001$; P2: 81.4 vs 48.3%, $p<0.001$; P3: 94.6 vs 68.2%, $p=0.001$) (Figure 4A). This protective effect of mTORi was maintained regardless of combination of drugs (Table 1).

Moreover, differences are observed in the quantitative response in such a way that patients under MPA had lower IgG anti-spike titers than those without it in all points. In the case of use of mTORi, antibody titers were higher in patients who received it than the others (Figure 4B).

In the multiple logistic regression, MPA ($p<0.001$) and thymoglobulin ($p=0.007$) use were associated with lack of response to vaccine after second dose. However, the only immunosuppressor with significant association with the response after the third dose was mTORi ($p=0.018$), the most common drug among responders (Table 2).

Regarding serum neutralizing activity against the S-protein after the booster dose of vaccine, low percentage of neutralizing activity were found in KTR compared to those of DP and HV: 44.8 (16.9-71) vs 64.4 (52-93.6) vs 67.5% (42.7-79.1), respectively ($p=0.009$) (Figure 5A). Besides of correlation between neutralizing titers

against the S-protein and T-cell response, as we described above, there were an association between anti-S neutralizing activity and total IgG titers ($r=0.485$, $p<0.0001$) (Figure 5B).

As with the IgG titer, we observed a relationship between neutralizing activity after the third dose, categorized according to p25 and p75, and mTORi; such that patients treated with this drug were more likely to develop greater neutralizing activity after vaccination ($p=0.001$). There were no differences in neutralizing activity when we analyzed MPA or thymoglobulin treatment (Figure 5C).

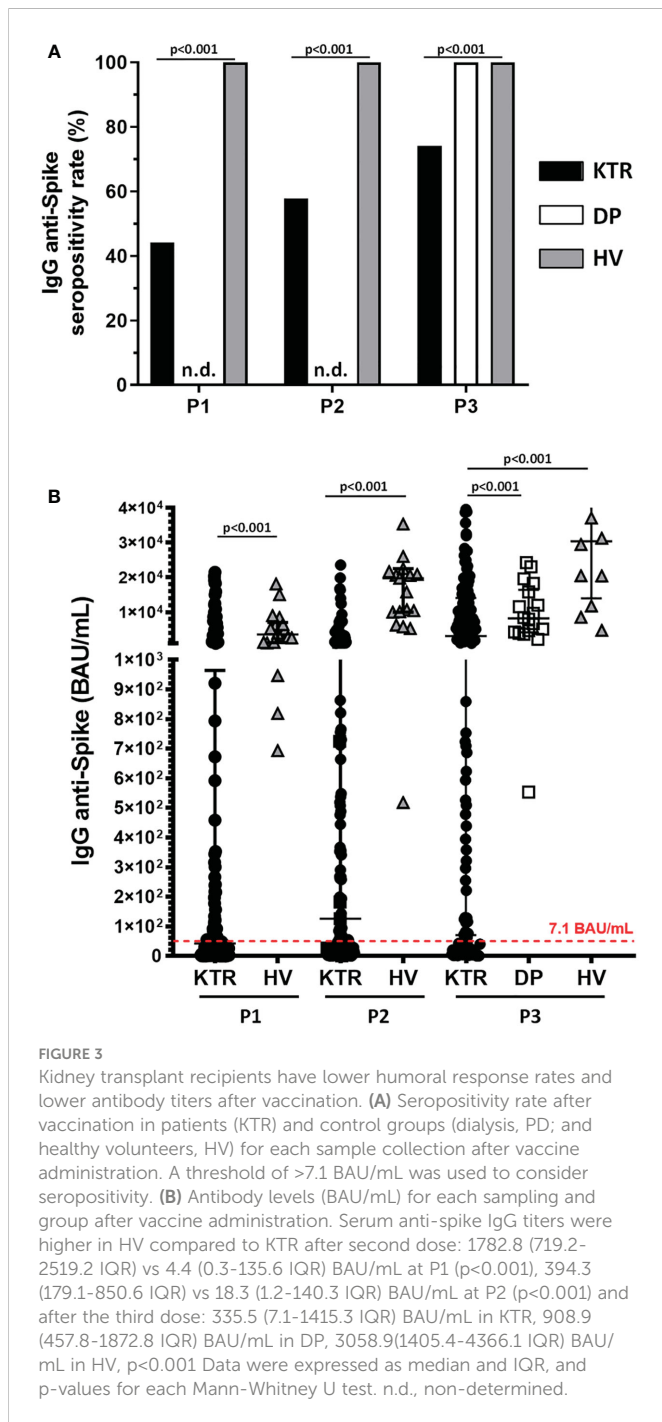
SARS-CoV-2 infected patients

Finally, we compared SARS-CoV-2-specific immunity elicited by mRNA-based vaccine between infected and non-infected patients. The rate of antibody response was higher in infected than COVID-19 naive KTR; the seropositivity anti-S IgG was 96.8 vs 75.2% ($p<0.001$) and neutralizing activity, 98.2 vs 80.9% ($p<0.001$) (Figure 6B). Significant differences were also detected in the intensity of this humoral response between both groups. IgG titers were 5680.0 (3460.0-7524.7) versus 335.5 (7.1-1415.3) BAU/mL ($p<0.001$) (Figure 6A) and neutralizing activity in 78.9 vs 43.4% ($p<0.001$) in SARS-CoV-2 infected vs naive KTR, respectively (Figure 6B).

TABLE 1 Comparison of clinical characteristics between KTR who did or did not mount cellular and humoral response two months after 3 doses of mRNA-1273 (P3).

	SARS-CoV-2 specific humoral response			SARS-CoV-2 specific cellular response		
	Responders N=112	Non responders N=37	p	Responders N=109	Non responders N=35	p
Gender (male), N (%)	68 (60.7)	21 (56.8)	0.670	63 (57.8)	23 (65.7)	0.406
Age of recipient						
years (mean, SD)	58.6 (15.2)	62.0 (13.2)	0.670	59.0 (15.2)	60.8 (13.6)	0.698
>60 y, N (%)	56 (50.0)	25 (67.6)	0.063	58 (53.2)	20 (57.1)	0.685
Diabetes, N (%)	39 (34.9)	14 (37.8)	0.724	40 (36.7)	12 (34.2)	0.738
Time since transplantation						
years (median, IQR)	9.9 (5.6-16.6)	9.2 (3.6-13.7)	0.477	9.6 (5.3-16.7)	9.5 (4.8-12.4)	1
<5 years, N (%)	24 (21.4)	11 (29.7)	0.302	25 (22.9)	9 (25.7)	0.736
Previous Transplant, N (%)	14 (12.5)	4 (10.8)	0.895	10 (9.1)	7 (20)	0.053
Immunosuppressive drug, N (%)						
CNI	86 (76.8)	34 (91.9)	0.044	88 (80.7)	28 (80)	0.924
MPA	87 (77.6)	34 (91.9)	0.053	86 (78.9)	29 (85.3)	0.412
mTORi	35 (31.2)	2 (5.4)	0.002	27 (24.8)	10 (28.6)	0.654
Thymoglobulin	57 (50.9)	27 (73)	0.016	57 (52.2)	23 (65.7)	0.134
Immunosuppressive protocol, N (%)			0.004			0.715
MPA+CNI	73 (65.1)	35 (94.5)	0.001	80 (73.3)	25 (71.4)	0.716
MPA+mTORi	16 (14.2)	0 (0)	0.017	10 (9.1)	5 (14.2)	0.418
mTORi+CNI	23 (20.5)	2 (5.4)	0.046	19 (17.4)	5 (14.2)	0.804
eGFR (mL/min/1.73 m ²), median (IQR)	49.5 (38.1-71.4)	30.1 (21.3-41.4)	0.001	46.1 (30.0-64.4)	45.4 (36.3-63.0)	0.991
Stages CKD, N (%)			0.001			0.288
>60 mL/min/1.73 m ²	43 (38.4)	1 (2.7)		33 (30.3)	10 (28.6)	
30-60	55 (49.1)	17 (45.9)		48 (44.0)	20 (57.1)	
<30	14 (12.5)	19 (51.4)		28 (25.7)	5 (14.3)	
Cells count before vaccination, 1x10³/mm³, median (IQR)						
Lymphocyte	1.6 (1.1-2.0)	1.0 (0.7-1.6)	0.008	1.5 (1.0-1.8)	1.5 (1.1-2.3)	0.525
CD4 ⁺ T cells	5.4 (3.9-7.7)	4.1 (2.7-6.6)	0.807	5.1 (3.5-8.9)	5.4 (3.5-7.6)	0.638
CD8 ⁺ T cells	4.5 (3.0-7.4)	3.8 (1.8-7.6)	0.068	3.9 (2.6-6.9)	6.1 (3.6-7.1)	1
Lymphocyte						
>1x10 ³ /mm ³ , N (%)	92 (82.1)	20 (54.1)	0.001	79 (72.5)	29 (82.8)	0.129
Serum Immunoglobulins levels, mg/dL, median (IQR)						
IgG	1050 (877-1275)	939 (750-1125)	0.112 0.092	1020 (843-1245)	1020 (890-1130)	0.845
IgA	227(137-292)	148(111-281)	0.229	221(122-294)	165(131-257)	0.435
IgM	86(60-120)	72.5(35-116)		83(52-121)	79(48-105)	0.922

CNI, Calcineurin inhibitor; MPA, mycophenolic acid; mTORi, mammalian Target Of Rapamicin inhibitor; eGFR (CKD-EPI), estimated glomerular filtration rate; IQR, interquartile rate; SD, Standard deviation.



Nevertheless, we did observe no differences in the cellular response among infected and *naïve* KTR: reactive CD4-T cells, 64.4 vs 58.3% ($p = 0.422$); reactive CD8-T cells, 67.8 vs 64.6% ($p = 0.662$) (Figure 6C).

Discussion

In this study, we analyzed SARS-CoV-2-specific cell-mediated and humoral immunities following two and booster doses of mRNA-

1273 vaccine. KTR showed a marked reduction in the response rate, with a link between different types of immunosuppressive therapy.

As for cellular response, we did not find a correlation between the different clinical or treatment variants of the patients, although the transplanted cohort showed a lower response rate, both in CD8 and CD4 T cells, compared to control group. These results coincide with those of other studies in cohorts of patients with pharmacological immunosuppression, such as hematological cancer (19), as well as patients with various types of immunodeficiencies (20, 21). These studies also found no correlation between T-cell response and the clinical characteristics of the patients. This fact could be due to the high heterogeneity of the response against specific pools of the SARS-CoV-2 Spike protein (22).

In contrast to studies evaluating cellular response in PBMC pool or whole blood, our study has allowed independent study of CD4 and CD8 T response, identifying a higher response rate in CD8-T cells from patients undergoing KTR.

With regard to humoral response, KTR had a lower IgG response rate compared to the control group in each period, and a delay in the antibody production. In fact, some patients with low titers at day 15 after the administration of the second dose, raised antibody titers 3 months after this dose, in opposition to the downward curve observed in the general population (23).

We observed that the initial immunization schedule did not generate an adequate IgG response in KTR, and the third dose was not sufficient to rescue all non-responders, similar to other immunosuppressed populations (24). These patients could require several booster doses and seasonal vaccination patterns, as is already the case for other types of infectious diseases, like influenza vaccination (25).

Our data showed that reduced renal function decreased the likelihood of achieving seroprotection both after the second and third doses, as has been described in H1N1 vaccination (26). The mechanisms are still not very clear, since significant humoral response is observed in 100% of DP in this and other studies (27).

Also, we found an influence of lymphocyte count and lymphocyte depletion treatment, even when it was administrated several years earlier. Some studies have reported that lymphopenia is associated with infectious complications in cancer (28–30) and that there is an age-dependent decline in the capacity of the adult immune system to regenerate lymphocytes after thymoglobulin administration (31).

Interestingly, the prospective design and sample size and homogeneity of our cohort, which received the same vaccination type and schedule, also allowed us to identify relevant correlations with patient therapies. The immunosuppressive treatment had a different impact depending on whether we analyzed the response to second or booster dose. With the initial vaccination schedule (two doses), patients treated with MPA showed a pronounced decrease in IgG response compared to the rest of patients. Conversely, a higher probability of positive humoral response following the second dose was observed in those with mTORi in the univariate analysis. The relationship between mTORi and a better immune response were recently described by Netti et al (32). Nevertheless, this beneficial effect of mTORi after two doses of vaccine was no maintained in the

TABLE 2 Factors related to antibody respond after second and third dose of SARS-CoV-2 mRNA-1273 vaccine in COVID-19 naïve KTR.

