



I MECCANISMI RECETTORIALI E RIPRODUTTIVI DEL VIRUS SARS-CoV-2 E QUELLI NATURALI DI DIFESA E ADATTAMENTO POSSONO AGEVOLARE LA SCELTA TRA TUTTE LE POSSIBILI STRATEGIE TERAPEUTICHE ?

Dott.ssa Lucia Gasparini
10/4/2020 Aggiornamento 2

Introduzione

La pandemia di COVID-19 sta dilagando distruggendo vite, sistemi produttivi ed economici. L'attenzione di tutti è concentrata su questo evento globale e i ricercatori, a tutti i livelli, stanno facendo una lotta contro il tempo per trovare nuove terapie, vaccini o comunque nuove strategie di contenimento.

Questa immane attività di ricerca, sollecitata dalla gravità e dalla velocità di diffusione del fenomeno, limita il rispetto delle varie fasi di sperimentazione e solleva anche nuovi problemi di ordine epistemologico ed etico.

Attualmente, in mancanza di trattamenti specifici antivirali e di vaccini per il COVID-19, è importante e non banale che la ricerca non trascuri le leggi naturali di adattamento guidate dalla selezione naturale e dall'evoluzione selettiva.

Selezione naturale

La selezione naturale è la riproduzione differenziale dei genotipi e, attraverso essa, aumentano nel tempo i caratteri che contribuiscono alla sopravvivenza e alla riproduzione.

La teoria di Darwin, che fu sviluppata verso la metà del XIX secolo, sostiene che gli organismi producono un numero di discendenti maggiore di quello che può essere sostenuto dall'ambiente e che vi sia una lotta per la sopravvivenza. Gli organismi che sopravvivono e si riproducono trasmettono alla loro progenie i caratteri che favoriscono la sopravvivenza e la riproduzione. Dopo molte generazioni i caratteri associati ad una forte capacità competitiva diventano prevalenti. La selezione competitiva per la sopravvivenza e la riproduzione è il meccanismo che cambia le caratteristiche fisiche e comportamentali di una specie e fu definito da C. Darwin "*selezione naturale*". Essa produce organismi che sono finemente adattati al loro ambiente, è la forza dominante dell'evoluzione di molti caratteri e ha forgiato molta della variabilità fenotipica presente in natura.

La selezione naturale viene misurata in termini di *fitness darwiniana* o adattabilità che viene definita come la capacità riproduttiva relativa dei genotipi. Pertanto, *la selezione naturale si misura stabilendo il tasso di riproduzione.*

La selezione naturale può produrre numerosi effetti diversi sul pool genico di una popolazione. Può eliminare o mantenere la variabilità genetica, può far variare o meno le frequenze alleliche; può produrre divergenza genetica tra popolazioni o mantenere uniformità. L'effetto che prevale dipende principalmente dalle fitness relative dei genotipi, dal grado di dominanza e dalle frequenze alleliche nella popolazione.

A livello di gene la selezione naturale cambia la frequenza degli alleli nella popolazione. A livello di fenotipo essa influenza la distribuzione dei caratteri quantitativi e può essere direzionale o stabilizzante.

La *selezione direzionale* è la selezione che favorisce valori di un carattere ad un estremo della sua distribuzione. Ha come risultato quello di far variare le frequenze alleliche in modo da eliminare l'allele sfavorevole dalla popolazione, nel caso in cui sia dominante o codominante, ma di mantenerlo con bassa frequenza nella popolazione se recessivo e nascosto dallo stato eterozigote. In entrambi i casi, la selezione direzionale diminuisce la quota di variabilità genetica in una popolazione.

La *selezione stabilizzante* è la selezione che favorisce i valori intermedi di un carattere associato a fitness elevata.

Le strategie di adattamento e la selezione naturale

Le varie specie animali sono in grado di elaborare strategie per adattarsi all'ambiente e gli studi, sui modelli di ottimizzazione dell'adattamento, hanno evidenziato che la selezione naturale favorisce gli individui il cui comportamento porta al successo riproduttivo. La sopravvivenza genetica e il successo riproduttivo non implicano unicamente la trasmissione del proprio patrimonio genetico a diretti discendenti, ma anche la capacità, mediante un adeguato comportamento, di garantire la massima presenza genetica nelle generazioni successive.

Da diversi studi in campo etologico è emerso che la selezione naturale, sebbene incoraggi il successo riproduttivo individuale, premia anche il comportamento di aiuto reciproco, come nelle attività di pulizia, di alimentazione, di insegnamento, di segnalazioni di pericolo e la collaborazione in caso di scontri e di caccia.

W.D.Hamilton, nei suoi studi sulla competizione per la sopravvivenza e la propagazione dei geni, ha osservato che la selezione naturale sembra favorire gli organismi che aiutano un loro affine, chiunque esso sia, in quanto così facendo accrescono la loro rappresentanza genetica totale. Egli ha definito questo concetto utilizzando il termine di *fitness* (idoneità) complessiva, in quanto include sia i geni che un organismo trasmette attraverso i figli, sia le copie di quei geni che esso contribuisce a propagare in parenti che sono in grado di riprodursi. Questa teoria dell'idoneità complessiva può spiegare l'evoluzione all'altruismo, come nei casi di alcune specie, tipo la formica o l'ape, che non si riproducono, ma si dedicano esclusivamente ad accudire i loro parenti.

L'eredità dei Neanderthal

Nel corso del tempo i cambiamenti a carico dei geni coinvolti nell'immunità innata sono stati limitati e la pressione selettiva ha favorito alcune varianti che sono state ad un certo punto molto frequenti. Due diversi gruppi di studio hanno scoperto che i geni fondamentali per l'immunità innata hanno una chiara derivazione dal genoma di specie umane arcaiche, come l'uomo di Neanderthal e l'uomo di Denisova. I tre specifici geni, che codificano per i recettori di tipo Toll (*toll-like receptors*), denominati TLR1, TLR6 e TLR10 sono quelli che presentano maggiori influenze neandertaliane fondamentali, sia nei genomi europei, sia in quelli asiatici.

Grazie ai contatti e agli incroci con l' *homo sapiens* è stata possibile l'evoluzione umana ed in particolare quella dell'immunità innata ed una maggiore reattività e possibilità di difesa nei confronti dei patogeni , compresi virus pericolosi.

Meccanismi naturali di difesa e di adattamento

La spinta genica selettiva ed quella epigenetica hanno consentito all'organismo umano di acquisire dei meccanismi naturali ed ancestrali innati ed acquisiti, atti a garantire la sopravvivenza individuale, ma soprattutto della specie. Questi sono stati messi in atto da sempre per adattarsi e per garantire la sopravvivenza e il successo riproduttivo. Includono dei sistemi peptidergici, con azione metabolico-comportamentale, programmati geneticamente e finalizzati ad ottimizzare l'adattamento, e cambiamenti a vari livelli di funzioni cellulari e regolazioni neuroendocrine ed immunitarie. Questi sono possibili grazie ad un sistema "a rete" di comunicazione a tutti i livelli dell'organismo, e possono essere la migliore guida per capire anche quali possono essere le migliori strategie preventive e terapeutiche da studiare, oltre a quelle sintomatiche e di supporto respiratorio, ma anche per perfezionare quelle antivirali/immunologiche già in atto.

Sulla base di queste premesse è necessaria un'analisi multidisciplinare che, partendo dall'epistemologia e dalla metodologia medica, passi ad esaminare i vari aspetti correlati tra i meccanismi riproduttivi e recettoriali del virus e quelli difensivi naturali.

Argomenti trattati

Epistemologia e metodologa medica.

Sopravvivenza, trasmissione del SARS- CoV-2 e barriere immunitarie.

Immunità innata.

Immunità acquisita, MALT.

Meccanismi riproduttivi del virus SARS-CoV-2.

Sistema renina-angiotensina e ACE2.

Forme funzionali dell'ACE2.

Localizzazione e livelli di ACE2 nelle vie aeree e ARDS.

Decorso clinico e fattori di rischio nel COVID 19- polmonite interstiziale bilaterale, ARDS, shock settico con alterazioni coagulative e MOD (Multiple Organ Dysfunction Syndrome).

Localizzazione degli ACE2 nel tenue, ruolo del triptofano e del microbiota.

Triptofano.

Microbiota.

Microbioma.

Probiotici.

MALT (Mucose Associated Lymphoid Tissue) e IgA.

TRL, riconoscimento dei virus ed endosomi.

Epistemologia e metodologia medica

L'*epistemologia* ha il compito di analizzare le condizioni e i limiti dei procedimenti d'indagine del sapere scientifico e degli strumenti linguistici utilizzabili.

La scienza deve imperniarsi su *principi*, ossia generalizzazioni costituite da relazioni, connessioni o spiegazioni dei fatti, mira ad identificare le *leggi* che governano i fenomeni e dalle leggi elabora sistemi più complessi di idee che costituiscono le *teorie*. Le *leggi scientifiche* sono asserzioni universali che affermano una connessione uniforme tra fenomeni empirici differenti o tra aspetti differenti di un certo fenomeno empirico, possono essere deterministiche o probabilistiche. Una *legge naturale* nella filosofia contemporanea indica in generale una formula per la previsione.