	UNIVARIATE ANALYSIS OR (95% ci), p	MULTIVARIATE analysis OR (95% ci), p
P1 (N=161)		
Age >60 y	0.69 (0.36-1.32), 0.269	
Gender	1.02 (0.52-1.97), 0.953	
Diabetes	0.64 (0.31-1.30), 0.222	
Time since transplantation >5 y	0.60 (0.27-1.32), 0.203	
Previous transplant	1.55 (0.56-4.30), 0.390	
mTOR inhibitor	7.78 (3.37-17.97), <0.001	
MPA	0.06 (0.02-0.18), <0.001	0.05 (0.01-0.20), <0.001
CNI	0.32 (0.14-0.76), 0.008	0.17 (0.06-0.50), 0.001
eGFR pre-vaccination >30 ml/min/1.73 m ²	2.48 (1.06-5.81), 0.032	6.08 (1.84-20.06), 0.003
Lymphocyte count pre-vaccination >1x10 ³ /mm ³	2.50 (1.10-5.68), 0.025	3.47 (1.24-9.68), 0.017
Thymoglobulin	0.58 (0.29-1.14), 0.114	
P2 (N=155)		
Age >60 y	0.49 (0.26-0.91), 0.024	
Gender	1.22 (0.46-3.68), 0.521	
Diabetes	0.51 (0.26-0.98), 0.044	
Previous transplant	1.31 (0.50-4.18), 0.607	
Time since transplantation >5 y	0.50 (0.24-1.00), 0.050	
mTOR inhibitor	4.45 (1.93-10.24), <0.001	
MPA	0.22 (0.08-0.56), 0.001	0.10 (0.03-0.31), <0.001
CNI	0.58 (0.26-1.31), 0.191	
eGFR pre-vaccination >30 ml/min/1.73 m ²	3.33 (1.53-7.23), 0.002	4.78 (1.67-13.65), 0.003
Lymphocyte count pre-vaccination >10 ³ /mm ³	3.78 (1.78-8.02), <0.001	5.03 (1.93-13.10), 0.001
thymoglobulin	0.36 (0.18-0.72), 0.003	0.34 (0.15-0.74), 0.007
p3 (n=149)		
Age >60 y	0.48 (0.22-1.04), 0.063	
Gender	1.17 (0.55-2.50), 0.670	
Diabetes	0.86 (0.39-1.92), 0.724	
Previous transplant	1.08 (0.32-3.56), 0.895	
Time since transplantation >5 y	0.64 (0.27-1.48), 0.302	
mTOR inhibitor	7.95 (1.81-34.91), 0.002	6.40 (1.37-29.86), 0.018
MPA	0.30 (0.08-1.07), 0.053	
CNI	0.29 (0.08-1.02), 0.044	
eGFR pre-vaccination >30 mL/min/1.73m ²	7.38 (3.14-17.35), <0.001	7.34 (2.72-19.84), <0.001
Lymphocyte count pre-vaccination >10 ³ /mm ³	4.11 (1.82-9.28), <0.001	4.68 (1.72-12.73), 0.003
Thymoglobulin	0.35 (0.15-0.84), 0.016	

P1: 15 days after second dose; P2: three months after second dose; P3: two months after third dose; MPA, mycophenolic acid; CNI, calcineurin inhibitor; mTOR, mammalian Target Of Rapamycin; eGFR, estimated glomerular filtration rate.

Univariate and multivariate regression model (adjusted to age, gender and time since transplantation).

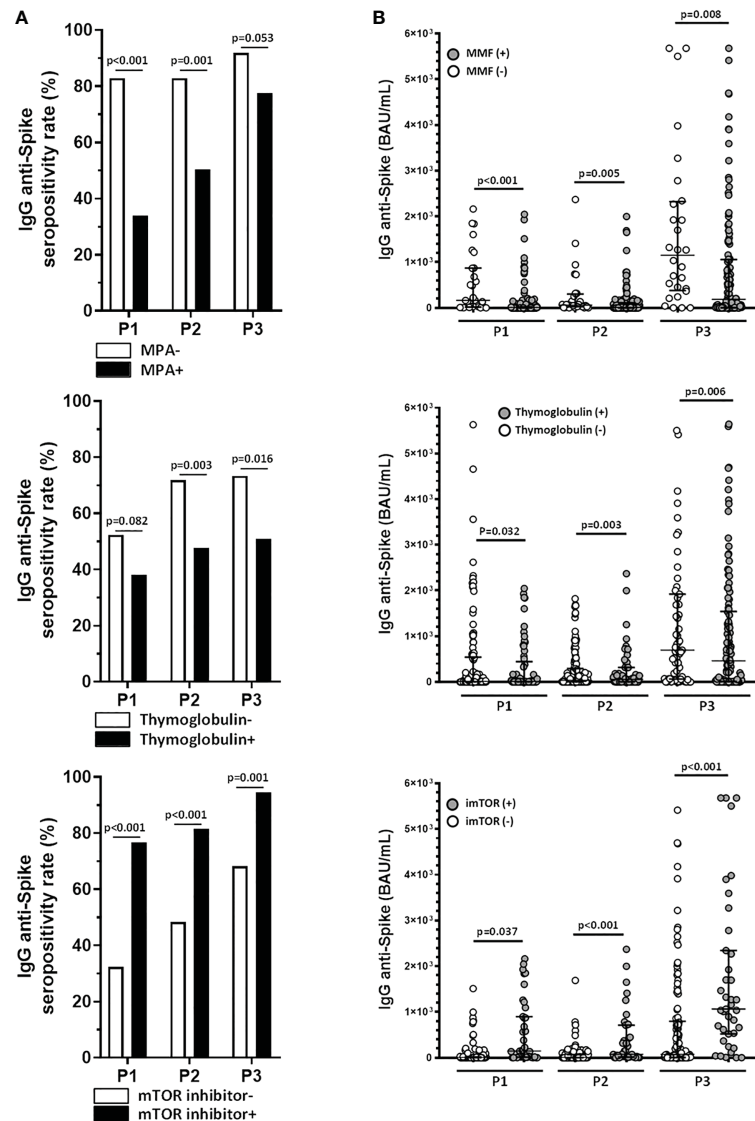


FIGURE 4

Treatment with mycophenolate and thymoglobulin reduces the efficacy of the humoral response in kidney transplant recipients, whereas therapy with mTOR inhibitors reverses the negative effect of immunosuppressive therapy in these patients. (A) Humoral response rates comparing mycophenolate (MPA), thymoglobulin and mTOR inhibitor therapies. (B) Levels of anti-Spike IgG antibodies comparing therapies with mycophenolate (MPA), thymoglobulin and mTOR inhibitors. Patients under MPA had lower IgG anti-spike titers than those without it in all points (P1: 2.6 (0.1-19.9) vs 149.4 (12.4-966.3) BAU/mL, $p < 0.001$; P2: 7.1 (0.7-109.9) vs 50.1 (9.5-300.5) BAU/mL, $p = 0.005$; P3: 104.2 (5.3-1051.5) vs 737.5 (213.1-2183.5) BAU/mL, $p = 0.008$). The same behavior was performed in KTR who received thymoglobulin (P1: 4.5 (0.1-135.5) vs 13.8 (0.7-759.4) BAU/mL, $p = 0.032$; P2: 5.8 (0.6-68.0) vs 46.9 (4.3-317.2) BAU/mL, $p = 0.003$; P3: 56.7 (2.3-877.8) vs 1378.1 (53.0-1919.3) BAU/mL, $p = 0.006$). In patients treated with mTORi, antibody titers were higher vs non-treated (P1: 162.7 (9.2-1093.4) vs 2.6 (0.1-20.3) BAU/mL, $p < 0.001$; P2: 145.6 (12.6-709.4) vs 6.0 (0.7-70.4) BAU/mL, $p < 0.001$; P3: 1036.2 (366.4-2270.0) vs 70.3 (3.4-761.7) BAU/mL, $p < 0.001$). Graphs include data for each sampling after vaccination and p-values for each Mann-Whitney U test.

adjusted model in our cohort, findings also noted by Bae (33). Several authors found similar results with MPA and mTORi in different groups of patients who received two doses (33-37), even proposing the temporary suspension of treatment during the vaccination process (38).

But we go further and performed an analysis of immune response after the third or booster dose and different results were observed. There was no association between humoral response and MPA, and

mTORi was the only treatment that showed an independent association with immunogenicity following the third dose. We hypothesized that the negative impact of MPA was diluted after booster dose, perhaps due to greater antigenic exposure, similar to what happened in the case of patients who have undergone COVID-19 in any of the study periods. The mTORi-treated patients with three doses of vaccine showed a quantitative and qualitative humoral immune response similar to controls, with high response rates.

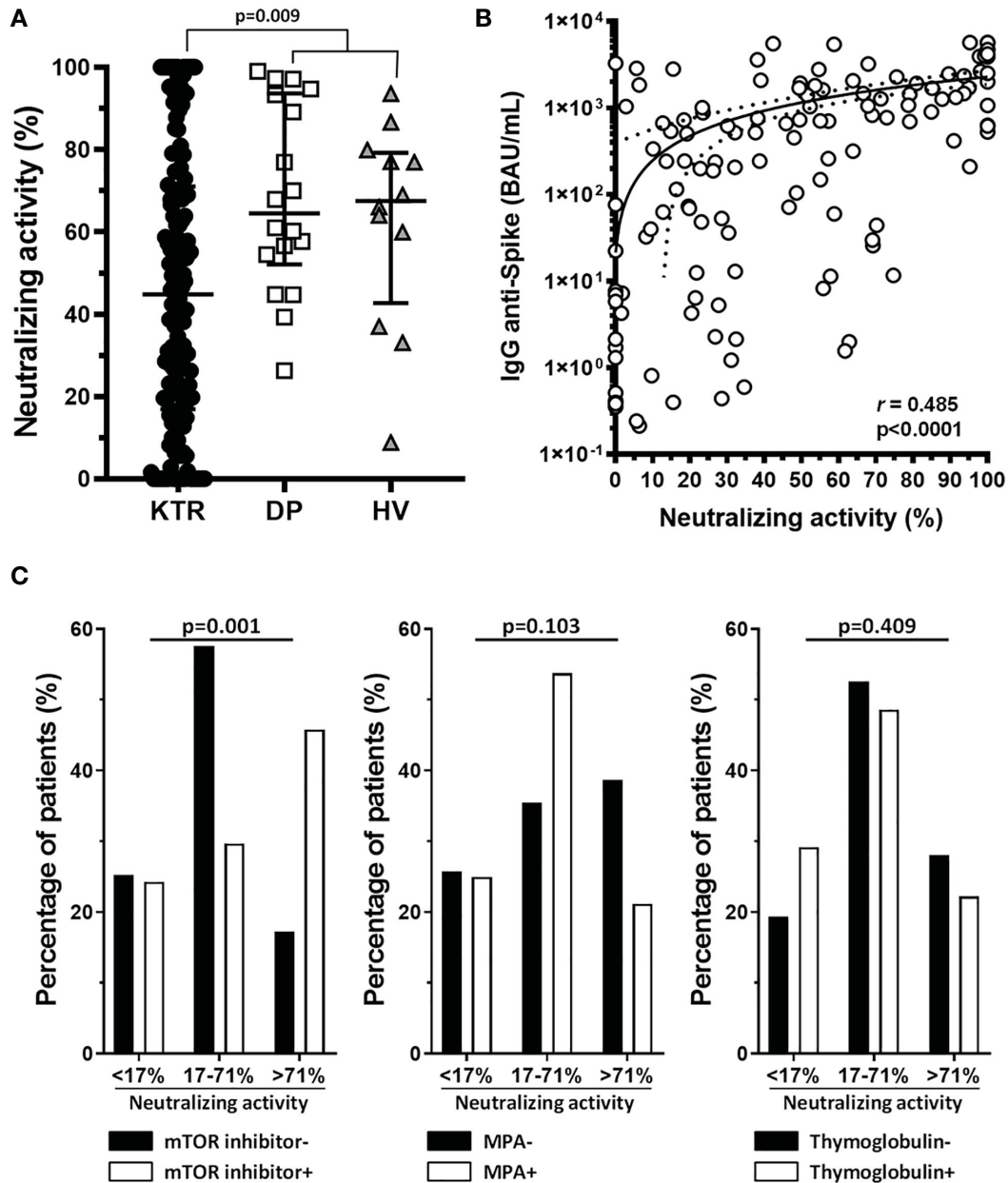


FIGURE 5
 Sera from renal transplant recipient patients show lower RBD-ACE2 binding neutralizing activity than control groups, which correlates with antibody levels, and mTOR inhibitors treatment enhance neutralizing activity of sera of these patients. **(A)** Graph shows the neutralizing activity of patient sera at 1:25 dilution in patients (KTR) and control groups (DP and HV), with median and IQR, and p-value for Mann-Whitney U test. **(B)** Graph shows the correlation of neutralizing activity with antibody levels calculated with Spearman's Rho. **(C)** Graphs show the percentage of patients with a range of neutralizing activity (divided in three percentiles, according to p25 and p75, <17%, 17%-<71% and >71%) for mTOR inhibitor, MPA and thymoglobulin treatment after the third dose of vaccination.

Several studies found that mTORi can enhance the formation and differentiation of memory CD8 T cells in anti-tumor vaccines and in immunization against viruses and parasites (39–42). It has been suggested that mTOR blockade effectively potentiated antigen-specific T-cell and B-cell responses induced by HBV vaccines (43).

Finally, we found that neutralization capacity after the third dose is clearly linked to anti-S IgG antibody titers, as had already been

described (44). This is especially relevant in KTR, as many of them generate response after vaccination, but with low titers, which may lead to an increased risk of infection and complications. As with antibody titers, treatments affected the neutralizing capacity of these sera. Patients treated with mTORi had a greater neutralization capacity, as they achieved higher IgG titers, suggesting a more efficient post-vaccination response. This data may lead to consider

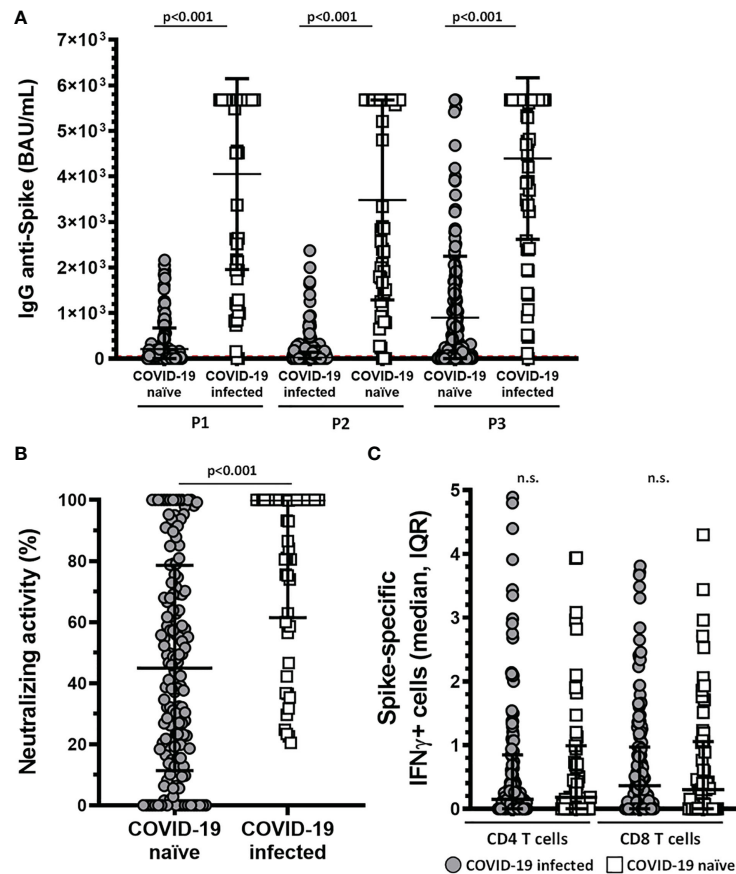


FIGURE 6

Patients affected by COVID-19 have higher levels of anti-Spike IgG antibodies and higher neutralizing activity. (A) Levels of anti-Spike IgG antibody (BAU/mL) in COVID-19 affected and unaffected patients for each of the post-vaccination samples ($p < 0.001$). (B) Neutralizing activity was 78.9 in SARS-CoV-2 infected vs 43.4% ($p < 0.001$) in SARS-CoV-2 naïve KTR. Both graphs show median and IQR, an p -value for each Mann-Whitney U test. (C) Graph show IFN γ + cells in COVID-19 naïve and COVID-19 infected individuals in CD8 and CD4 T cells. Non-significant differences were found between both groups. n.s., non significant.

the use of this therapy as an adjuvant for the response to new booster doses of mRNA vaccines.

Regarding the limitations of this study, all the assays were performed on the wildtype strain of SARS-CoV-2. In addition, the administration of a fourth dose to immunosuppressed patients has been standardized, so we have extended this study to verify the effect of the fourth dose.

In conclusion, this study shows that KTR have a lower response after to doses of mRNA-1273 vaccination, especially accentuated in those treated with MPA or thymoglobulin. Based on these observations, it can be assumed that COVID-19 still presents a major risk for vaccinated KTR. However, it is possible to rescue patients with the third dose and mTORi therapy could be a potential adjuvant therapy to improve the response to booster doses in this high-risk population.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/[Supplementary Material](#). Further inquiries can be directed to the corresponding author.

Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by Ethics Committee of Hospital Clínico San Carlos (June 28th 2021, 21/200-E). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

Author contributions

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by IP-F, IJ, AA, AL-G, RG-G, NR, BR-C, MM and BP-J. The first draft of the manuscript was written by IP-F, IJ, AA, EN and AS-F and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This work was supported by grants from Fundación Mutua Madrileña (Ayudas a la investigación en salud, (Grant number

AP177642021) to and AI S-F and from Comunidad de Madrid (REACT-UE, ANTICIPA-CM Ref. PR38/21-24) to E.M.N.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations,

References

- World Health Organization (WHO). *Coronavirus (COVID-19)*. Available at: <https://covid19.who.int>.
- Goldman JD, Robinson PC, Uldrick TS, Ljungman P. COVID-19 in immunocompromised populations: implications for prognosis and repurposing of immunotherapies. *J Immunother Cancer* (2021) 9:e002630. doi: 10.1136/jitc-2021-002630
- Suthar AB, Wang J, Seffren V, Wiegand RE, Griffing S, Zell E. Public health impact of COVID-19 vaccines in the united states: observational study. *BMJ* (2022) 377:e069317. doi: 10.1136/bmj-2021-069317
- Goffin E, Candellier A, Vart P, Noordzij M, Arnol M, Covic A, et al. COVID-19-related mortality in kidney transplant and haemodialysis patients: a comparative, prospective registry-based study. *Nephrol Dial Transplant*. (2021) 36(11):2094–105. doi: 10.1093/ndt/gfab200
- Ozturk S, Turgutalp K, Arici M, Odabas AR, Altiparmak MR, Aydin Z, et al. Mortality analysis of COVID-19 infection in chronic kidney disease, haemodialysis and renal transplant patients compared with patients without kidney disease: a nationwide analysis from Turkey. *Nephrol Dial Transplant*. (2020) 35(12):2083–95. doi: 10.1093/ndt/gfaa271
- Akalin E, Azzi Y, Bartash R, Azzi Y, Bartash R, Seethamraju H, Parides M, Hemmige V, et al. Covid-19 and kidney transplantation. *N Engl J Med* (2020) 382:2475–7. doi: 10.1056/NEJMc2011117
- Benotmane I, Risch S, Doderer-Lang C, Caillard S, Fafi-Kremer S, et al. Long-term shedding of viable SARS-CoV-2 in kidney transplant recipients with COVID-19. *Am J Transplant*. (2021) 21(8):2871–5. doi: 10.1111/ajt.16636
- Ginda T, Taradaj K, Kociszewska-Najman B. The influence of selected factors on the immunogenicity of preventive vaccinations against hepatitis a, b and influenza in solid organ transplant recipients undergoing immunosuppressive therapy - a review. *Expert Rev Vaccines* (2022) 21(4):483–97. doi: 10.1080/14760584.2022.2027241
- Walsh EE, Frenck RW Jr, Falsey AR, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, et al. Safety and immunogenicity of two RNA-based covid-19 vaccine candidates. *N Engl J Med* (2020) 383(25):2439–50. doi: 10.1056/NEJMoa2027906
- Boyersky BJ, Werbel WA, Avery RK, Tobian AAR, Massie AB, Segev DL, et al. Antibody response to 2-dose SARS-CoV-2 mRNA vaccine series in solid organ transplant recipients. *JAMA* (2021) 325(21):2204–6. doi: 10.1001/jama.2021.7489
- Grupper A, Rabinowich L, Schwartz D, Schwartz IF, Ben-Yehoyada M, Shashar M, et al. Reduced humoral response to mRNA SARS-Cov-2 BNT162b2 vaccine in kidney transplant recipients without prior exposure to the virus. *Am J Transplant*. (2021) 21(8):2719–26. doi: 10.1111/ajt.16615
- Marinaki S, Adamopoulos S, Degiannis D, Roussos S, Pavlopoulou ID, Hatzakis A, et al. Immunogenicity of SARS-CoV-2 BNT162b2 vaccine in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant*. (2021) 21(8):2913–5. doi: 10.1111/ajt.16607
- Peled Y, Ram E, Lavee J, Sternik L, Segev A, Wieder-Finesod A, et al. BNT162b2 vaccination in heart transplant recipients: clinical experience and antibody response. *J Heart Lung Transplant*. (2021) 40(8):759–62. doi: 10.1016/j.healun.2021.04.003
- Rabinowich L, Grupper A, Baruch R, Ben-Yehoyada M, Halperin T, Turner D, et al. Low immunogenicity to SARS-CoV-2 vaccination among liver transplant recipients. *J Hepatol* (2021) 75(2):435–8. doi: 10.1016/j.jhep.2021.04.020
- Korth J, Jahn M, Dorsch O, Anastasiou OE, Sorge-Hädick B, Eisenberger U, et al. Impaired humoral response in renal transplant recipients to SARS-CoV-2 vaccination with BNT162b2 (Pfizer-BioNTech). *Viruses* (2021) 13(5):756. doi: 10.3390/v13050756

or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1111569/full#supplementary-material>

SUPPLEMENTARY FIGURE 1

Individual trends of KTR patients. Levels of anti-Spike IgG antibody (BAU/mL) in KTR (black lines and circles) and HV (blue lines and squares) for each of the post-vaccination samples. Part of the KTR showed a delay in the generation of Spike-specific IgG at P1 and a higher decrease of IgG levels at P2 compared to controls.

- Kamar N, Abravanel F, Marion O, Couat C, Izopet J, Del Bello A, et al. Three doses of an mRNA COVID-19 vaccine in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med* (2021) 385:661–2. doi: 10.1056/NEJMc2108861
- Werbel WA, Boyarsky BJ, Ou MT, Massie AB, Tobian AAR, Garonzik-Wang JM, et al. Safety and immunogenicity of a third dose of SARS-CoV-2 vaccine in solid organ transplant recipients: A case series. *Ann Intern Med* (2021) 174(9):1330–2. doi: 10.7326/L21-0282
- Benotmane I, Gautier G, Perrin P, Olagne J, Cognard N, Fafi-Kremer S, et al. Antibody response after a third dose of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine in kidney transplant recipients with minimal serologic response to 2 doses. *JAMA* (2021) 26(11):1063–5. doi: 10.1001/jama.2021.12339
- Mair MJ, Berger JM, Mitterer M, Gansterer M, Bathke AC, Trutschnig W, et al. Third dose of SARS-CoV-2 vaccination in hematological patients and health care workers: immune responses and adverse events in a retrospective cohort study. *Eur J Cancer* (2022) 165:184–94. doi: 10.1016/j.ejca.2022.01.019
- Bergman P, Blennow O, Hansson L, Mielke S, Nowak P, Chen P, et al. Safety and efficacy of the mRNA BNT162b2 vaccine against SARS-CoV-2 in five groups of immunocompromised patients and healthy controls in a prospective open-label clinical trial. *EBioMedicine* (2021) 74:103705. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103705
- Bergman P, Wullimann D, Gao Y, Wahren Borgström E, Norlin AC. Elevated CD21^{low} b cell frequency is a marker of poor immunity to pfizer-BioNTech BNT162b2 mRNA vaccine against SARS-CoV-2 in patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* (2022) 42:716–27. doi: 10.1007/s10875-022-01244-2
- Moss P. The cell immune response against SARS-CoV-2. *Nat Immunol* (2022) 23:186–93. doi: 10.1038/s41590-021-01122-w
- Widge AT, Roupael NG, Jackson LA, Anderson EJ, Roberts PC, Makhene M, et al. Durability of responses after SARS-CoV-2 mRNA-1273 vaccination. *N Engl J Med* (2021) 384:80–2. doi: 10.1056/NEJMc2032195
- Oyaert M, De Scheerder MA, Van Herrewewe S, Laureys G, Van Assche S, et al. Evaluation of humoral and cellular responses in SARS-CoV-2 mRNA vaccinated immunocompromised patients. *Front Immunol* (2022) 13:858399. doi: 10.3389/fimmu.2022.858399
- Beck CR, McKenzie BC, Hashim AB, Harris RC, University of Nottingham Influenza and the Immuno Compromised (UNIIC) Study Group,; Nguyen-Van-Tam JS. Influenza vaccination for immunocompromised patients: Systematic review and metaanalysis by etiology. *J Infect Dis* (2012) 206:1250–9. doi: 10.1093/infdis/jis487
- Mulley WR, Visvanathan K, Hurt AC, Brown FG, Polkinghorne KR, Mastorakos T, et al. Mycophenolate and lower graft function reduce the seroresponse of kidney transplant recipients to pandemic H1N1 vaccination. *Kidney Int* (2012) 82:212–9. doi: 10.1038/ki.2012.106
- Longlune N, Nogier MB, Miedouge M, Gabilan C, Cartou C, Seigneuric B, et al. High immunogenicity of a messenger RNA based vaccine against SARS-CoV-2 in chronic dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* (2021) 31:1704–9. doi: 10.1093/ndt/gfab193
- xDucloux D, Carron PL, Motte G, Ab A, Rebibou JM, Bresson-Vautrin C, et al. Lymphocyte subsets and assessment of cancer risk in renal transplant recipients. *Transpl Int* (2002) 15:393. doi: 10.1111/j.1432-2277.2002.tb00187.x
- Thibaudin D, Alamartine E, Mariat C, Absi L, Berthou F. Long-term kinetic of T-lymphocyte subsets in kidneytransplant recipients: influence of anti-t-cell antibodies and association with posttransplant malignancies. *Transplantation* (2005) 80:1514. doi: 10.1097/01.tp.0000181193.98026.3f