La *scienza sperimentale* è una forma di conoscenza che si caratterizza per l'oggetto di studio e il metodo impiegato e in campo medico dobbiamo distinguere la medicina sperimentale e la medicina clinica.

La medicina sperimentale è una scienza nomotetica, ossia basata su leggi generali, ha come oggetto di studio la malattia, si pone come finalità quella di trovare le leggi che legano il fenomeno alle condizioni sotto cui esso si presenta e utilizza il metodo sperimentale.

Consente di accrescere le conoscenze e di impostare correttamente l'attività di ricerca in modo da rispettare le caratteristiche di oggettività e di sistematizzazione essenziali alla conoscenza scientifica. Tuttavia, in campo biomedico si debbono affrontare anche i problemi relativi alla complessità degli organismi viventi, quella della variabilità biologica individuale e quelli della possibilità di accettare spiegazioni scientifiche anche di tipo funzionale.

I programmi di ricerca tendono a svolgersi nell'ambito di un determinato *paradigma*, tuttavia la crescita esponenziale delle acquisizioni in campo medico sperimentale comporta difficoltà nel procedere in modo unitario, nel giungere ad una sintesi multidisciplinare e nel definire la natura dei processi patologici a livello di organizzazione superiore. Questa situazione fa prevedere la possibilità di utilizzare nuovi paradigmi per inquadrare fenomeni non risolvibili sulla base dell'attuale paradigma molecolare.

La medicina clinica è una scienza storica o idiografica, ossia basata su eventi, ha come oggetto di studio il malato, si pone come finalità quella di riconoscere i quadri

morbosi attraverso l'osservazione e la singola storia di ogni malato, di conoscere ogni malato e di individuare il tipo di terapia più idonea.

Sopravvivenza, trasmissione del virus SARS-CoV-2 e barriere immunitarie

Un primo aspetto da esaminare riguarda la trasmissione del virus SARS-CoV-2 e le prime sedi in cui si localizza e prolifera.

La fonte di infezione principale sono le persone infette, che comprendono anche i portatori asintomatici i quali possono diventare fonte di infezione.

Il virus si trasmette via droplet con le goccioline dell'aria e da contatto.

E' possibile anche la trasmissione via airborne in caso di esposizione prolungata in un ambiente chiuso in presenza di virus nell'aria. Si isola anche nelle feci e nella urine, per cui si deve prestare attenzione alle trasmissioni da contatto o per via airborne ,in caso di aerosolizzazioni, nell'ambiente da esse inquinato.

Vanno osservate le misure note di mantenere la distanza di almeno 1mt, di evitare il contatto fisico, di lavare spesso le mani, di non toccare occhi, bocca e naso e di detergere le superfici soprattutto metalliche e plastiche che possono essere state a contatto con le particelle virali.

Resiste sulle superfici lisce in particolare plastica e metalli che vanno deterse.

Il virus muore in vitro con il calore a 56° per 15 minuti. e la vitalità si perde velocemente a 39° e umidità superiore al 95%.

Il virus, mediante coltura in vitro può essere identificato nelle cellule epiteliali respiratorie dopo circa 96 ore. A partire dalle mucose nasali prolifera e dopo 4-5 giorni provoca i primi sintomi (gola secca, lieve bruciore faringeo, perdita o alterazioni del gusto e dell'odorato, tosse secca).

Il SARS CoV-2 penetra nelle cellule epiteliali ricche del recettore ACE2 (naso, faringe,laringe,trachea, bronchi,ma anche occhi) e si riproduce.

Questa caratteristica porta a focalizzare l'attenzione sulle barriere dell'immunità innata e quella acquisita e in particolare il MALT(Mucose Associated Lymphoid Tissue).

Immunità innata

L'immunità innata è la prima linea di difesa contro il *non-self*, è presente fin dalla nascita, non dà luogo a memoria immunitaria ed ha le seguenti caratteristiche:

- E' rapida, grazie al riconoscimento di pattern molecolari stereotipati (es.LPS).
- I suoi meccanismi di riconoscimento sono completamente determinati a livello genetico (senza bisogno di processi maturativi di tipo epigenetico).
- Coadiuvata la risposta immunitaria specifica coordinata dai *T helper*.
- La componente cellulare è costituita prevalentemente da cellule di derivazione mieloide (sistema fagocitico comprendente neutrofili, macrofagi ed eosinofili), ma anche da alcuni tipi linfoidi (*cellule natural killer o NK*). Queste cellule sono dotate di recettori codificati in linea germinale (come i *Toll-like receptors*) che consentono

di reagire direttamente o indirettamente con gli antigeni o di riconoscere uno stato infiammatorio e di innescare la risposta immune.

- Le componenti solubili sono costituite dalle *proteine del complemento*, dai *reattanti di fase acuta* e dalle *citochine*.

Comprende quattro tipi di barriere difensive: anatomica, fisiologica, endocitica/fagocitica e infiammatoria.

1)Le *barriere anatomiche* sono rappresentate dalla cute e dalle mucose. A questo livello i movimenti dovute alle ciglia o alla peristalsi rimuovono i batteri, mentre il muco secreto dalle cellule caliciformi (*goblet cells*) ingloba i microrganismi e li blocca mediante vari prodotti antibatterici (il *lisozima* che degrada i *peptidoglicani* batterici, un *anticorpo secretorio IgA* che impedisce ai microbi di aderire alle cellule mucose, la *lattoferrina* che lega il ferro e ne impedisce l'utilizzo da parte dei microbi e la *lattoperossidasi* che genera il *radicale superossido* che uccide i batteri).

2)Le *barriere fisiologiche* comprendono: la temperatura (febbre), il pH acido (del sudore e delle secrezioni gastriche che previene la crescita batterica) e dei mediatori chimici (come il *lisozima* che è presente nelle secrezioni mucose e nelle lacrime e scinde la parete batterica; le *defensine* che sono presenti nel polmone e nel tratto gastrointestinale e hanno attività antimicrobica; l'*interferon* che induce uno stato antivirale nelle cellule non infettate; il *complemento* che lisa i microrganismi o facilita la fagocitosi). Il virus sopprime la produzione di interferon, proteine dotate di attività antivirale e immunomodulatrici.

3)Le *barriere fagocitica/endocitica* consentono la difesa mediante l'ingestione di particelle extracellulari. L'endocitosi viene effettuata da vari tipi di cellule; la fagocitosi da cellule specializzate (monociti, neutrofili, macrofagi) che uccidono e digeriscono microrganismi interi.

4)Le *barriere infiammatorie* vengono attivate in caso di danno tessutale o infezione. La risposta infiammatoria comprende vasodilatazione, aumento della temperatura, aumento della permeabilità capillare con edema, afflusso di fagociti e fagocitosi di batteri con liberazione di enzimi litici. La risposta infiammatoria coinvolge numerosi mediatori chimici e tra questi sono comprese le *proteine di fase acuta*, come la proteina C (vedi aggiornamento 1 pag.5 risposta di fase acuta).

Le *citochine* sono proteine secrete da vari tipi di cellule immunitarie (linfociti, macrofagi, mastcellule) e da diversi tipi cellulari.

Sono sintetizzate solo quando le cellule vengono stimolate da agenti che ne provocano l'attivazione specifica (antigeni) o aspecifica (mitogeni).

Comprendono: *interleuchine (IL)*, *interferoni (INFalfa, beta e gamma)*, *i fattori di crescita*, *i fattori di necrosi tumorale (TNFalfa e TNFbeta)*, *i fattori di crescita trasformante*.

I maggiori produttori di citochine sono i linfociti T e in particolare i T helper (CD4).

I macrofagi producono in larga parte IL1, IL6 e TNFalfa (vedi aggiornamento 1 a pag.26-29 "*citochine e sickness behavior*").

Gli *interferoni* sono proteine dotate di attività antivirale e di proprietà immunomodulatrici e antitumorali. L'INFgamma è prodotto principalmente dalle

cellule NK (*natural killer*), ma anche dai linfociti CD4 e CD8. Sostiene la risposta Th1 orientata in senso citotossico nei confronti di virus e tumori.

Le informazioni sul ruolo dell'immunità innata nel controllo del SARS-CoV-2 sono scarse. Dopo l'infezione il numero dei linfociti diminuisce e aumenta quello dei neutrofili, aumentano le citochine che promuovono l'infiammazione (IL1,IL6, TNF alfa) e chemochine. Il virus sembra non infettare i macrofagi e i linfociti (come fa il virus della SARS e della MERS), ma sopprime la produzione di interferon.

Nel COVID-19 si ha una risposta innata disfunzionale da attribuire all'iperattivazione di macrofagi e monociti con conseguente severa infiammazione fino alla "tempesta di citochine", quadro di shock settico, alterazioni coagulative e sindrome da disfunzione multiorgano.