30. Ducloux D, Courivaud C, Bamoulid J, Vivet B, Chabroux A, Deschamps M, et al. Prolonged CD4 T cell lymphopenia increases morbidity and mortality after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* (2010) 21:868–75. doi: 10.1681/ASN.2009090976
31. Longuet H, Sautenet B, Gatault P, Thibault G, Barbet C, Marliere JF, et al. Risk factor for impaired CD4 T-cell reconstitution following rabbit antithymocyte globulin treatment in kidney transplantation. *Transplant Int* (2014) 27:271–9. doi: 10.1111/tri.12249
32. Netti GS, Infante B, Troise D, Mercuri S, Panico M, Spadaccino F, et al. mTOR inhibitors improve both humoral and cellular response to SARS-CoV-2 messenger RNA BNT16b2 vaccine in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* (2022) 22:1475–82. doi: 10.1111/ajt.16958
33. Bae S, Alejo JL, Chiang TPY, Werbel WA, Tobian AAR, Moore LW, et al. mTOR inhibitors, mycophenolates, and other immunosuppression regimens on antibody response to SARS-CoV-2 mRNA vaccines in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* (2022) 23: 3137–42. doi: 10.1111/ajt.17158
34. Mitchell J, Chiang T, Alejo J, Chang A, Abedon AT, Avery RK, et al. Effect of mycophenolate mofetil dosing on antibody response to SARS-CoV-2 vaccination in heart and lung transplant recipients. *Transplantation* (2022) 106(5):e269–70. doi: 10.1097/TP.0000000000004090
35. Kantauskaite M, Müller L, Kolb T, Fischer S, Hillebrandt J, Ivens K, et al. Intensity of mycophenolate mofetil treatment is associated with an impaired immune response to SARS-CoV-2 vaccination in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* (2022) 22:634–9. doi: 10.1111/ajt.16851
36. Pinchera B, Spirito L, Buonomo AR, Foggia M, Carrano R, Salemi F, et al. mTOR inhibitor use is associated with a favorable outcome of COVID-19 in patients of kidney transplant: Results of a retrospective study. *Front Med (Lausanne)*. (2022) 9:852973. doi: 10.3389/fmed.2022.852973
37. Biagio P, Rosa C, Nicola SM, Fabrizio S, Amerigo P, Giulia Z, et al. Serological response and clinical protection of anti-SARS-CoV-2 vaccination and the role of immunosuppressive drugs in a cohort of kidney transplant patients. *Viruses* (2022) 14 (9):1951. doi: 10.3390/v14091951
38. Connolly CM, Chiang T, Boyarsky BJ, Ruddy JA, Teles M, Alejo JL, et al. Temporary hold of mycophenolate augments humoral response to SARS-CoV-2 vaccination in patients with rheumatic and musculoskeletal diseases: a case series. *Ann Rheum Dis* (2021) 81:293–5. doi: 10.1136/annrheumdis-2021-221252
39. Diken M, Kreiter S, Vascotto F, Selmi A, Attig S, Diekmann J, et al. mTOR inhibition improves antitumor effects of vaccination with antigen-encoding RNA. *Cancer Immunol Res* (2013) 1(6):386–92. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0046
40. Moraschi BF, Noronha IH, Ferreira CP, Cariste LM, Monteiro CB, Denapoli P, et al. Rapamycin improves the response of effector and memory CD8 T cells induced by immunization with ASP2 of trypanosoma cruzi. *Front Cell Infect Microbiol* (2021) 11:676183. doi: 10.3389/fcimb.2021.676183
41. Kaminski H, Marseres G, Yared N, Nokin MJ, Pitard V, Zouine A, et al. mTOR inhibitors prevent CMV infection through the restoration of functional $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* (2022) 33(1):121–37. doi: 10.1681/ASN.2020121753
42. Ye L, Lee J, Xu L, Mohammed AU, Li W, Hale JS, et al. mTOR promotes antiviral humoral immunity by differentially regulating CD4 helper T cell and b cell responses. *J Virol* (2017) 91(4):e01653–16. doi: 10.1128/JVI.01653-16
43. He L, Zang A, Du M, Ma D, Yuan C, Zhou C, et al. mTOR regulates TLR-induced c-fos and Th1 responses to HBV and HCV vaccines. *Viral Sin* (2015) 30(3):174–189. doi: 10.1007/s12250-015-3606-3
44. Bayarri-Olmos R, Idorn M, Rosbjerg A, Pérez-Alós L, Hansen CB, Johnsen LB, et al. SARS-CoV-2 neutralizing antibody responses towards full-length spike protein and the receptor-binding domain. *J Immunol* (2021) 207(3):878–87. doi: 10.4049/jimmunol.2100272

Article

Immunosuppressive Therapy Modifies Anti-Spike IgG Subclasses Distribution After Four Doses of mRNA Vaccination in a Cohort of Kidney Transplant Recipients

Ignacio Juarez ^{1,*}, Isabel Pérez-Flores ^{2,†}, Arianne S. Aiffil Meneses ², Ana Lopez-Gomez ¹, Natividad Calvo Romero ², Beatriz Rodríguez-Cubillo ², María Angeles Moreno de la Higuera ², Belén Peix-Jiménez ², Raquel Gonzalez-Garcia ¹, Beatriz Amorós-Pérez ¹, Benigno Rivas-Pardo ¹, Elvira Baos-Muñoz ³, Ana Arribi Vilela ³, Manuel Gómez Del Moral ⁴, Ana Isabel Sánchez-Fructuoso ^{2,‡} and Eduardo Martínez-Naves ^{1,‡}

¹ Immunology Department, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain; anlope22@ucm.es (A.L.-G.); beamoros@ucm.es (B.A.-P.); benignor@ucm.es (B.R.-P.); emnaves@ucm.es (E.M.-N.)

² Nephrology Department, Institute San Carlos for Medical Research (Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC)), San Carlos Clinical University Hospital, 28040 Madrid, Spain; perezflores@yahoo.es (I.P.-F.); naticalvo75@gmail.com (N.C.R.); brcubillo@gmail.com (B.R.-C.); sanchezfructuoso@gmail.com (A.I.S.-F.)

³ Microbiology Department, Institute San Carlos for Medical Research (Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC)), San Carlos Clinical University Hospital, 28040 Madrid, Spain

⁴ Department of Cell Biology, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain; mgomez@med.ucm.es

* Correspondence: ignajuar@ucm.es

† I.P.-F. and I.J. share co-first authorship.

‡ E.M.-N. and A.I.S.-F. share co-senior authorship.



Academic Editors: Daniele Focosi and Massimo Franchini

Received: 16 December 2024

Revised: 20 January 2025

Accepted: 22 January 2025

Published: 25 January 2025

Citation: Juarez, I.; Pérez-Flores, I.; Aiffil Meneses, A.S.; Lopez-Gomez, A.; Calvo Romero, N.; Rodríguez-Cubillo, B.; Moreno de la Higuera, M.A.; Peix-Jiménez, B.; Gonzalez-Garcia, R.; Amorós-Pérez, B.; et al.

Immunosuppressive Therapy Modifies Anti-Spike IgG Subclasses Distribution After Four Doses of mRNA Vaccination in a Cohort of Kidney Transplant Recipients. *Vaccines* **2025**, *13*, 123. <https://doi.org/10.3390/vaccines13020123>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Background: IgG4 is the least immunogenic subclass of IgG. Immunization with mRNA vaccines against SARS-CoV-2, unlike other vaccines, induces an increase in IgG4 against the spike protein in healthy populations. This study investigated whether immunosuppressive therapy affects the immune response, focusing on IgG subclass changes, to four doses of mRNA vaccine in kidney transplant recipients (KTRs). **Methods:** This study includes 146 KTRs and 23 dialysis patients (DPs) who received three mRNA-1273 vaccine doses and a BNT162b2 booster. We evaluated anti-spike IgG titers and subclasses, T-CD4+ and T-CD8+ cellular responses, and serum neutralizing activity (SNA). **Results:** At the fourth dose, 75.8% of COVID-19 naïve KTRs developed humoral and cellular responses (vs. 95.7% in DPs). There was a correlation between anti-spike IgG titers/subclasses and SNA ($p < 0.001$). IgG subclass kinetics after the third/fourth dose differed between COVID-19 naïve KTRs and DPs. Immunosuppressive therapy influenced IgG subclasses: mTOR inhibitors (mTORi) positively influenced IgG1 and IgG3 ($p < 0.05$), while mycophenolic acid negatively affected IgG1, IgG3, and IgG4 ($p < 0.05$). SNA is correlated with breakthrough infections after four doses of vaccine in KTRs. mTORi was the only factor associated with SNA > 65% in naïve KTRs [4.29 (1.21–15.17), $p = 0.024$]. **Conclusions:** KTRs show weaker cellular and humoral immune responses to mRNA vaccines and a class shift towards non-inflammatory anti-S IgG4 upon booster doses. IgG subclasses show a positive correlation with SNA and are influenced by immunosuppression. Increased SNA after four doses of vaccine is protective against infection. mTORi may benefit non-responding KTRs.

Keywords: kidney transplant recipients; SARS-CoV-2 vaccine; serum neutralizing activity; IgG subclasses; COVID-19

1. Introduction

Two mRNA vaccines from Pfizer-BioNTech (BNT162b2) and Moderna (mRNA-1273) were the first FDA-approved mRNA vaccines for immunization against the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Both showed high initial efficacy of around 90% in the general population [1,2], but we do not know the kinetics of this immunity in the medium and long term and the booster doses needed to maintain immunity. It is currently unknown how these new vaccine formats will affect the long-term B cell and Fc antibody response.

Some works have documented that, after three doses, immunization was superior in terms of humoral response and neutralizing capacity against several SARS-CoV-2 variants [3,4]. Knowledge of these data may be even more important in kidney transplant recipients (KTRs), as their immunosuppressed status results in a poorer and less durable response than in the general population [5].

Antibodies display multiple functions and features, and are fundamental to the control of viral infection. Neutralizing antibodies and IgG subclasses have been extensively studied as potential markers of disease severity and vaccine efficacy. Recent studies have shown that COVID-19 patients and those receiving vaccination with mRNA-based COVID-19 vaccines develop a robust IgG response in healthy adults, consisting mainly of IgG1 and IgG3 subclasses, with neutralizing activity against SARS-CoV-2 [6,7].

However, other authors have observed a significant increase in IgG4 levels after vaccination with the booster doses of the mRNA vaccines, contrary to other antigen expositions, such as adenoviral or inactivated vaccines, or after SARS-CoV-2 infection [8,9]. To the best of our knowledge, it is unknown whether this shift towards IgG4 production occurs when vaccinating individuals who are being treated with immunosuppressants.

IgG is the most prevalent immunoglobulin isotype in human serum and plays a pivotal role in the adaptive and innate immune responses. IgG subclasses have unique functional properties that are essential for host defense against infections [10,11]. These subclasses exhibit different affinities for Fc gamma receptors (FcγRs) and for C1q complement binding [12], which modulate their ability to trigger effector mechanisms such as antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and antibody-dependent cellular phagocytosis (ADCP) [13,14].

IgG1 is the most prevalent subclass in serum and has a high affinity for FcγRI, FcγRIIa, and FcγRIIIa expressed on phagocytic and natural killer (NK) cells [15,16]. This subclass is associated with Th2-type responses and is involved in the clearance of extracellular pathogens by ADCC and complement activation [17]. IgG2 has a lower affinity for FcγRs but a higher affinity for C1q [18] and is critical for opsonization of encapsulated bacteria. IgG3 has the highest affinity for FcγRs and is the most potent activator of ADCC and complement activation, while IgG4 has the lowest affinity for FcγRs and C1q, is associated with immune tolerance, and is involved in the suppression of allergic and autoimmune reactions [12].

The kinetics of IgG subclasses may explain the variable humoral response observed in some individuals following vaccination. Investigating the dynamics of IgG subclasses is essential for understanding the mechanisms of protection against viral infection, especially in immunosuppressed populations. The aim of this study was to investigate the kinetics of anti-spike antibodies, serum neutralizing activity (SNA), and IgG1-IgG4 subclasses in a cohort of KTRs receiving four doses of mRNA vaccines, to analyze the effect of immunosuppressive therapy and to compare their response with that of another group of dialysis patients (DPs).

2. Methods

2.1. Study Design and Sample Collection

We conducted a prospective study involving a cohort comprising 146 KTRs who received three doses of mRNA-1273 vaccine at 0, 1, and 5 months and a booster dose of BNT162b2 vaccine at 11 months after the first dose. For comparison purposes, an additional cohort of 23 DPs who received the same vaccination regimen was included. Individuals who had previously been infected with SARS-CoV-2 or who became infected during the follow-up period were excluded from the initial vaccine effectiveness analysis.

Blood samples were collected two months after the fourth dose (P4). Previous sample data were obtained from samples collected in a previous study [5], corresponding to before vaccination (P0), 21 days after the second dose (P1), three months after the second dose (P2), and two months after the third (P3) and fourth dose (P4). Eight months after the fourth dose, we assessed patients who remained uninfected (naïve KTR) or had a breakthrough infection. The study design and sampling schedule are summarized in Figure 1.