La disfunzione della componente innata è dovuta all'assenza di una potente risposta antivirale da parte delle cellule T.

Immunità acquisita o adattiva

L'*immunità acquisita* consente di riconoscere ed eliminare selettivamente specifici microrganismi mediante una reazione contro uno specifico antigene.

Comprende: risposte *umorali e cellulo-mediate*.

La risposta umorale è innescata all'interazione di linfociti B con l'antigene e dalla conseguente proliferazione e differenziazione in plasmacellule secernenti anticorpi. L'anticorpo può legarsi a più antigeni formando aggregati ingeriti dai fagociti, può legarsi all'antigene di un microrganismo e attivare il sistema del complemento provocandone la lisi, può neutralizzare particelle virali rivestendole e bloccando il loro legame alle cellule dell'organismo.

Quando il linfociti B incontra la prima volta l'antigene, per cui è specifico il proprio anticorpo di membrana, si innesca la proliferazione delle cellule da cui derivano linfociti *B memoria* (a vita più lunga) e *plasmacellule* (a vita più breve) che producono anticorpi in una forma che può essere secreta.

La risposta cellulo-mediata dipende dai linfociti T che ne sono gli effettori.

I linfociti T, mediante il recettore TCR (recettore espresso sui linfociti T), riconoscono l'antigene solo se questo è legato a molecole di membrana, dette molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (*major histocompatibility complex*). Le *cellule dendritiche* esprimono alti livelli di MHC e sono cellule presentanti l'antigene (APC) molto più potenti dei macrofagi e dei linfociti B. Le cellule dendritiche, dopo aver fagocitato l'antigene nei tessuti, migrano nel sangue e nella linfa raggiungendo i vari organi linfatici dove presentano l'antigene ai linfociti T. Esistono due tipi principali di molecole MHC:

MHC di classe I che sono espresse da quasi tutte le molecole nucleate;

MHC di classe II che sono espresse solo dalle cellule presentanti l'antigene.

Quando un linfocita T vergine incontra l'antigene, associato ad una molecola MHC su una cellula, il linfocita T prolifera e si differenzia in linfocita T memoria e in vari tipi di linfociti effettori, i T helper (CD4) e i T citotossici (CD8).

I linfociti Th rispondono all'antigene producendo citochine che possono attivare vari fagociti. Il cambiamento del profilo di citochine, prodotto dai linfociti Th può cambiare il tipo di risposta che sviluppano gli altri leucociti.

La risposta Th1 è orientata in senso citotossico nei confronti di virus e batteri. E' sostenuta dall'INFgamma e dall'IL12 (che stimola le cellule NK a produrre INFgamma).

Le cellule NK hanno azione citotossica, non presentano recettori per l'antigene e sono in grado di attaccare qualsiasi cellula estranea.

Nelle infezioni polmonari, dopo l'infezione iniziale, le cellule dendritiche respiratorie residenti nel polmone acquisiscono l'agente patogeno o gli antigeni invasori dalle cellule epiteliali infette, si attivano, processano l'antigene e migrano verso i linfonodi. Nei linfonodi le cellule dendritiche presentano l'antigene ai linfociti T, mediante il riconoscimento da parte del TCR. Il TCR, anche mediante la presenza di recettori costimolatori, attiva il linfocita che migra sul sito d'infezione. Qui le cellule T effettrici specifiche contro il virus producono:

citochine antivirali (che inibiscono direttamente la replicazione virale e migliorano la presentazione dell'antigene);

chemochine prodotte dalle cellule T attivate, reclutano cellule più innate e adattive per controllare il carico patogeno;

molecole citotossiche che uccidono direttamente le cellule epiteliali infette e aiutano ad eliminare il patogeno.

Dopo questa fase effettrice le cellule T specifiche per quell'antigene muoiono (circa 90-95%) andando incontro ad apoptosi. Questa fase è seguita da una fase di memoria in cui viene mantenuto un pool stabile di cellule T memoria per un periodo piuttosto lungo. Queste sono programmate per contrastare la successiva infezione con lo stesso patogeno o correlato e, nelle infezioni dell'apparato respiratorio, risiedono sia nelle vie respiratorie polmonari, sia nel tessuto interstiziale del polmone.

I coronavirus, oltre a sopprimere la produzione di interferon bloccano la presentazione degli antigeni da parte delle glicoproteine del complesso maggiore di istocompatibilità (HLA) di classe I e di classe II ostacolando la differenziazione in linfociti memoria , helper e citotossici. Le cellule NK non presentando recettori per l'antigene possono agire e attaccare virus e cellule estranee.

Nel COVID-19 si è registrata una ridotta risposta da parte delle cellule B della memoria "coronavirus specifica"(IgM e IgG), con limitata produzione e limitata persistenza delle IgG nel tempo, e una grave riduzione di linfociti T nel sangue.

In base ai dati attualmente disponibili Ralph Baric ha affermato che sia la risposta immunitaria che la resistenza all'infezione dovrebbero durare almeno 6-12 mesi.

Sono in corso di studio trials clinici che prevedono l'uso di plasma iperimmune in pazienti in situazioni critiche con COVID-19.

Una strategia per contrastare l'infezione dovrebbe incrementare o possibilmente non bloccare la risposta Th1 e incrementare l'attività citotossica delle NK(vedi aggiornamento 1 a pag.11-12).

Una strategia per ottenere un'immunità duratura richiederebbe di poter contare su un'aumentata risposta delle cellule della memoria locale e sistemica.

Il MALT rappresenta la prima barriera della risposta immunitaria acquisita, è costituito dal tessuto linfoide associate alle mucose, E' diffuso a livello delle mucose del tratto orofaringeo, respiratorio, gastrointestinale, uro-genitale, occhi, ma anche tiroide e cute. Ha il compito di assicurare una risposta immunitaria completa sia umorale, mediante linfociti B e anticorpi, sia cellulare, mediante linfociti T in seguito a stimoli antigenici locali.

L'attività protettiva del MALT nelle mucose delle prime vie aeree, sedi di entrata del virus, evidenziano la sua importanza nell'ostacolare la diffusione del virus ed evitare quindi l'interessamento polmonare e l'aggravamento della malattia. Una breve descrizione viene rimandata alle pagine successive per rendere più lineare e fluida la trattazione.

Meccanismi riproduttivi del virus SARS-CoV-2

Ricercatori cinesi mediante la microscopia elettronica criogena hanno scoperto come il coronavirus SARS-CoV-2 penetra nelle cellule umane.

La mappa del virus ha riprodotto in dettaglio la struttura del virus e in particolare di una delle proteine sulla superficie del virus, chiamate "*spike*" (punta o spina) che funzionano come minuscoli "grimaldelli" che permettono al virus di aprire le porte d'ingresso delle cellule dell'apparato respiratorio umano per penetrare al loro interno e moltiplicarsi.

Un virus per sopravvivere e moltiplicarsi ha bisogno di altre cellule e, una volta entrato per via aerea, ricerca le cellule bersaglio (quelle polmonari nel caso dello SARS-CoV-19) per poi cercare di penetrarvi mediante un meccanismo detto "*adsorbimento*".

Una volta penetrato mette a nudo il suo codice genetico che, utilizzando un'altra parte del DNA cellulare, serve per la sua replicazione e quindi per la sintesi delle componenti virali.

Si ha quindi l'*assemblaggio* di queste componenti, che vanno a creare un nuovo virus, e l'uscita dalla cellula per escitosi, propagando l'infezione in quelle circostanti.

Le modalità di adsorbimento avvengono mediante gli "*spike*" denominati antirecettori virali o Vap (*Viral Attachment Protein*) che si legano a dei recettori cellulari posti sulla membrana citoplasmatica delle cellule.

I recettori cellulari sono molecole normalmente presenti sulla superficie delle cellule e parte dell'antirecettore virale assomiglia alla forma chimica del ligando cellulare, in modo da "ingannarlo" e aprire le porte del citoplasma.

Le caratteristiche del recettore determinano lo spettro d'ospite, quali cellule possono essere infettate e la caratteristica della malattia.

Successivamente, e quasi istantaneamente, avviene la penetrazione che si verifica a 37°.

L'adsorbimento avviene anche su cellule morte o porzioni isolate di membrana. Il virus penetra con modalità diverse, che dipendono dalla sua morfologia che può essere a capside (la parte che contiene le informazioni genetiche) nudo o con involuppo.

I ricercatori cinesi hanno scoperto che gli antirecettori del virus, detti glicoproteine S, si legano ai recettori cellulari detti Angiotensin Converting Enzyme 2(ACE2), presenti negli epitelii delle vie aeree e nel parenchima polmonare.

Il virus SARS-CoV-2 si lega ai recettori ACE 2 tramite la proteina S sulla sua superficie. Durante l'assorbimento la proteina S si divide in due subunità, chiamate S1 ed S2.