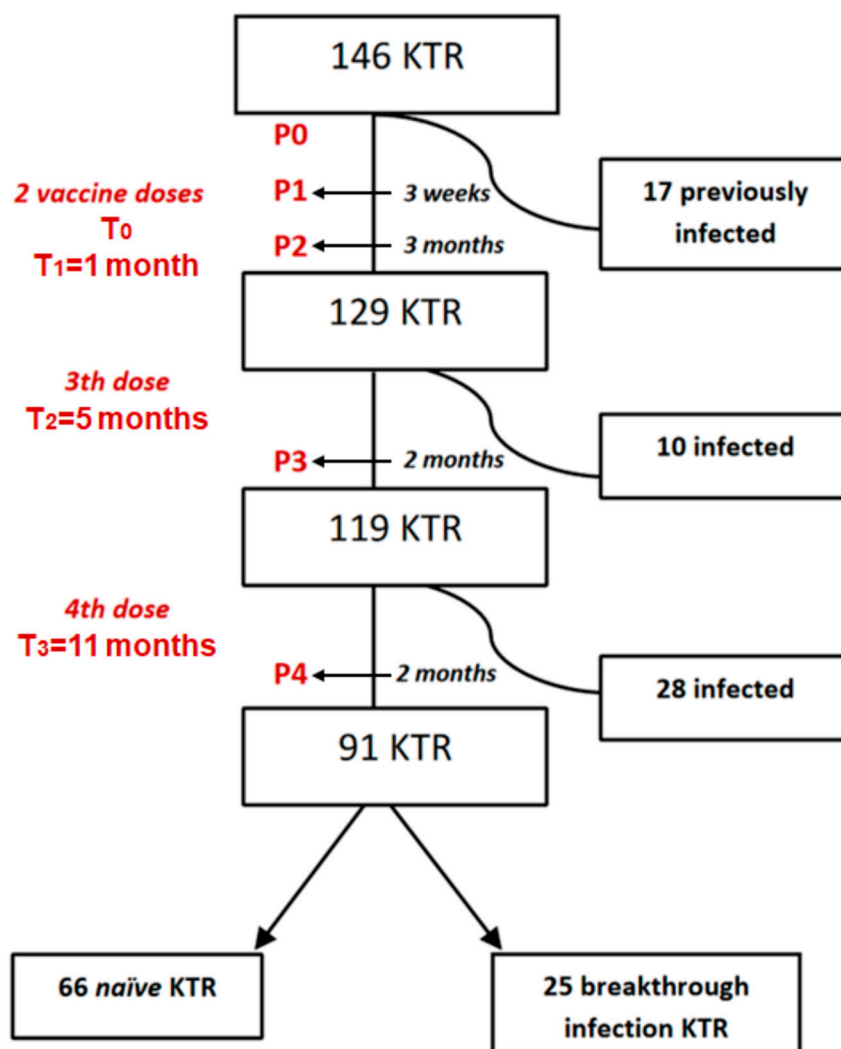


Figure 1. Flow chart of kidney transplant recipients (KTRs) included in the study and exclusion criteria. Each extraction (P0, P1, P2, P3, and P4) involved the following laboratory determinations: SARS-CoV-2 Serology Analysis, Assessment of Cell-Mediated Immunity, Assessment of Serum Neutralizing Activity of ACE2-RBD, and Measurement of IgG subclasses. Patients were tested for SARS-CoV-2 infection by anti-N antibodies, determined by ELISA.

2.2. Patient Selection

KTRs attending the outpatient Renal Transplant Unit between 1 March and 15 April 2021 and expressing a desire to be vaccinated were included in this study. Inclusion criteria included being over 18 years of age, having a history of kidney transplantation for at least six months, and consenting to participate in the study. Exclusion criteria included a history of malignancy, a solid organ transplantation other than kidney, primary immunodeficiency disease, previous allergic reactions to inactivated vaccines, and the presence of an unexplained fever above 37.5 °C or symptoms suggestive of infection.

The study was conducted in accordance with the ethical standards of the Declaration of Helsinki and was approved by the local ethics committee. Informed written consent was obtained from all participants before blood samples were taken.

The vaccination periods were carried out following the schedules and periods provided by the Spanish Ministry of Health, including the administration of a booster (4th dose) of the vaccination in individuals undergoing renal transplantation. The vaccination protocol was the same for all participants, including two initial doses of mRNA-1273, and a booster (third dose) of mRNA1237 was performed with 0.25 mL containing 50 µg of mRNA, i.e., half the dose of the initial regimen and a fourth dose of BNT162b2 vaccine (due to stock limitations).

Samples were taken according to the literature available at the time, although a standard of two months after the booster dose was established for the last samples, based on the results published after one year of analysis of immune responses in the general population.

2.3. Control Group Selection

We established a control group of non-immunocompromised individuals to compare the immune response to the vaccine. This control group consisted of 23 DPs (naïve to SARS-CoV-2 infection and with no breakthrough infection) who received the same vaccination schedule. Blood samples were collected from the DPs at equivalent time intervals after vaccination under the same conditions as the KTRs.

2.4. SARS-CoV-2 Serology Analysis

A quantitative SARS-CoV-2 IgG test (SARS-CoV-2 IgG II Quant; Abbott Diagnostics) was used according to the manufacturer's instructions. Samples with AU/mL values ≥ 50 were considered positive for SARS-CoV-2 IgG antibodies. To identify individuals who had been infected with the SARS-CoV-2 before vaccination or between sample collections, we employed an ELISA assay that assessed the presence of anti-SARS-CoV-2 N-protein antibodies, as previously described [5].

The antibody values were converted into WHO binding antibody units (BAU)/mL using a conversion factor of 0.142 ($\text{BAU/mL} = \text{AU/mL} \times 0.142$).

2.5. Assessment of Cell-Mediated Immunity

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained by density gradient isolation, and cells were stimulated with peptides covering the immunodominant domain surface S-protein of SARS-CoV-2. T-cell responses were assessed by flow cytometry using a lower limit of 0.05% as the threshold for a positive cellular response. The reported frequency was obtained by subtracting the background from the negative control for each donor. Antibodies employed were anti-CD3-FITC (UCHT1), CD4-PE (OKT4), and CD8-PE/Cy7 (SK1), and anti-IFN γ -APC (B27) (Biolegend), following standard procedures for intracellular staining. The gating strategy and dot-plots are shown in Supplementary Figure S1.

2.6. Assessment of Serum Neutralizing Activity of ACE2-RBD

To determine the serum neutralizing activity (SNA) against the ACE2–Spike (RBD) interaction, a competitive ELISA assay was performed as previously described [5]. Briefly, plates coated with recombinant RBD and sera samples were incubated with biotin-labeled ACE2 to assess the ACE2-RBD interaction, resulting in a percentage neutralization value.

2.7. Measurement of IgG Subclasses

An ELISA assay for RBD protein was used to measure IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4 isotypes. Ninety-six-well plates were coated with SARS-CoV-2 RBD (2 µg/mL) for 16 h at 2 °C, sera samples (1:100 dilution) were incubated, and antibodies were detected using goat anti-human IgG1, IgG2, IgG3 and, IgG4 HRP-conjugated antibodies (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA). Data from these ELISAs are expressed as optical density (OD) at 450 nm.

To establish the cut-off of anti-S IgG subclasses, we used the value of the mean plus twice the standard deviation (Mean OD + 2 * SD, 95% CI) of the OD value at 430 nm of 8 pre-pandemic sera (PCR negative, anti-S and anti-N total IgG negative, and with no COVID-19 compatible symptoms) per ELISA plate. This methodology is based on the fact that 95.0% of the data are within 1.96 standard deviations of the mean. Therefore, values outside this range are unlikely to be due to random sampling and are significantly higher than the cut-off point value obtained for each IgG isotype. Values above the cut-offs were considered positive. The cut-offs were established as follows: IgG1: 0.0085; IgG2: 0.0075; IgG3: 0.0559; IgG4: 0.018.

2.8. Statistical Analysis

Quantitative data are presented as mean and standard deviation (SD) or median with interquartile range (IQR), while qualitative variables are expressed as absolute and relative frequencies. Categorical variables were compared using the chi-squared test, and continuous variables were analyzed using Student's *t*-test or the Mann–Whitney U test, as appropriate. Repeated measures were compared using the Wilcoxon signed-rank test or the McNemar test. Spearman's rho was used to assess the correlations between continuous variables. Logistic regression was used to assess factors associated with immune response, with factors showing a univariate association (*p*-value < 0.100) included in the final multivariate model. All calculations were performed using GraphPad Prism version 8.0 and SPSS version 25.0, with a significance level of *p* < 0.05 (two-tailed).

3. Results

3.1. Naïve Kidney Transplant Recipients Have a Lower Response Rate After Fourth Dose of mRNA Vaccine than Dialysis Patients

The demographic characteristics, immunosuppressive therapy, and laboratory findings of all patients are described in Table 1. Among the COVID-19 naïve KTRs, 75.8% (69/91) developed a humoral and cellular response after the fourth dose (vs. 95.7% in DPs, *p* < 0.05). Of the remaining 22 (24.2%) naïve KTRs, 8 patients developed only cell-mediated immunity, 11 developed only a humoral response, and only 3 had no immune response, either cellular or humoral.

In addition, the intensity of the humoral immune response after the fourth dose was also significantly higher in DPs than in KTRs: anti-spike IgG titers of 23,587 (14,275–33,931) vs. 3640 (279–15,940) AU/mL, *p* = 0.002; SNA 70.08% (49.14–85.96) vs. 29.23% (30.03–62.93), *p* = 0.006. However, no differences in the intensity of the cellular response were observed between DPs and KTRs who had a positive response: reactive CD4 T-cell 0.18 (0.03–0.49)

vs. 0.28% (0.25–0.56), $p = 0.535$; reactive CD8 T-cell 0.24 (0.08–0.63) vs. 0.15 (0.01–0.48), $p = 0.288$.

Table 1. Demographic characteristics and laboratory findings of kidney transplant recipients and dialysis patients.

	KTR (N = 146)	Naïve KTR (N = 91)	Infected KTR (N = 55)	DP (N = 23)
Gender (male), N (%)	91 (62.3)	55 (60.4)	36 (65.5)	13 (56.5)
Ethnicity, N (%)				
Caucasian	125 (85.6)	79 (86.8)	46 (83.6)	19 (82.6)
Hispanic	20 (13.7)	12 (13.2)	8 (14.6)	3 (13.0)
Others	1 (0.7)	0 (0)	1 (1.8)	1 (4.4)
Age				
years (mean, SD)	57 (15.0)	60.4 (15.5)	54.4 (13.5)	56 (13)
>60 y, N (%)	73 (50.0)	53 (58.2)	19 (35.2)	12 (52.1)
Diabetes, N (%)	51 (34.9)	32 (35.1)	19 (35.2)	8 (34.7)
HBP, N (%)	132 (90.4)	82 (90.1)	50 (90.9)	23 (100)
Cardiovascular disease, N (%)	34 (23.3)	21 (23.1)	13 (23.6)	8 (34.7)
Chronic lung disease, N (%)	27 (18.5)	16 (17.6)	11 (20)	5 (21.7)
Time since transplantation				
years (median, IQR)	9.2 (4.0–15.8)	9.5 (4.4–17.0)	8.0 (3.8–13.7)	
<5 years, N (%)	41 (28.1)	24 (26.4)	17 (30.9)	
Previous Transplant,				
N (%)	19 (13.0)	12 (13.2)	7 (12.7)	
Immunosuppressive drug, N (%)				
Steroids	73 (50.0)	44 (48.3)	29 (52.7)	
CNI	120 (82.2)	69 (75.8)	51 (92.7)	
MPA	111 (76.0)	70 (76.9)	41 (74.5)	
mTORi	41 (28.1)	26 (28.6)	15 (27.2)	
Thymoglobulin	82 (56.1)	53 (58.2)	29 (52.7)	
Immunosuppressive protocol, N (%)				
MPA + CNI	102 (69.8)	64 (70.3)	38 (69.1)	
MPA + mTORi	19 (13.1)	13 (14.3)	6 (10.9)	
mTORi + CNI	25 (17.1)	14 (15.4)	11 (20.0)	
eGFR (mL/min/1.73 m ²), median (IQR)				
Stages CKD, N (%)				
>60 mL/min/1.73 m ²	49 (33.5)	26 (28.6)	23 (41.8)	
30–60	71 (48.6)	47 (51.6)	24 (43.6)	
<30	26 (17.9)	18 (19.8)	8 (14.6)	
Cells count, 1 × 10 ³ /mm ³ , median (IQR)				
Lymphocyte	1.52 (1.13–2.03)	1.54 (1.06–2.06)	1.70 (1.20–2.37)	1.62 (1.21–2.12)
CD4+ T-cells	0.54 (0.38–0.74)	0.55 (0.35–0.77)	0.59 (0.38–0.78)	
CD8+ T-cells	0.48 (0.34–1.02)	0.45 (0.29–0.78)	0.56 (0.33–0.86)	
Lymphocyte > 1 × 10 ³ /mm ³ , N (%)	107 (73.2)	70 (76.9)	37 (67.3)	20 (91.3)

KTR = kidney transplant recipient. DP = dialysis patient. SD = standard deviation. IQR = interquartile ratio. CKD = chronic kidney disease. CNI = calcineurin inhibitor. MPA = mycophenolate acid. mTORi = mammalian target of rapamycin inhibitor. Egfr = estimated glomerular filtration rate.

3.2. Kinetics of Anti-Spike IgG Subclasses After Vaccination Against SARS-CoV-2 in Naïve Kidney Transplant and Dialysis Patient

In naïve KTRs, median levels of IgG1 were below the cut-off after P1 and it was increased only after the fourth dose (P4). IgG2 was slightly increased after P2 without further increase in subsequent doses. IgG3 was not detected above the cut-off, while median

IgG4 levels were only detected after the fourth dose (P4) (see Table 2 and Supplementary Figure S2).

Table 2. Kinetics of IgG subclasses (median OD 450 nm [IQR]) after vaccination against SARS-CoV-2 in naïve kidney transplant recipients and dialysis patients.