S1 contiene i recettori Rbd (Receptor Binding Domain) che permettono al virus di legarsi direttamente al Pd (Peptidase Domain) del recettore ACE2.

S2 interviene solo successivamente durante la fusione delle membrane.

Questo meccanismo sembrerebbe importante per produrre degli antivirali che possano fermare l'infezione del coronavirus andando a bloccare i recettori cellulari ACE2. Se i recettori sono bloccati, il virus non può entrare e diffondersi per cui, come premessa, si esaminano alcuni importanti aspetti dell' ACE 2.

Sistema renina –angiotensina e ACE 2

L'angiotensina deriva da un precursore, l'angiotensinogeno, gioca un importante ruolo nel sistema renina-angiotensina (SRA) e provoca vasocostrizione, aumento della pressione arteriosa e rilascio di aldosterone da parte della corticale del surrene.

L'angiotensinogeno è una glicoproteina rilasciata dal fegato e convertita dalla renina in angiotensina 1 (ANG 1).

La renina è un enzima proteolitico prodotto dal rene ed è rilasciato in circolo in seguito ad attivazione del simpatico (tramite i recettori β_1), ipotensione nell'arteria renale (causata da ipotensione sistemica o stenosi dell'arteria renale) e diminuito rilascio di Na^+ a livello dei tubuli distali del rene.

Le cellule iuxtaglomerulari, associate all'arteriola afferente dei glomeruli renali, sono il sito primario di accumulo e rilascio di renina. Una diminuzione della pressione nell'arteriola afferente provoca il rilascio di renina, mentre un incremento della pressione ne inibisce il rilascio. I recettori β_1 -adrenergici, localizzati nelle cellule iuxtaglomerulari, rispondono alla stimolazione simpatica rilasciando renina. Le cellule specializzate della macula densa, localizzate a livello dei tubuli distali, sono adiacenti alle cellule iuxtaglomerulari dell'arteriola afferente. Queste cellule registrano il livello di ioni Na^+ e Cl^- nel fluido tubulare. Quando nel fluido tubulare l' $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ è elevato è inibito il rilascio di renina e, viceversa, bassi livelli dell' $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ ne stimolano il rilascio. Si è visto che le prostaglandine (PGF_2 e PGI_2) stimolano il rilascio di renina in risposta ad un ridotto trasporto di $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ attraverso la macula densa. Quando la pressione è ridotta nell'arteriola afferente il filtrato glomerulare diminuisce e ciò riduce l' $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ nel tubulo distale. Questo agisce come un importante meccanismo che contribuisce al rilascio di renina quando vi è ipotensione nell'arteriola afferente.

L'ANG 1 è attivato in angiotensina 2(ANG 2) dall'angiotensin converting enzyme (ACE) che è espresso in modo predominante sulla superficie delle cellule endoteliali della circolazione polmonare.

L'ANG 2 agisce come un ormone endocrino, autocrino/paracrino e intracrino. L'ACE è il target per l'inattivazione da parte degli ACE inibitori che diminuiscono il livello di

ANG II. Questa è normalmente inattivata in ANG 3 dalle angiotensinasi, localizzate nei globuli rossi e nei letti vascolari di molti tessuti. La sua emivita è di circa 30 secondi, mentre nei tessuti può essere di 15-30 minuti.

Il sistema renina-angiotensina-aldosterone è regolato non solo dai meccanismi che stimolano il rilascio di renina, ma anche dai peptidi natriuretici rilasciati dal cuore (ANP rilasciato dallo stiramento degli atri e BNP rilasciato dai ventricoli). Questi agiscono come un importante sistema controregolatorio in quanto riducono la pressione arteriosa rilasciando le arteriole e inibendo sia la secrezione di renina e aldosterone, sia il riassorbimento di Na^+ da parte del rene. Questi ultimi due effetti riducono il riassorbimento di acqua da parte del rene e ciò comporta un aumento del volume urinario e di Na^+ escreto. L'effetto complessivo è quello di ridurre la pressione arteriosa riducendo il volume di sangue nel circolo sistemico.

Il recettore dell'ANG 2 AT_1 è stato trovato in molti organi, compreso il cervello. In particolare è stato trovato altamente espresso in molti tessuti e aree cerebrali coinvolti nella risposta dell'asse HPA allo stress e nel sistema simpatico. Infatti, la produzione di ANG 2 circolante e locale e l'espressione dei recettori AT_1 aumentano in caso di stress.

L'ANG 2 è in grado di produrre una risposta infiammatoria attraverso segnali mediati dal recettore AT_1 . Questa azione comporta la produzione di specie reattive dell'ossigeno, di molecole di adesione, di citochine infiammatorie e altri mediatori.

A livello periferico l'ANG 2 ha le seguenti funzioni:

- 1)Provoca vasocostrizione (tramite i recettori AT_1) e quindi incrementa la resistenza vascolare sistemica e la pressione arteriosa(i farmaci antipertensivi chiamati sartanici sono AT_1 antagonisti, ossia bloccano il recettore AT_1).
- 2)Agisce sulla corticale del surrene stimolando il rilascio di aldosterone che, a sua volta, agisce sul rene incrementando l' Na^+ e la ritenzione di liquidi.
- 3)Incrementa la funzione simpatica adrenergica facilitando il rilascio di NA dai nervi simpatici terminali e inibendone il riassorbimento.
- 4)Stimola l'ipertrofia cardiaca e vascolare.

A livello centrale l'ANG 2 ha le seguenti funzioni:

- 1)Stimola il rilascio di vasopressina (ADH) dall'ipofisi posteriore, stimola la sete e attiva comportamenti finalizzati all'assunzione di liquidi.
- 2)Nel ratto facilita l'apprendimento e la memoria.

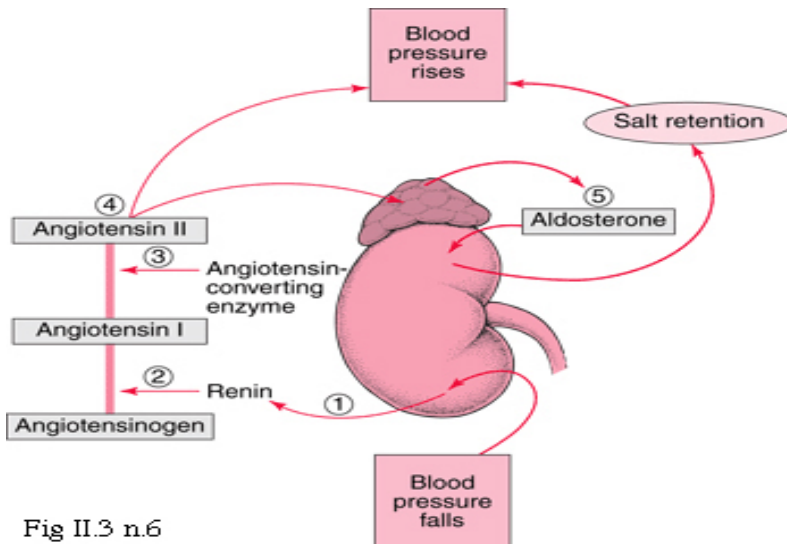


Fig II.3 n.6

Il sistema renina-angiotensina

- 1) Una diminuzione della pressione nell'arteriola afferente provoca il rilascio di renina.
- 2) La renina converte l'angiotensinogeno in angiotensina I.
- 3) L'angiotensin converting enzyme (ACE) attiva l'angiotensina I in angiotensina II.
- 4) L'angiotensina II provoca aumento della pressione, stimola la secrezione di aldosterone, determina ipertrofia cardiaca e vascolare e stimola il rilascio di ADH a livello centrale.

Forme funzionali dell'ACE 2

L'ACE2 è un enzima che fa parte del sistema regolatore della pressione renina-angiotensina-aldosterone ed ha azione vasodilatatrice ed antipertensiva. L'ACE ha invece azioni opposte in quanto induce vasocostrizione operando sul recettore AT1
L'ACE2 è un enzima espresso in molti organi, come rene, tratto gastrointestinale e respiratorio. A livello respiratorio è localizzato nelle mucose nasale e orali. L'espressione maggiore dell'ACE2 è stata trovata nelle cellule alveolari polmonari nel tipo 2 degli pneumociti, ma (come in altri organi) è presente anche nelle cellule endoteliali arteriose e venose.

Dal punto di vista funzionale, esistono due forme di ACE2: a lunghezza intera e solubile:

- 1) *L'ACE2 a lunghezza intera* contiene un dominio strutturale transmembrana che ancora il suo dominio extracellulare alla membrana plasmatica (per cui alle cellule). Si è dimostrato che questo dominio extracellulare si comporta come un recettore per le proteine spike dei SARS-CoV-1 e recentemente anche per il SARS-CoV-2.
Il SARS-CoV-2 utilizza l'ACE2 legato alla membrana come recettore.
- 2) *L'ACE2 in forma solubile* manca dell'ancoraggio della membrana e circola in piccole quantità nel sangue. Studi in vitro hanno dimostrato che la replicazione del SARS-CoV era bloccata da una forma solubile di ACE2 nella linea cellulare del rene di scimmia.

Sulla base di tutti questi presupposti è stata ipotizzata la possibilità di utilizzare la proteina ACE ricombinante solubile per combattere o limitare la progressione del virus.

Localizzazione e livelli di ACE2 nelle vie aeree e ARDS

Il SARS-CoV-2 riconosce gli ACE2 umani più efficientemente rispetto al SARS-CoV e ciò comporta una maggiore trasmissione da persona a persona.

Gli ACE2 sono fondamentali sia per la penetrazione del virus (le sue proteine spike hanno una forte affinità nei confronti degli ACE2 umani), sia per la sua replicazione.

Zhang et al. hanno dimostrato che l'80% dell'espressione del virus è nelle cellule epiteliali polmonari di tipo 2 e queste possono servire come una riserva per l'invasione virale. Inoltre a livello genetico gli pneumociti hanno un alto numero di geni correlati ai vari processi virali, compresi i geni regolatori del ciclo vitale del virus, dell'assemblaggio e della replicazione.

Studi di immunofluorescenza hanno evidenziato che la proteina ACE2 era espressa in maggior misura sulla parte apicale piuttosto di quella basolaterale delle cellule epiteliali e l'espressione dell'ACE2 era correlata positivamente con lo stato di differenziazione dell'epitelio. Cellule indifferenziate, esprimenti minimamente l'ACE2 erano infettate poco, mentre quelle ben differenziate ed esprimenti maggiormente l'ACE2 erano prontamente infettate.

L'importanza dell'ACE 2 è stata evidenziata su modelli murini, con confronto tra topi knock-out (privati del gene per l'ACE2) e topi normali. A parità di stimolo lesivo alveolare, i topi privi del gene ACE2 sviluppano un danno polmonare molto più esteso, rapido e grave. La perdita dell'ACE2, indotta dall'infezione può portare alle stesse conseguenze.

L' infezione da SARS-CoV2 causa una riduzione dei livelli di ACE2, il sistema viene sbilanciato, si perde l'azione protettiva dell'ACE 2 e l'eccesso di angiotensina 2 accelera il danno alveolare portando all'ARDS (sindrome acuta da distress respiratorio) e poi alla fibrosi polmonare.

Molti autori hanno sottolineato il ruolo dell'angiotensina 2 sui recettori AT1 nell'indurre ARDS in quanto, in presenza di uno stimolo lesivo con ipossia, l'ANG2 comporta:

- 1) *induzione di vasocostrizione polmonare (finalizzato a ridurre il flusso in aree ipossiche, ma essendo il danno diffuso comporta ipoperfusione polmonare).*
- 2) *aumento della permeabilità alveolare (con conseguente edema alveolare, tipico dell'ARDS).*
- 3) *alveolite (per azione pro- infiammatoria).*
- 4) *apoptosi delle cellule alveolari (con estensione del danno).*
- 5) *fibrosi della matrice connettivale (con conseguente fibrosi polmonare).*

Topi normotesi trattati con ACE inibitori hanno mostrato di sviluppare una maggiore espressione cardiaca dell'ACE2, mentre i pazienti ipertesi, trattati con ACE inibitori

presentavano una downregulation dell'ACE2 a livello renale e cardiaco. Questi dati, associati al fatto che la maggior parte dei pazienti deceduti per SARS-CoV-2 erano affetti da ipertensione, cardiopatie e diabete e molti erano trattati con ACE inibitori, hanno dato il via a degli studi atti verificare se i trattamenti con anti-ACE possano interferire o facilitare l'adsorbimento del virus e la sua replicazione.

ACE inibitori e sartanici

Gli ACE inibitori sono un'importante categoria di farmaci antipertensivi che bloccano l'azione dell'ACE con riduzione dell'angiotensina 2.

Un'aumentata espressione di ACE 2, ossia del recettore del SARS-Cov-2, potrebbe in linea teorica, far prevedere un maggiore potere infettante ed una accelerata diffusione del virus nell'apparato respiratorio in pazienti che assumono abitualmente ACE inibitori. Tuttavia va considerata in questi pazienti la downregulation dell'ACE2 a livello renale e cardiaco.

I sartanici sono antipertensivi antagonisti competitivi del recettore AT1 dell'angiotensina II, pertanto inibiscono il sistema renina-angiotensina direttamente a livello recettoriale producendo un'inibizione dell'attività dell'angiotensina II più selettiva rispetto agli ACE- inibitori.

Decorso clinico e fattori di rischi nel COVID 19-polmonite interstiziale bilaterale,ARDS, shock settico con alterazioni coagulative e MODS (*Multiple Organ Dysfunction Syndrome*)

I dati statistici indicano una frequenza maggiore di COVID-19 e un andamento prognostico peggiore in pazienti con comorbilità associate e più precisamente: ipertensione, diabete, coronaropatie e cardiopatie, in particolare se non ben compensati.

I pazienti più a rischio sono per lo più anziani (in età avanzata si ha una frequente diminuzione dei linfociti B e T con deficit nel controllo della replicazione virale e aumento delle citochine infiammatorie con prolungata risposta infiammatoria).

In pregressi studi, mediante inoculazione con il virus SARS-CoV in macachi vecchi, si è visto che questi presentano una risposta innata contro il virus maggiore rispetto a quelli giovani, con un aumento dell'espressione dei geni associati all'infiammazione, mentre l'espressione dell'INF beta era ridotta(questo ha il compito di difendere dai virus le cellule non infettate). La reazione difettiva delle funzioni dei linfociti B e T e l'eccessiva produzione della risposta immunitaria Th2 può portare ad un controllo deficitario della replicazione virale e ad un prolungamento delle risposte infiammatorie.

Nei pazienti a rischio al quadro clinico iniziale e controllabile, caratterizzato da febbre e tosse, mialgie, astenia, si aggiungono dispnea, espettorato, segni clinici di polmonite, riduzione della saturazione d'ossigeno con necessità di ventilazione assistita ed insorgenza di ARDS (*Acute Respiratory Distress Syndrome*),ossia sindrome da distress respiratorio acuto.

A Wuhan è stato studiato e pubblicato uno studio retrospettivo sul decorso clinico e i fattori di rischio dei casi con exitus finale in soggetti adulti affetti da COVID-19.

In un'alta percentuale dei casi il quadro si complica e si configura una sindrome da disfunzione multi-organo valutata mediante SOFA score (*Sequential Organ Failure assessment*). Questa è una sindrome sistemica, che generalmente si associa a shock, a sepsi, a sindrome da risposta infiammatoria sistemica ed è caratterizzata dall'insorgenza acuta dell'alterazione delle funzioni di vari organi.

La progressiva disfunzione multi-organo comporta, oltre all'insufficienza respiratoria, anche insufficienza renale acuta, danno cardiaco acuto con coronaropatia e insorgenza di coagulopatia. Questa viene definita da un aumento di 3 secondi del tempo di protrombina e aumento di 5 del tempo di tromboplastina parziale attivata.

Si rileva linfocitopenia, aumento del D-dimero > di 1000ng/ml, diminuzione dell'albumina a meno di 25 g/L, notevole aumento della ferritina e procalcitonina. Si ha anche aumento delle transaminasi, dell' LDH, delle CPK ,della creatinina, della treponina I ad alta sensibilità e dei livelli di IL6 (*vedi aggiornamento 1 pag.5 risposta sistemica di fase acuta*).

I dati preminenti di broncopolmonite interstiziale bilaterale, IL6 >40 pg/ml e, se non disponibile, di D-dimero >1000, ferritina > 300 fanno presagire un'evoluzione, prognosticamente sfavorevole. In più della metà dei pazienti si va a configurare un quadro di sepsi caratterizzato da : insufficienza respiratoria, ARDS, shock settico, coagulopatia, insufficienza cardiaca acuta, insufficienza renale acuta, infezioni secondarie, ipoproteinemia, acidosi. Si può infatti avere un quadro di sepsi anche con le infezioni virali e in assenza di patogeni batterici.

Il 90% dei pazienti con polmonite presenta aumento della coagulazione con notevole aumento del D-dimero e in alcuni casi insorgenza di CID (coagulazione intravasale disseminata) con iperfibrinolisi secondaria spesso associata a prognosi infausta.

Il danno endoteliale, con conseguenti alterazioni delle funzioni endoteliali, è dovuto in parte alle citochine infiammatorie, ma va ricordato anche il ruolo del virus sugli ACE 2 espresso sulle cellule endoteliali dei vasi arteriosi e venosi e sui miociti di tutto il corpo.

L'evoluzione del quadro rivela mediamente insorgenza di dispnea verso la settima giornata, ARDS verso la nona e necessità di ricovero in Unità di Cure Intensive ICU (*intensive care unit*) verso la dodicesima.