	P1	P2	P3	P4
IgG1 OD (450 nm)				
KTR	0.0043 [0.0028–0.0067]	0.0147 ^a [0.0044–0.0251]	0.0117 [0.0035–0.1069]	0.0470 ^b [0.0103–0.1669]
DP	n.d.	n.d.	0.0490 [0.0290–0.0845]	0.0170 ^c [0.0065–0.0320]
IgG2 OD (450 nm)				
KTR	0.0020 [0.0010–0.0035]	0.0083 ^a [0.005–0.0183]	0.0095 [0.0038–0.0226]	0.0062 [0.0034–0.0214]
DP	n.d.	n.d.	0.0260 [0.0218–0.0495]	0.0530 [0.0123–0.0754]
IgG3 OD (450 nm)				
KTR	0.0227 [0.0108–0.03725]	0.0323 ^d [0.0115–0.0703]	0.0215 [0.0105–0.121]	0.0160 [0.007–0.0775]
DP	n.d.	n.d.	0.0330 [0.0120–0.0470]	0.0415 [0.0284–0.0641]
IgG4 OD (450 nm)				
KTR	0.0060 [0.0010–0.0093]	0.0052 [0.0024–0.011]	0.0070 ^e [0.0019–0.0371]	0.0285 ^f [0.0048–0.1860]
DP	n.d.	n.d.	0.7808 [0.0363–1.1873]	0.8755 [0.1826–1.4783]

P1: At 21 days after 2nd dose. P2: At 3 months after 2nd dose. P3: At 2 months after 3th dose. P4: At 2 months after 4th dose. KTR: kidney transplant recipient (n = 60). DP: dialysis patient (n = 12). ^a IgG1, IgG2 at P1 vs. P2, $p < 0.001$; ^b IgG1 in KTRs at P3 vs. P4, $p = 0.010$; ^c IgG1 in DP at P3 vs. P4, $p = 0.005$; ^d IgG3 at P1 vs. P2, $p = 0.016$; ^e IgG4 in KTRs at P2 vs. P3, $p = 0.007$; ^f IgG4 in KTRs at P3 vs. P4 $p = 0.001$. The cut-offs were established as follows: IgG1: 0.0085; IgG2: 0.0075; IgG3: 0.0559; IgG4: 0.018.

In naïve DPs, a decrease in IgG1 levels was observed after the fourth dose compared to the third dose, and IgG4 was the most prevalent IgG subclass.

Except for IgG1, DPs developed higher levels of the different IgG subclasses than KTRs after four doses of vaccine ($p < 0.001$).

3.3. Effect of Immunosuppressive Therapy on the Kinetics of Anti-Spike IgG Subclasses

Significantly, immunosuppressive therapy had a notable effect on the levels of IgG subclasses in naïve KTRs. Mycophenolate (MPA) had a negative effect on IgG1, IgG3, and IgG4 subclasses after four doses of vaccine, whereas mTOR inhibitors (mTORi) had a positive correlation with pro-inflammatory subclasses (IgG1 and 3). KTRs treated with MPA exhibited lower levels of IgG1 [0.031 (0.003–0.193) vs. 0.127 (0.030–0.364), $p = 0.047$], IgG3 [0.011 (0.004–0.077) vs. 0.034 (0.020–0.100), $p = 0.039$], and IgG4 [0.014 (0.002–0.097) vs. 0.329 (0.069–0.516), $p = 0.006$] than untreated KTRs (Figure 2A). Conversely, mTORi treatment showed significantly higher levels of IgG1 [0.153 (0.050–0.267) vs. 0.023 (0.004–0.137), $p = 0.014$] and IgG3 [0.038 (0.020–0.121) vs. 0.010 (0.004–0.067), $p = 0.024$] than KTRs without mTORi (Figure 2B). Moreover, patients treated with mTORi had a significant increase in total anti-S IgG and SNA after the fourth dose (Supplementary Figure S3).

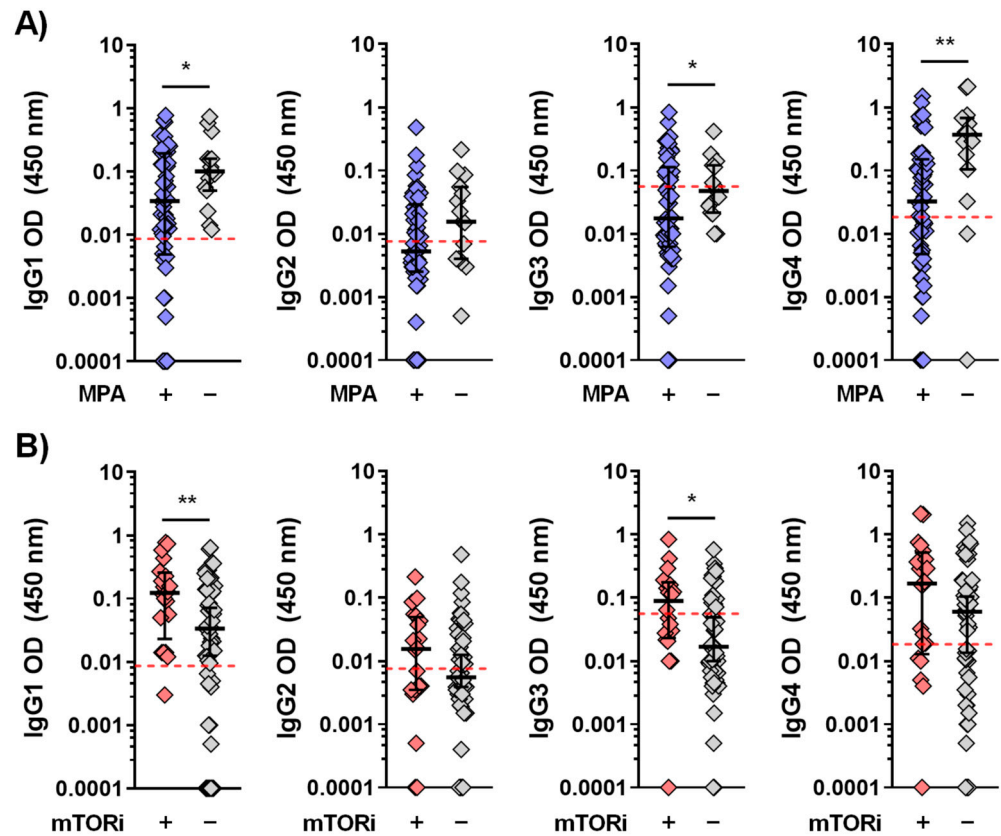


Figure 2. Immunosuppressive treatments modulate IgG subtypes in response to SARS-CoV-2 mRNA vaccination after booster dose. (A) Mycophenolate mofetil treatment (MPA) decreases IgG1 and IgG4 levels, whereas (B) mTOR inhibitors (mTORi) increase IgG1, IgG3, and IgG4 levels in these patients. Untreated condition refers to patients not treated with the analyzed immunosuppressant (e.g., not treated with mTORi, but with other immunosuppression). These findings highlight the distinct immunomodulatory effects of mTORi and MMF on specific IgG subclasses, suggesting possible impacts on treatment efficacy. Only significant p -values (<0.05) are shown, * p -value <0.05 , ** p -value <0.01 . The cut-offs were established as follows: IgG1: 0.0085; IgG2: 0.0075; IgG3: 0.0559; IgG4: 0.018.

No association was found between IgG subclasses and age, gender, or other immunosuppressive therapies.

3.4. Correlation of Anti-Spike IgG Titers and Subclasses with SNA. Factors Associated with SNA

A robust correlation was found between the titers of anti-spike IgG and SNA after the fourth dose in naïve KTRs ($r = 0.823$, $p < 0.001$). Moreover, a positive correlation was observed between the different IgG subclasses and SNA, with the strongest correlation noted with IgG1 (IgG1: $r = 0.706$, $p < 0.001$; IgG2: $r = 0.358$, $p = 0.007$; IgG3: $r = 0.529$, $p < 0.001$; IgG4: $r = 0.502$, $p < 0.001$) and with total IgG ($r = 0.823$, $p < 0.0001$) (Figure 3).

Finally, we examined potential factors associated with achieving SNA $> 65\%$ after the fourth dose, which represents the 75th percentile of the data set.

Only mTORi therapy was statistically associated with SNA in COVID-19 naïve KTRs in the multiple logistic regression analysis. Patients receiving this treatment were more than four times more likely to develop high SNA [4.29 (1.21–15.17), $p = 0.024$], as shown in Table 3.

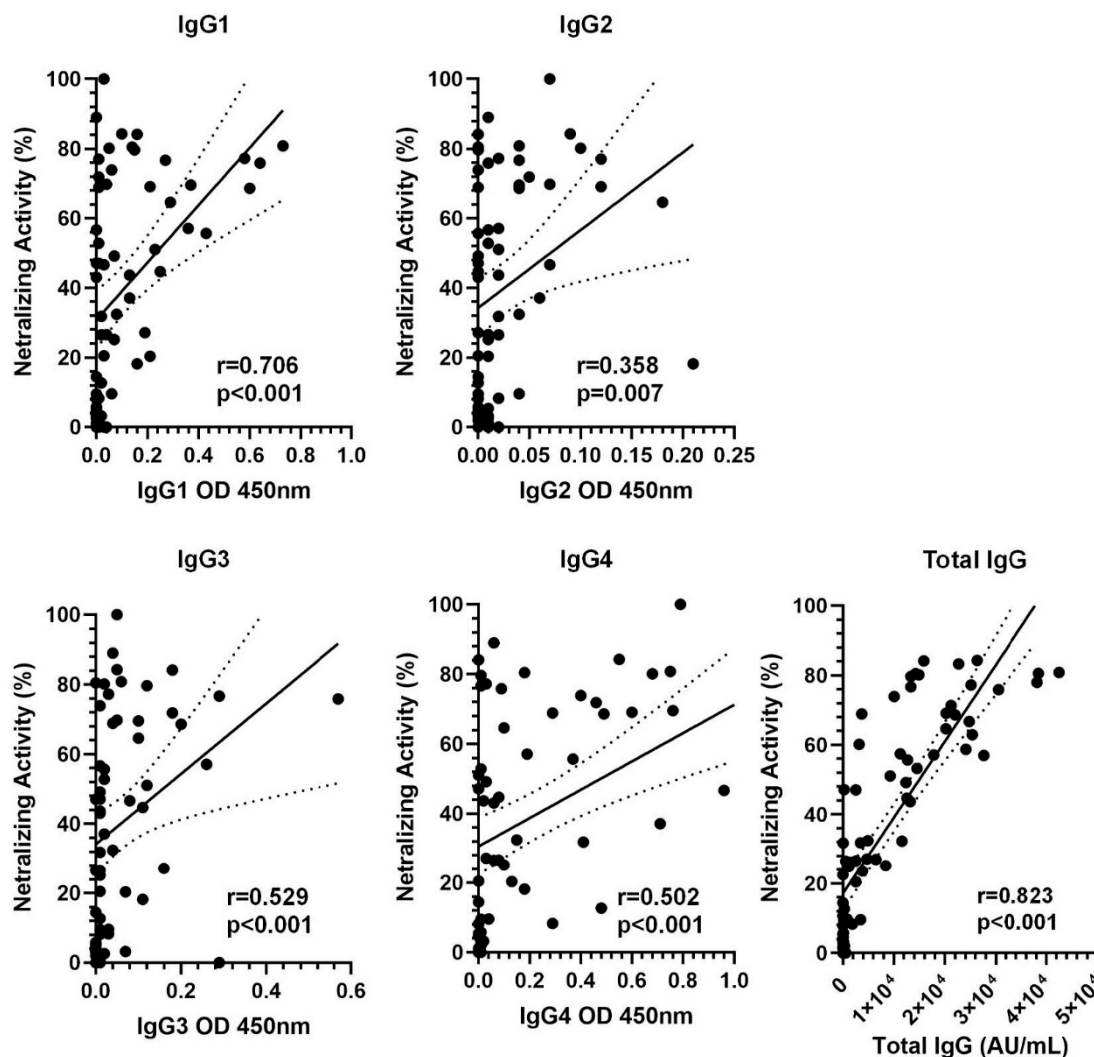


Figure 3. Correlation of IgG subclasses and total IgG levels with serum neutralizing activity (SNA) in kidney transplant recipients. Total IgG ($r = 0.823$, p -value < 0.001) and IgG subclasses showed a positive correlation with SNA, with IgG1 subclass having the higher r -value (0.706 , p -value < 0.001).

Table 3. Serum neutralizing activity $>65\%$ (percentile 75) after 4 doses of vaccine in naïve KTRs.

SNA > 65%	Univariate		Multivariate	
	OR (CI 95%)	<i>p</i>	OR (CI 95%)	<i>p</i>
Diabetes	1.81 (0.64–5.07)	0.200		
Age >60 years	0.67 (0.48–0.95)	0.077	0.49 (0.15–1.55)	0.227
Gender male	0.90 (0.58–1.39)	0.671		
Steroids	0.54 (0.36–0.80)	0.019	0.83 (0.24–2.77)	0.764
CNI	0.98 (0.71–1.36)	0.939		
MPA	0.89 (0.69–1.16)	0.490	0.52 (0.13–2.03)	0.350
mTORi	5.20 (0.77–35.17)	0.027	4.29 (1.21–15.17)	0.024
Thymoglobulin	0.67 (0.47–0.95)	0.073	0.92 (0.25–3.30)	0.902
eGFR > 30 mL/min	3.03 (0.87–10.55)	0.072	2.89 (0.31–26.68)	0.349
<5 years since transplantation	0.93 (0.68–1.26)	0.685		
Previous transplant	1.85 (0.49–6.87)	0.353		
Lymphocyte $> 1 \times 10^3/\text{mm}^3$	0.97 (0.35–2.63)	0.953		

CNI = calcineurin inhibitor. MPA = mycophenolate acid. mTORi = mammalian target of rapamycin inhibitor. eGFR = estimated glomerular filtration rate.

3.5. Impact of Infection Before the Fourth Dose on the Vaccine-Induced Immune Response

Fifty-five KTRs (37.6%) developed either symptomatic or asymptomatic SARS-CoV-2 breakthrough infection after the booster dose. Seventeen patients had a history of COVID-19 prior to the first vaccine dose, eleven of whom met the criteria for severe COVID-19. Ten KTRs became infected after the second dose of vaccine, while twenty-eight were infected after the third dose (Figure 1). All patients who became infected after vaccination experienced mild or no symptoms.

These 55 infected KTRs exhibited a significant increase in anti-spike IgG titers after receiving the fourth dose, as evidenced in Table 4 (see Supplementary Figure S3c,d for a visual representation of the data). Furthermore, infected KTRs also showed a higher SNA than naïve KTRs [30.0 (7.9–62.9) vs. 74.4 (51.3–82.4)%, $p < 0.001$]. Interestingly, we found that infected KTRs had higher IgG titers for the different IgG subclasses than naïve patients, although this was statistically significant only for IgG3 [0.016 (0.006–0.077) vs. 0.098 (0.055–0.222), $p < 0.001$] and IgG4 [0.028 (0.003–0.214) vs. 0.155 (0.056–0.912), $p = 0.003$]. Regarding the cell-mediated immune response, infected KTRs also showed a higher proportion of reactive CD8 T-cells than their naïve counterparts (Table 4). No differences in the immune response were observed according to the severity of the infection.

Table 4. Characteristics of specific immunity 2 months after the fourth dose (P4) according to previous SARS-CoV-2 infection.

SARS-CoV-2 Infection Before 4th Dose	Naïve KTR (N = 91)	Infected KTR (N = 55)	<i>p</i>
IgG SARS-CoV-2 (BAU/mL)	516.9 (39.6–2263.5)	3389.1 (1707.6–8427.1)	<0.001
SNA (%)	30.0 (7.9–62.9)	74.4 (51.3–82.4)	<0.001
IgG1 (OD 450 nm)	0.047 (0.006–0.193)	0.078 (0.017–0.176)	0.450
IgG2 (OD 450 nm)	0.006 (0.002–0.022)	0.026 (0.003–0.056)	0.241
IgG3 (OD 450 nm)	0.016 (0.006–0.077)	0.098 (0.055–0.222)	<0.001
IgG4 (OD 450 nm)	0.028 (0.003–0.214)	0.155 (0.056–0.912)	0.003
IFN γ -CD4 (%)	0.28 (0.02–0.56)	0.31 (0.09–0.55)	0.608
IFN γ -CD8 (%)	0.15 (0.01–0.48)	0.30 (0.15–0.83)	0.005

KTR = kidney transplant recipient. SNA = serum neutralizing activity. IFN γ = interferon gamma. OD = optical density.

3.6. Correlation Between Humoral Immunity and Incidence of Breakthrough Infection After the Fourth Vaccine Dose

During the six months following P4 (2 months after the fourth dose), 25 of the 91 naïve KTRs became infected. These 25 patients exhibited a weaker humoral immune response after four doses compared to those who remained uninfected, as evidenced by lower IgG titers and SNA percentage (Table 5).

Table 5. Characteristics of specific immunity at P4 between naïve and infected KTRs at nine months after the fourth dose of the vaccine.

SARS-CoV-2 Infection After 4th Dose	Naïve KTR (N = 66)	Infected KTR (N = 25)	<i>p</i>
IgG SARS-CoV-2 (BAU/mL)	1429.7 (63.8–2870.4)	121.6 (1.0–869.6)	0.005
SNA (%)	45.8 (8.5–69.4)	20.3 (1.9–46.1)	0.012
IgG1 (OD 450 mm)	0.050 (0.006–0.205)	0.039 (0.000–0.060)	0.009
IgG2 (OD 450 mm)	0.005 (0.002–0.037)	0.002 (0.000–0.006)	0.006
IgG3 (OD 450 mm)	0.017 (0.006–0.095)	0.000 (0.000–0.014)	<0.001
IgG4 (OD 450 mm)	0.032 (0.003–0.367)	0.001 (0.000–0.012)	<0.001
IFN γ -CD4 (%)	0.28 (0.00–0.56)	0.30 (0.09–0.64)	0.373
IFN γ -CD8 (%)	0.17 (0.00–0.68)	0.12 (0.00–0.46)	0.421

KTR = kidney transplant recipient. SNA = serum neutralizing activity. IFN γ = interferon gamma. OD = optical density.

Notably, KTRs who achieved an SNA greater than 65% after the fourth dose were almost four times less likely to become infected in the following six months (OR 3.63, 95%CI 0.91–14.55, $p = 0.034$).

Similar results were found for IgG subclasses. Infected KTRs had lower IgG subclass titers compared to non-infected patients, as shown in Table 5.

4. Discussion

Our results showed that KTRs have a high risk of breakthrough infection after the generally scheduled vaccination, even showing suboptimal seropositive protection after the third dose [5,19,20], which led to the recommendation of a fourth dose for these patients. Recent studies suggest that a fourth dose of the mRNA-based Pfizer-BioNTech or Moderna vaccines may offer short-term benefits to individuals with compromised immune systems, particularly kidney transplant recipients (KTRs), by improving immune responses. The World Health Organization has indicated that additional booster doses, such as a second booster, could enhance protection in these populations, although the overall benefit continues to be evaluated [21–24]. However, few studies have evaluated neutralization capacity after the fourth vaccine dose, and none has demonstrated an impact of SNA on breakthrough infection.

This study tracked antibody and cell-mediated responses in kidney transplant recipients (KTRs) receiving four doses of mRNA vaccines, comparing them with non-immunocompromised individuals undergoing dialysis (DPs). We also analyzed the anti-spike IgG subclass kinetics, which has not been previously reported in this population. Our results showed that repeated mRNA vaccinations in DPs triggered a delayed increase in IgG2 and IgG4 titers, with IgG4 being predominant, while IgG1 titers decreased after the fourth dose, like findings in healthy individuals [25]. However, in KTRs we showed that IgG1 titers increased after the second dose, lost the boosting effect after the third dose, and increased again after the fourth dose. Anti-spike IgG4 titers increased gradually after the third and fourth doses, but did not reach the high titers seen in DPs, probably due to the lack of general response shown in total IgG data.

The robust and sustained induction of anti-spike IgG4 following multiple doses of vaccine may be a consequence of ongoing class switch recombination (CSR) events in Ag-experienced B cells within germinal centers. Irrgang et al. state that the presence of anti-S IgG4 antibodies after the second immunization with the BNT162b2 vaccine indicates that a prolonged period of ongoing B cell maturation may be linked to increased CSR towards distal IgG subclasses. This, in turn, may result in the generation of IgG4-switched memory B cells over time [26]. In the present study, which encompassed four doses of mRNA-based vaccines, a comparable shift towards non-inflammatory IgG subclasses was observed. However, it should be noted that the levels and functional profile of spike-specific antibodies induced by the two vaccine types have been documented to exhibit slight disparities [27].

However, the IgG4 response is not a common result of repeated antigen exposure in vaccinations against other microorganisms, nor even of all types of SARS-CoV-2 vaccines. Several years ago, Hendriks et al. hypothesized that the pronounced IgG4 response after some types of *Pertussis* vaccines could imply a different triggering of the immune system and a Th2 polarization of T-cells [28]. Other authors have described that IgG4 kinetics are exclusive to mRNA vaccines, not happening with other classic vaccination procedures, such as adenoviral vectors or inactivated COVID-19 vaccines [8,9,29].

It is clearly described that IgG4 and IgG2 have a lower potential to mediate Fc γ Rs-dependent secondary effector functions, thus being considered non-inflammatory antibodies [10]. Whether the striking increase in IgG4 subclass has functional consequences for

host defense mechanisms against SARS-CoV-2 infection is still under discussion. Some works have described that hybrid immunity had the highest magnitude and durability of protection [30]. In our cohort study, we observed that patients with previous infection receiving four doses of mRNA vaccine had higher SNA and more elevated anti-spike titers, specifically for the IgG4 subclass. In addition, we found evidence that increased anti-spike IgG subclass titers, including IgG4, were associated with increased SNA and a lower rate of breakthrough infection after four doses of vaccine. From these observations, it could be deduced that elevated IgG4 titers should have a positive impact on patients.

This association between anti-spike IgG4 titers and SNA was not found by Goyins et al., who investigated the antibody response to SARS-CoV-2 in a group of convalescent patients. They observed a moderate correlation between IgG1 and IgG3 and SNA, but no correlation with IgG2 and IgG4 [31].

Another remarkable finding of our study was the relationship between immunosuppressive therapy and the kinetics of anti-spike IgG subclasses. MPA had a negative effect on IgG1, IgG3, and IgG4 subclasses, whereas mTORi had a positive correlation with pro-inflammatory subclasses.

The use of MPA has been observed to have a negative effect on the efficacy of the SARS-CoV-2 vaccine in kidney transplant recipients (KTRs) and patients with autoimmune diseases, as indicated by a meta-analysis demonstrating that MPA is an independent risk factor for an adverse antibody response following immunization with two vaccine doses in KTRs [32]. In a related study, Tang et al. demonstrated that the administration of MPA to patients with systemic lupus erythematosus diminished the serological response to the SARS-CoV-2 vaccine [33], suggesting that MPA mitigated the humoral response to vaccination irrespective of the recipient's characteristics. These findings are maintained after the fourth vaccine dose, in contrast to mTORi, which plays a protective role, as we demonstrated in our study; so much so that it is mTOR inhibitors that are mainly responsible for an adequate SNA, which decreases the risk of infection in KTRs.

The current research on mRNA vaccines has primarily focused on those targeting COVID-19, with several studies observing an increase in IgG4 antibodies associated with repeated mRNA SARS-CoV-2 vaccination and reductions in Fc-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and antibody-dependent complement deposition (ADCD) that may limit control of viral infection [34]. This induction of IgG4 antibodies was not observed after immunization with protein vaccines or adenoviral vectors [9,29]. These data, along with our own results, set the rationale to use hybrid vaccination as the first-line protocol to induce a highly protective response in immunocompromised patients.

Finally, other kinds of vaccine against viruses other than SARS-CoV-2 have demonstrated a reduced level of seroprotection in immunocompromised populations. For instance, the influenza vaccine can generate a humoral response in transplant recipients, but with a lower level of protection, despite variable responses [35]. A less robust response has also been observed to the respiratory syncytial vaccinations in immunocompromised patients [36]. Therefore, the low response to vaccination is not unique to mRNA vaccines, although neither the response with mRNA vaccines nor the hybrid response, which, in our hands, seems to offer more robust responses, was evaluated in these studies.

This article has several limitations: First, the sample size was reduced, mainly because part of the original study population declined to receive up to four doses of the vaccine, and several of them contracted COVID-19 disease at study end points, forcing early withdrawal from the study. However, the analysis of the SARS-CoV-2 infected population has allowed us to analyze mixed immunity (by vaccination and infection) in this type of patient, as well as to determine the efficacy in terms of safety and post-infection protection of the different doses, as shown by the fact that KTRs who achieved an SNA greater than 65%

after the fourth dose were almost four times less likely to become infected in the following six months.

Second, this paper focuses on the response to vaccination against the virus in its WT strain, as the vaccines administered correspond with the first waves of the pandemic (both BNT162b2 and mRNA-1273). However, in addition to the specific information regarding protection against severe SARS-CoV-2 disease, it is hoped that the data shown in this article can be extrapolated to other mRNA-based vaccines, such as versions for new variants of SARS-CoV-2 or other types of viral infections.

5. Conclusions

This work describes, for the first time, the dynamics of the immune response following multiple doses of mRNA-based COVID-19 vaccines in KTRs. We show that the administration of a fourth dose of mRNA vaccine significantly enhances the humoral and cellular immune response in KTRs, with a robust and sustained induction of anti-spike IgG4 that positively correlates with SNA and confers protection against breakthrough infection. Furthermore, immunosuppressive therapy has a notable impact on the kinetics of IgG subclasses, with mycophenolate having a negative effect on IgG1, IgG3, and IgG4 levels, whereas mTOR inhibitors exhibit a positive correlation with pro-inflammatory subclasses. Based on the data obtained in this article and other publications linking mTORi to improved response, we believe that non-responders may benefit from switching therapy to include an mTOR inhibitor (such as Everolimus) to increase response to vaccination, provided it is not contraindicated (proteinuria, allergy, or serious adverse effects on previous mTORi treatment).

In conclusion, these findings underscore the importance of booster vaccination strategies in combination with immunomodulatory treatments and highlight the potential of IgG4 as a key mediator of protective immunity against SARS-CoV-2 in immunocompromised populations such as KTRs.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/vaccines13020123/s1>, Figure S1: Dot plot of negative control (DMSO 10%) and SARS-CoV-2 peptide pool to determine cellular response frequency in PBMC from KTR and DP. Figure S2: Graphical representation of IgG subclasses kinetics in KTR and DP donors. Figure S3: IgG kinetics and neutralizing activity in KTR.