Localizzazione degli ACE2 nel tenue, ruolo del triptofano e del microbiota

Gli ACE2, identificati come recettori dei SARS-CoV e anche del SARS-CoV19, sono presenti in vari organi umani (mucose orali e nasali, nasofaringee, orofaringee, vie respiratorie, polmone, stomaco, tenue, colon,cute, linfonodi, timo, midollo osseo, milza, fegato, rene e cervello), ma la localizzazione maggiore dell'espressione della proteina ACE2 è a livello delle cellule alveolari di tipo 2 dell'epitelio polmonare e degli enterociti dell'intestino tenue. Inoltre sono presenti nelle cellule endoteliali arteriose e venose e nelle cellule muscolari in tutti gli organi studiati.

L'espressione degli ACE2 negli epitelii e nell'endotelio vascolare può fornire un importante elemento per capire la patogenesi delle principali manifestazioni della malattia, in quanto l'ACE2 ha un'azione protettiva sulla progressione delle malattie cardiopolmonari.

E' stato dimostrato un ruolo non catalitico dell' ACE 2 nel trasporto degli amminoacidi (AA) nell'intestino e questo ha fatto ipotizzare che gli effetti terapeutici del ACE2 possano essere mediati, almeno in parte, dalle sue azioni sul tratto gastrointestinale e/o sul microbiota intestinale. Ciò è coerente con i dati emergenti che suggeriscono che la disbiosi dell'intestino e del microbiota polmonare siano associate alla malattia cardiopolmonare.

Nuove ricerche in tal senso, hanno evidenziato un ruolo dell'ACE 2 indipendente dal sistema renina-angiotensina nel trasporto degli AA e nella composizione del microbiota intestinale. La scoperta della *collectrina*, un regolatore del trasporto degli AA nel rene, fornisce una prima evidenza di un ruolo non catalitico dell'ACE2. Similmente all'ACE2, la collectrina è una proteina transmembrana di tipo2 che divide il 47,8% dell'identità del dominio extracellulare, transmembrana e citosolico dell'ACE2. Il ruolo fisiologico della collectrina nel riassorbimento degli AA nel rene solleva la domanda se l'ACE 2 possa avere un'analogia funzione a livello intestinale dove la collectrina è assente. **In effetti Hashimoto et al hanno trovato che l'ACE2 regola l'omeostasi intestinale degli aminoacidi, l'espressione dei peptidi antimicrobici e l'ecologia del microbioma intestinale.**

Cambiamenti ACE2 dipendenti nell'immunità e del microbiota intestinale si ritiene possono essere regolati dall'aminoacido triptofano.

In base a questi dati Qin Yan Gao ,della Shanghai Jian Tong University hanno ipotizzato che l'infezione da COVID-19 possa essere correlato al microbiota intestinale e che i probiotici possano modulare il microbiota intestinale per cambiare favorevolmente i sintomi gastrointestinali e proteggere anche l'apparato respiratorio. I pazienti con infezioni respiratorie soffrono generalmente di disturbi gastrointestinali o complicanze secondarie di queste, correlate ad un decorso clinico più grave della malattia.

La modulazione del microbiota intestinale può ridurre l'enterite e la polmonite associata a ventilazione e invertire gli effetti collaterali degli antibiotici in modo da evitare la replicazione del virus nell'epitelio polmonare.

Una linea guida cinese raccomanda l'uso di probiotici per mantenere l'equilibrio nei pazienti con COVID- 19

Triptofano

Per comprendere meglio quanto esposto è necessario sottolineare i seguenti dati. **Il triptofano è un aminoacido essenziale ed è necessario per la sintesi della serotonina, della melatonina e dell'acido nicotinico (vitamina B3 o niacina).**

Non può essere sintetizzato dall'organismo, per cui deve essere assunto con la dieta alimentare ed è presente nei cereali e derivati, legumi secchi, frutta secca, verdure come asparagi, bietta, carciofi, cavolo, spinaci, zucchine e in particolare alga spirulina,

merluzzo atlantico, semi di soia, semi di sesamo, di girasole. uova, parmigiano, carni di pollo, tacchino, manzo e agnello, cereali, cioccolato fondente, salmone ecc.

Alcuni studi hanno già evidenziato che è possibile modulare l'infiammazione nel sistema nervoso attraverso la dieta e l'azione dei batteri intestinali. Si è visto infatti che i prodotti del triptofano modulano l'infiammazione a livello del sistema nervoso centrale attraverso una proteina AHR (*aryl hydrocarbon receptor*) e ciò avviene per azione diretta sulla microglia e gli astrociti.

Recenti lavori hanno rilevato l'influenza che il triptofano e il suo metabolita nicotinammide esercitano sul microbiota e li indicano come fattori chiave per controllare l'infiammazione.

I dati raggiunti indicano l'ACE2 come il link che collega il metabolismo dietetico degli aminoacidi, l'immunità innata, la composizione del microbiota intestinale e la suscettibilità alle infezioni intestinali. In particolare la malnutrizione di aminoacidi può provocare infiammazione intestinale e diarrea.

Microbiota

Il termine microbiota si riferisce ad una popolazione di microorganismi che colonizza un determinato distretto ed è composto da batteri, funghi, protozoi e virus.

Il microbiota umano è definito come l'insieme dei microrganismi che, in maniera fisiologica o talvolta patologica, vivono in simbiosi con il corpo umano ed è concentrato prevalentemente, ma non unicamente nel tratto intestinale.

Attualmente è riconosciuta l'influenza del microbiota nella regolazione dell'attività metabolica, ma anche sulla sfera psichica per l'influenza sull'asse HPA e sul sistema serotoninergico.

Altra caratteristica del microbioma umano è il ruolo nello sviluppo del sistema immunitario durante la prima infanzia e di conseguenza sullo stato di infiammazione dell'organismo.

Il microbiota viene significativamente e rapidamente alterato soprattutto dalla dieta, dai microrganismi ambientali e dagli antibiotici.

Il termine di *eubiosi* indica uno stato di equilibrio. Il termine *disbiosi* quello di squilibrio.

La disbiosi ha un ruolo rilevante nell'incidenza di malattie metaboliche, cardiovascolari, infiammatorie, neurologiche, psichiche e oncologiche,

Microbioma

Il termine microbioma indica la totalità del patrimonio genetico posseduto dal microbiota, ossia i geni che quest'ultimo è in grado di esprimere.

Il 99% della nostra componente genetica deriva dai batteri e i geni del microbiota codificano anche molecole che l'organismo non riesce a produrre.

I geni del microbiota sono complementari ai geni umani e contribuiscono a mantenere lo stato di salute avendo un'azione preventiva e terapeutica per molte patologie

supportando la digestione, lo sviluppo del sistema immunitario e la sintesi di composti fondamentali.

Nella disbiosi viene a mancare la codificazione di molte molecole, ma vengono metabolizzati anche composti dannosi.

Probiotici

I probiotici sono microorganismi viventi che, aderendo all'intestino, conferiscono notevoli benefici all'organismo ricevente in quanto stimolano, regolano e modulano diverse funzioni, inclusa la digestione, il metabolismo e l'immunità. Essi agiscono simbioticamente fermentando i cibi non digeribili, detti prebiotici, ed esercitano funzioni metaboliche, protettive e trofiche.

I probiotici producono diverse sostanze, non tossiche, non patogene e resistenti ai sistemi enzimatici dei mammiferi, ma con attività biologica e proprietà inibitorie nei confronti di patogeni, comportandosi come agenti alternativi agli antibiotici.

Nell'intestino i microorganismi probiotici producono antiossidanti (come il glutathione), riducendo lo stress ossidativo ed hanno un'importante azione immunomodulante a livello del MALT..

MALT (*Mucose Associated Lymphoid Tissue*) e IgA

Il MALT è il tessuto linfoide associato alle mucose ed è diffuso a livello delle mucose del tratto orofaringeo, respiratorio, gastrointestinale, uro-genitale, tiroide e cute.

Ha il compito di assicurare una risposta immunitaria completa sia umorale, mediante linfociti B e anticorpi, sia cellulare, mediante linfociti T in seguito a stimoli antigenici locali.

I componenti sono:

GALT (*Gut Associated Lymphoid Tissue*) tessuto linfoide associato all'intestino.

BALT (*Bronchial associated Lymphoid tissue*) tessuto linfoide associate alle vie aeree (trachea e bronchi).

NALT, LALT, EALT, VALT, SALT tessuti linfoidi associati rispettivamente a vie nasali, vie laringee, occhi, vasi e cute.

Il MALT è molto specifico e protegge l'intera superficie interna del corpo umano.

Il GALT o GI (*gastrointestinal tract*) è localizzato nelle pacche di Peyer, costituite da aggregati cellulari (linfociti B e T, macrofagi e cellule APC presentanti l'antigene) e distribuite nell'epitelio intestinale e in siti secretori entro la mucosa.