Author Contributions: All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by I.P.-F., I.J., A.A.V., A.L.-G., R.G.-G., B.A.-P., B.R.-P., N.C.R., B.R.-C., M.G.D.M. and B.P.-J. The first draft of the manuscript was written by I.P.-F., I.J., A.A.V., E.M.-N. and A.I.S.-F. A.S.A.M., M.A.M.d.l.H., E.B.-M. and A.I.S.-F. were involved in the follow-up of patients and sample obtention, and I.P.-F., I.J., A.A.V., A.L.-G., R.G.-G., B.A.-P., B.R.-P., N.C.R., B.R.-C., M.G.D.M., B.P.-J., E.M.-N., A.I.S.-F., A.S.A.M., M.A.M.d.l.H. and E.B.-M. commented on previous versions of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grants from Fundación Mutua Madrileña (Ayudas a la investigación en salud; Grant number AP177642021) to A.I.S.-F. and from Comunidad de Madrid (REACT-UE, ANTICIPA-CM Ref. PR38/21-24) to E.M.-N.

Institutional Review Board Statement: The studies involving human participants were reviewed and approved by Ethics Committee of Hospital Clínico San Carlos (28 June 2021, 21/200-E).

Informed Consent Statement: The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

Data Availability Statement: The original contributions presented in the study are included in the article. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

- Polack, F.P.; Thomas, S.J.; Kitchin, N.; Absalon, J.; Gurtman, A.; Lockhart, S.; Perez, J.L.; Pérez Marc, G.; Moreira, E.D.; Zerbini, C.; et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 2603–2615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Baden, L.R.; El Sahly, H.M.; Essink, B.; Kotloff, K.; Frey, S.; Novak, R.; Diemert, D.; Spector, S.A.; Roupshael, N.; Creech, C.B.; et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *384*, 403–416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wratil, P.R.; Stern, M.; Priller, A.; Willmann, A.; Almanzar, G.; Vogel, E.; Feuerherd, M.; Cheng, C.-C.; Yazici, S.; Christa, C.; et al. Three exposures to the spike protein of SARS-CoV-2 by either infection or vaccination elicit superior neutralizing immunity to all variants of concern. *Nat. Med.* **2022**, *28*, 496–503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Muecksch, F.; Wang, Z.; Cho, A.; Gaebler, C.; Ben Tanfous, T.; DaSilva, J.; Bednarski, E.; Ramos, V.; Zong, S.; Johnson, B.; et al. Increased memory B cell potency and breadth after a SARS-CoV-2 mRNA boost. *Nature* **2022**, *607*, 128–134. [[CrossRef](#)]
- Pérez-Flores, I.; Juárez, I.; Meneses, A.S.A.; Lopez-Gomez, A.; Romero, N.C.; Rodriguez-Cubillo, B.; de la Higuera, M.A.M.; Peix-Jiménez, B.; Gonzalez-Garcia, R.; Baos-Muñoz, E.; et al. Role of mTOR inhibitor in the cellular and humoral immune response to a booster dose of SARS-CoV-2 mRNA-1273 vaccine in kidney transplant recipients. *Front. Immunol.* **2023**, *14*, 1111569. [[CrossRef](#)]
- Korobova, Z.R.; Zueva, E.V.; Arsentieva, N.A.; Batsunov, O.K.; Liubimova, N.E.; Khamitova, I.V.; Kuznetsova, R.N.; Rubinstein, A.A.; Savin, T.V.; Stanevich, O.V.; et al. Changes in Anti-SARS-CoV-2 IgG Subclasses over Time and in Association with Disease Severity. *Viruses* **2022**, *14*, 941. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
- Chen, W.; Zhang, L.; Li, J.; Bai, S.; Wang, Y.; Zhang, B.; Zheng, Q.; Chen, M.; Zhao, W.; Wu, J. The kinetics of IgG subclasses and contributions to neutralizing activity against SARS-CoV-2 wild-type strain and variants in healthy adults immunized with inactivated vaccine. *Immunology* **2022**, *167*, 221–232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Poolchanuan, P.; Matsee, W.; Sengyee, S.; Siripoon, T.; Dulsuk, A.; Phunpang, R.; Pisutsan, P.; Piyaphanee, W.; Luvira, V.; Chantratita, N. Dynamics of Different Classes and Subclasses of Antibody Responses to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Variants after Coronavirus Disease 2019 and CoronaVac Vaccination in Thailand. *mSphere* **2023**, *8*, e0046522. [[CrossRef](#)]
- Irrgang, P.; Gerling, J.; Kocher, K.; Lapuente, D.; Steininger, P.; Habenicht, K.; Wytopil, M.; Beileke, S.; Schäfer, S.; Zhong, J.; et al. Class switch toward noninflammatory, spike-specific IgG4 antibodies after repeated SARS-CoV-2 mRNA vaccination. *Sci. Immunol.* **2023**, *8*, eade2798. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Vidarsson, G.; Dekkers, G.; Rispiens, T. IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 520. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
- Iles, J.K.; Zmuidinaite, R.; Sadee, C.; Gardiner, A.; Lacey, J.; Harding, S.; Wallis, G.; Patel, R.; Roblett, D.; Heeney, J.; et al. Determination of IgG1 and IgG3 SARS-CoV-2 Spike Protein and Nucleocapsid Binding—Who Is Binding Who and Why? *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 6050. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
- Rispiens, T.; Huijbers, M.G. The unique properties of IgG4 and its roles in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2023**, *23*, 763–778. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pincetic, A.; Bournazos, S.; DiLillo, D.J.; Maamary, J.; Wang, T.T.; Dahan, R.; Fiebiger, B.-M.; Ravetch, J.V. Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. *Nat. Immunol.* **2014**, *15*, 707–716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
- de Taeye, S.W.; Bentlage, A.E.H.; Mebius, M.M.; Meesters, J.L.; Lissenberg-Thunnissen, S.; Falck, D.; Sénard, T.; Salehi, N.; Wuhrer, M.; Schuurman, J.; et al. FcγR Binding and ADCC Activity of Human IgG Allotypes. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 740. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
- Nimmerjahn, F.; Ravetch, J.V. Antibody-mediated modulation of immune responses. *Immunol. Rev.* **2010**, *236*, 265–275. [[CrossRef](#)]
- Fitzpatrick, E.A.; Wang, J.; Strome, S.E. Engineering of Fc Multimers as a Protein Therapy for Autoimmune Disease. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
- Jefferis, R.; Lefranc, M.P. Human immunoglobulin allotypes: Possible implications for immunogenicity. *MAbs* **2009**, *1*, 332–338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Idusogie, E.E.; Presta, L.G.; Gazzano-Santoro, H.; Totpal, K.; Wong, P.Y.; Ultsch, M.; Meng, Y.G.; Mulkerrin, M.G. Mapping of the C1q Binding Site on Rituxan, a Chimeric Antibody with a Human IgG1 Fc. *J. Immunol.* **2000**, *164*, 4178–4184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Massa, F.; Cremoni, M.; Gérard, A.; Grabsi, H.; Rogier, L.; Blois, M.; Couzin, C.; Ben Hassen, N.; Rouleau, M.; Barbosa, S.; et al. Safety and cross-variant immunogenicity of a three-dose COVID-19 mRNA vaccine regimen in kidney transplant recipients. *EBioMedicine* **2021**, *73*, 103679. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Benning, L.; Morath, C.; Bartenschlager, M.; Kim, H.; Reineke, M.; Beimler, J.; Buylaert, M.; Nusshag, C.; Kälble, F.; Reichel, P.; et al. Neutralizing antibody response against the B.1.617.2 (delta) and the B.1.1.529 (omicron) variants after a third mRNA SARS-CoV-2 vaccine dose in kidney transplant recipients. *Am. J. Transplant.* **2022**, *22*, 1873–1883. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

21. Alejo, J.L.; Mitchell, J.M.; Chiang, T.P.-Y.; Abedon, A.T.B.; Boyarsky, B.J.; Avery, R.K.; Tobian, A.A.; Levan, M.L.J.; Massie, A.B.; Garonzik-Wang, J.M.; et al. Antibody Response to a Fourth Dose of a SARS-CoV-2 Vaccine in Solid Organ Transplant Recipients: A Case Series. *Transplantation* **2021**, *105*, e280–e281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Benotmane, I.; Bruel, T.; Planas, D.; Fafi-Kremer, S.; Schwartz, O.; Caillard, S. A fourth dose of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine improves serum neutralization against the Delta variant in kidney transplant recipients. *Kidney Int.* **2022**, *101*, 1073–1076. [[CrossRef](#)]
23. Caillard, S.; Thauinat, O.; Benotmane, I.; Masset, C.; Blancho, G. Antibody Response to a Fourth Messenger RNA COVID-19 Vaccine Dose in Kidney Transplant Recipients: A Case Series. *Ann. Intern. Med.* **2022**, *175*, 455–456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Midtvedt, K.; Midtvedt, K.; Vaage, J.T.; Vaage, J.T.; Heldal, K.; Heldal, K.; Munthe, L.A.; Munthe, L.A.; Lund-Johansen, F.; Lund-Johansen, F.; et al. Fourth dose of the SARS-CoV-2 vaccine in kidney transplant recipients with previously impaired humoral antibody response. *Am. J. Transplant.* **2022**, *22*, 2704–2706. [[CrossRef](#)]
25. Yoshimura, M.; Sakamoto, A.; Ozuru, R.; Kurihara, Y.; Itoh, R.; Ishii, K.; Shimizu, A.; Chou, B.; Nabeshima, S.; Hiromatsu, K. The appearance of anti-spike receptor binding domain immunoglobulin G4 responses after repetitive immunization with messenger RNA-based COVID-19 vaccines. *Int. J. Infect. Dis.* **2023**, *139*, 1–5. [[CrossRef](#)]
26. Sheehan, J.; Ardizzone, C.M.; Khanna, M.; Trauth, A.J.; Hagensee, M.E.; Ramsay, A.J. Dynamics of Serum-Neutralizing Antibody Responses in Vaccinees through Multiple Doses of the BNT162b2 Vaccine. *Vaccines* **2023**, *11*, 1720. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Naranbhai, V.; Garcia-Beltran, W.F.; Chang, C.C.; Mairena, C.B.; Thierauf, J.C.; Kirkpatrick, G.; Onozato, M.L.; Cheng, J.; Denis, K.J.S.; Lam, E.C.; et al. Comparative Immunogenicity and Effectiveness of mRNA-1273, BNT162b2, and Ad26.COV2.S COVID-19 Vaccines. *J. Infect. Dis.* **2021**, *225*, 1141–1150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Hendriks, L.H.; Schure, R.-M.; Öztürk, K.; de Rond, L.G.; de Greeff, S.; Sanders, E.A.; Berbers, G.A.; Buisman, A.-M. Different IgG-subclass distributions after whole-cell and acellular pertussis infant primary vaccinations in healthy and pertussis infected children. *Vaccine* **2011**, *29*, 6874–6880. [[CrossRef](#)]
29. Buhre, J.S.; Pongracz, T.; Künsting, I.; Lixenfeld, A.S.; Wang, W.; Nouta, J.; Lehrian, S.; Schmelter, F.; Lunding, H.B.; Dühring, L.; et al. mRNA vaccines against SARS-CoV-2 induce comparably low long-term IgG Fc galactosylation and sialylation levels but increasing long-term IgG4 responses compared to an adenovirus-based vaccine. *Front. Immunol.* **2023**, *13*, 1020844. [[CrossRef](#)]
30. Bobrovitz, N.; Ware, H.; Ma, X.; Li, Z.; Hosseini, R.; Cao, C.; Selemon, A.; Whelan, M.; Premji, Z.; Issa, H.; et al. Protective effectiveness of previous SARS-CoV-2 infection and hybrid immunity against the omicron variant and severe disease: A systematic review and meta-regression. *Lancet Infect. Dis.* **2023**, *23*, 556–567. [[CrossRef](#)]
31. A Goyins, K.; Yu, J.-J.; Papp, S.B.; Beddard, R.; Murthy, A.K.; Chambers, J.P.; Arulanandam, B.P. Isotyping and quantitation of the humoral immune response to SARS-CoV-2. *Exp. Biol. Med.* **2022**, *247*, 1055–1060. [[CrossRef](#)]
32. Zong, K.; Peng, D.; Yang, H.; Huang, Z.; Luo, Y.; Wang, Y.; Xiang, S.; Li, T.; Mou, T.; Wu, Z. Risk Factors for Weak Antibody Response of SARS-CoV-2 Vaccine in Adult Solid Organ Transplant Recipients: A Systemic Review and Meta-Analysis. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 888385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Tang, W.; Gartshteyn, Y.; Ricker; Inzerillo, S.; Murray, S.; Khalili, L.; Askanase, A. The Use of COVID-19 Vaccines in Patients with SLE. *Curr. Rheumatol. Rep.* **2021**, *23*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Kalkeri, R.; Zhu, M.; Cloney-Clark, S.; Plested, J.S.; Parekh, A.; Gorinson, D.; Cai, R.; Mahato, S.; Ramanathan, P.; Aurelia, L.C.; et al. Altered IgG4 antibody response to repeated mRNA versus recombinant protein SARS-CoV-2 vaccines. *J. Infect.* **2024**, *88*, 106119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Kumar, D.; Blumberg, E.A.; Danziger-Isakov, L.; Kotton, C.N.; Halasa, N.B.; Ison, M.G.; Avery, R.K.; Green, M.; Allen, U.D.; Edwards, K.M.; et al. Influenza Vaccination in the Organ Transplant Recipient: Review and Summary Recommendations. *Am. J. Transplant.* **2011**, *11*, 2020–2030. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Karaba, A.H.; Hage, C.; Sengsouk, I.; Balasubramanian, P.; Segev, D.L.; Tobian, A.A.A.R.; Werbel, W.A. Antibody Response to Respiratory Syncytial Virus Vaccination in Immunocompromised Persons. *JAMA* **2024**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.