Nel lume intestinale lo strato epiteliale e la lamina propria sono i primi ad incontrare i virus e i vari patogeni mentre il MALT inizia la risposta immunitaria adattiva.

Le cellule APC (presentanti l'antigene) nelle placche di Peyer catturano le IgA e attivano i linfociti T.

Le IgA sono anticorpi sintetizzati dai linfociti B della lamina propria e svolgono due importanti funzioni: l'immunità a livello delle mucose e l'immunità neonatale. Sono prodotte soprattutto a livello del MALT del tratto digerente e respiratorio e, in misura minore anche nella bile, nella saliva e nel latte materno. Il loro ruolo è

importantissimo in quanto la maggior parte dei microbi penetra nell'organismo attraverso gli unici apparati che mettono in comunicazione l'interno con l'esterno, ossia il digerente ed il respiratorio. Le cellule che le producono sono localizzate nella lamina propria, sotto l'epitelio, e le IgA, una volta secrete, si legano ad un recettore. Questo complesso viene internalizzato per endocitosi, arriva al versante luminare della cellula in una vescicola che si fonde con la membrana plasmatica e viene secreta nel lume. Qui si mescola al muco prodotto dalle cellule epiteliali e costituisce una prima barriera difensiva contro i microbi ai quali si legano.

Le IgA sono presenti anche nel latte materno e sterilizzano l'apparato digerente del lattante proteggendolo da vari microbi.

TRL, riconoscimento dei virus ed endosomi

I TLR (*Toll-Like Receptors*) sono una classe di proteine che giocano un ruolo chiave nei meccanismi difensivi dell'immunità innata e hanno il ruolo di riconoscere la presenza di componenti di microrganismi (batteri, funghi e virus) che tentano di invadere la cute e le mucose.

I TLR sono recettori transmembrana, espressi soprattutto sulla membrana di cellule sentinella come macrofagi e cellule dendritiche, ma anche nella cute e nelle cellule epiteliali delle vie aeree e dell'intestino. A livello di queste barriere difensive hanno un ruolo fondamentale di ricognizione nei confronti dei patogeni prima che questi raggiungano il sangue o i tessuti degli organi interni e dare così inizio alle risposte immunitarie innate.

Alcuni di essi sono implicati nella patogenesi di malattie cutanee, come la dermatite atopica e la psoriasi.

I TLR riconoscono determinate strutture tipiche di patogeni e microbi e per questo motivi fanno parte della superfamiglia dei "recettori che riconoscono profili molecolari (*Pattern Recognition Receptors* o PRR). Essi riconoscono i PAMPs espressi dai microbi e i DAMPs espressi da cellule dell'ospite in caso di danno o morte cellulare. Una volta che il patogeno ha fatto breccia nelle barriere anatomiche dell'ospite (es. cute o mucose) esso è riconosciuto grazie ai TLR che attivano le risposte immunitarie nelle cellule sentinella.

I *pathogen-associated molecular pattern* (PAMPs) sono delle molecole associate a gruppi di patogeni che sono riconosciuti dalle cellule del sistema immunitario innato. Queste molecole sono correlate ad alcuni agenti microbici, sono essenziali per la loro sopravvivenza e non sono presenti nelle cellule dei mammiferi. Esse includono l'LPS (*lipopolisaccaride*) per i batteri Gram-negativi o i *peptidoglicani* per i Gram-positivi.

I PAMPs sono riconosciuti dai TLR e la stimolazione di questi recettori attiva una via di segnalazione che comporta l'induzione di geni anti-microbici, citochine proinfiammatorie (IL-1 β , TNF- α , IL-6) e prostaglandine.

I TLR condividono con il recettore dell'IL-1 la stessa cascata di segnalazioni che comporta l'attivazione dell'NFkB (*vedi aggiornamento 1 pag. 16 il fattore di trascrizione nucleare NFkB*). Questo è un fattore di trascrizione chiave per promuovere

l'espressione di geni coinvolti nella risposta immunitaria e in particolare di quelli che codificano citochine infiammatorie. Pertanto, l'attivazione dei TLR contribuisce ad attivare le risposte infiammatorie, ma anche la fagocitosi e il rilascio di molecole antibatteriche non-specifiche e peptidi antimicrobici (come le defensine a livello dell'epitelio delle vie aeree).

L'attivazione dei TLR può anche portare all'apoptosi per eliminare le cellule infettate e facilita anche lo sviluppo delle risposte immunitarie adattive, sia permettendo alle cellule presentanti l'antigene di attivare con più efficacia le cellule T, sia mediante la produzione e il rilascio di citochine (con conseguente differenziazione della risposta in Th1 o Th2 a seconda del patogeno).

Nell'uomo esistono undici TLR funzionanti:

Cinque TLR (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6) sono deputati a riconoscere profili patogeni nell'ambiente extracellulare.

Quattro TLR (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9) sono recettori nelle membrane intracellulari, come reticolo endoplasmatico ed endosomi.

I quattro TLR, presenti sulle membrane intracellulari, hanno come ruolo principale il riconoscimento di ligandi formati da acidi nucleici tipici dei microbi. Tra questi i TLR7 e in parte i TLR8 sono quelli che riconoscono gli RNA a singola catena.

Il SARS-CoV-2 è un virus di grande taglia, a singolo filamento di RNA a polarità positiva, con guscio proteico e membrana. L'RNA dà origine a sette proteine virali ed è associato alla Proteina N che ne aumenta la stabilità.

Come molti altri virus acidifica gli endosomi, rendendo il compartimento più acido al fine di rompere la membrana cellulare, rilasciare il materiale genetico ed iniziare la replicazione.

La cloroquina, utilizzata nella terapia antivirale, se somministrata in fase precoce dopo l'infezione, può far aumentare rapidamente il pH e sovvertire gli eventi di fusione in corso tra virus ed endosomi.

A causa della sua struttura azotata, la cloroquina penetra nelle cellule e attraversa le membrane endosomiali. Una volta penetrata impedisce l'acidificazione, assorbendo un'elevata quantità di idrogeni che interagiscono con l'azoto, si carica positivamente e l'interazione ionica rende più difficile l'acidificazione da parte del virus degli endosomi. Gli enzimi di questi organelli non possono funzionare perché il gruppo donatore sarà uno ione idrogeno, disabilitando l'idrolisi richiesta per la replicazione virale. Ne consegue che tutti gli eventi nella cellula non sono in grado di funzionare correttamente, compresa la replicazione virale.

Si può pertanto ipotizzare un ruolo rilevante dei TLR7 e in parte dei TLR8 nel riconoscimento del SARS-CoV-2 e sottolineare che un pH alcalino impedisce il processo di acidificazione degli endosomi da parte del virus e quindi la sua replicazione.

Conclusioni

Gli studi relativi all'infezione da SARS-CoV-2 e alla progressione della malattia da COVID-19 sono in continuo aggiornamento, come pure i risvolti clinici che, in

mancanza di terapie specifiche, richiedono di perfezionare le terapie antivirali, immunologiche e anticoagulanti attualmente utilizzate. Per tali motivi si rimandano la discussione e le conclusioni al prossimo aggiornamento (n.3) sul COVID-19.

In questa sede si ritiene utile ricapitolare gli aspetti più importanti tra i temi trattati:

- I meccanismi recettoriali e riproduttivi del virus SARS-CoV-2 ,a singolo filamento di RNA richiedono il legame al recettore ACE2 tramite la proteina S (subunità S1) e la penetrazione nelle cellule epiteliali delle mucose delle prime vie respiratorie ricche del recettore ACE2.
- L'ACE2 è un enzima espresso in molti organi, come rene, tratto gastrointestinale e respiratorio. A livello respiratorio è localizzato nelle mucose nasale e orali. L'espressione maggiore dell'ACE2 è stata trovata nelle cellule alveolari polmonari nel tipo 2 degli pneumociti, ma (come in altri organi) è presente anche nelle cellule endoteliali arteriose e venose.
- Il virus incontra le barriere immunitarie, interviene il MALT e le IgA mescolate al muco prodotto dalle cellule epiteliali. Il numero dei linfociti diminuisce e aumenta quello dei neutrofilo, aumentano le citochine che promuovono l'infiammazione (IL1,IL6, TNF alfa) e le chemochine. Il virus sembra non infettare i macrofagi e i linfociti (come fa il virus della SARS e della MERS), ma sopprime la produzione di interferon.
- La risposta innata disfunzionale, attribuibile all'iperattivazione di macrofagi e monociti, comporta una severa infiammazione fino alla "tempesta di citochine", quadro di shock settico, alterazioni coagulative e sindrome da disfunzione multiorgano. La disfunzione della componente innata è dovuta all'assenza di una potente risposta antivirale da parte delle cellule T.
- I coronavirus, oltre a sopprimere la produzione di interferon bloccano la presentazione degli antigeni da parte delle glicoproteine del complesso maggiore di istocompatibilità (HLA) di classe I e di classe II ostacolando la differenziazione in linfociti memoria , helper e citotossici. Le cellule NK non presentando recettori per l'antigene possono comunque agire e attaccare virus e cellule estranee.
- Nel COVID-19 si è registrata una ridotta risposta da parte delle cellule B della memoria "coronavirus specifica"(IgM e IgG), con limitata produzione e limitata persistenza delle IgG nel tempo, e una grave riduzione di linfociti T nel sangue.
- Per contrastare l'infezione è importante una risposta Th1 forte, incrementare l'attività citotossica delle NK, rispettando la regolarità del sonno e il conseguente picco fisiologico di melatonina, poter contare su un'aumentata risposta delle cellule della memoria locale e sistemica.
- Zhag et al. hanno dimostrato che l'80% dell'espressione del virus è nelle cellule epiteliali polmonari di tipo 2 e queste possono servire come una riserva per l'invasione virale. Inoltre a livello genetico gli pneumociti hanno un alto numero di geni correlati ai vari processi virali, compresi i geni regolatori del ciclo vitale del virus, dell' assemblaggio e della replicazione.
- I dati preminenti di broncopolmonite interstiziale bilaterale, IL6 >40 pg/ml e, se non disponibile, di D-dimero >1000, ferritina > 300 fanno presagire un' evoluzione, prognosticamente sfavorevole. In più della metà dei pazienti si va a configurare un quadro di sepsi caratterizzato da : insufficienza respiratoria, ARDS, shock settico, coagulopatia, insufficienza cardiaca acuta, insufficienza renale

acuta, infezioni secondarie, ipoproteinemia, acidosi. Si può infatti avere un quadro di sepsi anche con le infezioni virali e in assenza di patogeni batterici.

- La maggiore localizzazione dell'espressione della proteina ACE2 ,oltre che a livello delle cellule alveolari di tipo 2 dell'epitelio polmonare, è stata trovata anche a livello degli enterociti dell'intestino tenue.
- E' stato dimostrato che l'ACE2 regola l'omeostasi intestinale degli aminoacidi, l'espressione dei peptidi antimicrobici e l'ecologia del microbioma intestinale suggerendo che la disbiosi dell'intestino e del microbiota siano associata alla malattia cardiopolmonare.
- Cambiamenti ACE2-dipendenti dell'immunità e del microbiota intestinale si ritiene possono essere regolati dall'aminoacido triptofano. Recenti lavori hanno infatti rilevato l'influenza che il triptofano e il suo metabolita nicotinammide esercitano sul microbiota e li indicano come fattori chiave per controllare l'infiammazione.
- Una linea guida cinese raccomanda l'uso di probiotici in quanto possano modulare il microbiota intestinale e alcuni studi indicano l'ACE2 come il link che collega il metabolismo dietetico degli aminoacidi, l'immunità innata ,la composizione del microbiota intestinale e la suscettibilità alle infezioni intestinali. In particolare la malnutrizione di aminoacidi può provocare infiammazione intestinale e diarrea.
- I TLR (*Toll-Like Receptors*) sono una classe di proteine che giocano un ruolo chiave nei meccanismi difensivi dell'immunità innata e hanno il ruolo di riconoscere la presenza di componenti di microrganismi (batteri, funghi e virus) che tentano di invadere la cute e le mucose prima che questi raggiungano il sangue o i tessuti degli organi interni e dare così inizio alle risposte immunitarie innate.
- I TLR condividono con il recettore dell'IL-1 la stessa cascata di segnalazioni che comporta l'attivazione dell'NFκB. Pertanto, l'attivazione dei TLR contribuisce ad attivare le risposte infiammatorie, ma anche la fagocitosi e il rilascio di molecole antibatteriche non-specifiche e peptidi antimicrobici (come le defensine a livello dell'epitelio delle vie aeree).
- L'attivazione dei TLR può facilitare anche lo sviluppo delle risposte immunitarie adattive, sia permettendo alle cellule presentanti l'antigene di attivare con più efficacia le cellule T, sia mediante la produzione e il rilascio di citochine (con conseguente differenziazione della risposta in Th1 o Th2 a seconda del patogeno).
- Nell'uomo esistono undici TLR funzionanti e tra questi i TLR7 e in parte i TLR8 sono quelli che riconoscono gli RNA a singola catena.
- Il SARS-CoV-2 è un virus di grande taglia, a singolo filamento di RNA *a polarità positiva*, con guscio proteico e membrana. L'RNA dà origine a sette proteine virali ed è associato alla Proteina N che ne aumenta la stabilità. Come molti altri virus acidifica gli *endosomi*, rendendo il compartimento più acido al fine di rompere la membrana cellulare, rilasciare il materiale genetico ed iniziare la replicazione.
- La *cloroquina*, utilizzata nella terapia antivirale, se somministrata i fase precoce dopo l'infezione, può far aumentare rapidamente il pH e sovvertire gli eventi di fusione in corso tra virus ed endosomi.

- Si può pertanto ipotizzare un ruolo rilevante dei TLR7 e in parte dei TLR8 nel riconoscimento del SARS-CoV-2 e sottolineare che un pH alcalino impedisce il processo di acidificazione degli endosomi da parte del virus e quindi la sua replicazione.

Bibliografia

Abul Kalam Azad, Manobendro Sarker, Dan Wan: *Immunomodulatory Effects of Probiotics on Cytokine Profiles; BioMed Research International Volume 2018, article ID 8063647.*

Cascella Marco; Rajnik Michael; Cuomo Arturo; Dulebihn Scott C. Di Napoli Raffaella: *Features, Evaluation and Treatment Coronavirus (COVID 19) NCBI Bookshelf. a service of the National Library of medicine, National Institutes of Health,*

Chan K,H, J.S. Malik, S.Y. Larn et al: *The Effects of Temperature and Relative humidity on the Variability of the SARS coronavirus; Reserch Article , volume 2011*

Colleen t Cole-Jeffrey, MS, Meng Liu, PhD, Michael J Katovich, PhD, Mohan K Raizada, PhD and Vinayak Shenoy PhD: *ACE 2 and Microbiota: Emerging Targets for Cardiopulmonary Disease J Cardiovasc Pharmacol 2015 Dec : 66(6),540-550*

Federspil G.: *I fondamenti del metodo in medicina clinica e sperimentale, Piccin Editore, Padova ,1980.*

Fei Zhou.MD;Ting Yu,MD; et al: *Clinical course and risk factors for mortality of adult in patients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study , The LANCET March 11,2020*

Gasparini.L: *Multidisciplinarietà in Medicina-,Metodologia-Scienze Biomediche-Posizione dell'omeopatia in ambito scientifico, Edizioni Salus infirmorum, Padova, 2011.*

Haibo Zhang; Josef M;Yimin Li et al:*Angiotensin-converting enzyme 2(ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor; molecular mechanism and potential therapeutic target; Intensive Care Med(2020)46:586-590.*

Hamming I, Timens W, Bulthuis ML, Leliv AT, Navis G, van Goor H:*Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis; J Pathol,2004 Jun;3203(2);631-7.*

Hong Peng Jia, Dwight C. Look, Lei Shi, Melissa Hickey et al,*ACE2 Receptor Expression an Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection dependant on Differentiation of Human Airway;J. Virol. 2005 Dec; 79(23); 14614-14621:*

Hashimoto, Tatsuo; Perlot et al : *Ace2 links amino acid malnutrition to microbial ecology and intestinal inflammation; Nature ,487(7408):477-41.*

Kuster Gabriela,Pfister Otmar.Burkard Thilo,Qian Zhou, et al. *SARS-CoV2: should inhibitors of the renin-angiotensin system be withdrawn in patients with COVID-19? European Heart Journal(2020)0,1-3*

Li W.,Moore M,J.,Vasilieva N., Sui J., Wong S.K., Berne M.A. et al. (20239) *A novel coronavirus enzima 2 is a functional receptor for the sars coronavirus. Nature 426,450-454 <https://doi.org/10.1038/nature 02145> (PubMed).*

Nicastri E, Petrosillo N, Ippolito G, D'Offizi G, Marchioni L, Ascoli Bartoli T, Lepore L, Mondì A, Murachelli S, Antinori A, National Institute for Infectious Diseases "L. Spallanzani, IRCCS. Recommendations for COVID-19 Clinical Management INMI COVID-19 Treatment Group (ICOTREG): 10,4081/idr:2020,8543.

Piccini F, *Alla scoperta del microbioma umano, flora batterica, nutrizione e malattie del progresso. Fabio Piccini. Edizioni del Kindle.*

Qin Yan Gao, Ying Xuan Chen, Jing Yuang Fang: *Novel coronavirus infection and gastrointestinal tract 2020, journal of digestive Diseases.*

Tai, W. He, L., Zhang X et al.: *Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. Cell Mol Immunol (2020).*

Yu Chen, Qianyun Liu, Deyin Guo: *Emerging coronaviruses: Genome structure, replication and pathogenesis; 2020 journal of Medical Virology/ volume 92, issue 4*