UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA"
Laboratorio di Biologia Cellulare e Oncologia Sperimentale

Direttore responsabile : *Prof.*
Simone Beninati

Primo assistente alla ricerca: *Dott.*
Francesco Antonelli

PROGETTO COVID-19 ITALIA

Introduzie

I coronavirus sono di grandi dimensioni con RNA a singolo filamento, che infettano l'uomo, ma anche una vasta gamma di animali. I coronavirus sono stati descritti per la prima volta nel 1966 da Tyrell e Bynoe, che hanno coltivato il virus da pazienti con raffreddori comuni. Sulla base della loro morfologia, sono virioni sferici, con un guscio del nucleo e proiezioni di superficie simile a una corona solare, sono stati denominati per questo, coronavirus. Esistono quattro sottofamiglie: alfa, beta, gamma e delta-coronavirus. Mentre gli alfa e i beta-coronavirus sembrano provenire dai mammiferi, in particolare dai pipistrelli, i gamma e i delta-coronavirus provengono da suini e uccelli. La dimensione del genoma varia tra 26 kb e 32 kb. Tra i sette sottotipi di coronavirus che possono infettare l'uomo, i beta-coronavirus possono causare malattie gravi e mortali, mentre gli alfa-coronavirus causano infezioni asintomatiche o leggermente sintomatiche. La SARS-CoV-2 appartiene alla linea B dei beta-coronavirus ed è strettamente correlata al virus della SARS-CoV. I quattro principali geni strutturali codificano la proteina nucleocapside (N), la proteina spike (S), una piccola proteina di membrana (SM) e la glicoproteina di membrana (M) con un'ulteriore glicoproteina di membrana (HE) presente nei beta-coronavirus dell'HCoV-OC43 e HKU1. La SARS-CoV-2 è identica al 96% a livello del genoma intero a un coronavirus del pipistrello.

Come altri virus, la SARS-CoV-2 infetta le cellule epiteliali alveolari polmonari utilizzando l'endocitosi mediata dal recettore attraverso l'enzima di conversione dell'angiotensina II (ACE2) come recettore di ingresso. Si presume quindi che i farmaci associati alla proteina chinasi 1 associata all'AP2 (AAK1) che perturba queste proteine, possano inibire l'ingresso virale nelle cellule bersaglio. L'enzima convertitore dell'angiotensina (*Angiotensin-converting enzyme*), è un enzima appartenente alla famiglia delle esopeptidasi, e in particolare delle carbossipeptidasi. È una glicoproteina generalmente di membrana, localizzata sull'endotelio dei capillari polmonari, e catalizza specialmente il clivaggio del decapeptide angiotensina I nell'ottapeptide angiotensina II, grazie al taglio degli ultimi due amminoacidi C-terminali. L'angiotensina II è l'effettore più efficace ad azione ipertensiva del sistema renina-angiotensina-aldosterone. Questo sistema controlla il volume dei liquidi extracellulari e la vasocostrizione delle arterie.

La mancata regolazione dell'enzima porta ad un alto tenore di vasocostrizione responsabile dell'ipertensione.

Il coronavirus, SARS-CoV-2, per entrare nelle cellule bersaglio, usa proprio il legame con l'enzima ACE2. Studi condotti sui cavie hanno riportato che i farmaci ACE inibitori o bloccanti il recettore dell'angiotensina 2, come lisinopril e il losartan, possono aumentare significativamente l'espressione di RNA messaggero (e quindi probabilmente anche la quantità di proteina stessa) dell'ACE2 cardiaco. Se questo stesso meccanismo dovesse verificarsi anche negli uomini, una maggiore espressione di ACE 2, "potrebbe accelerare ulteriormente l'assorbimento del virus nelle cellule e la colonizzazione del tessuto polmonare dell'ospite".

Stato nutrizionale del paziente COVID-19

La nutrizione ha un ruolo importante nei pazienti COVID-19. In primo luogo, l'infezione da COVID-19 e la malnutrizione tendono a coesistere. Con il progredire della malattia, molti pazienti tendono ad essere denutriti. Alcuni farmaci anti-virali portano anche a malattie metaboliche. In secondo luogo, tra i pazienti, lo scarso stato nutrizionale e le carenze di micronutrienti peggiorano la malattia e aumentano il rischio di fallimento del trattamento terapeutico fino alla morte. Prima dell'avvento dell'attuale pandemia, gli studi hanno dimostrato che i pazienti infettati da virus, nutriti

con diete di qualità superiore e un migliore stato nutrizionale, tendevano a vivere più a lungo e avevano meno complicazioni. Si riduceva la probabilità di divenire anemici e presentavano una conta di cellule CD4 più elevata. Diversi studi randomizzati eseguiti in Africa e in Asia, hanno anche dimostrato che l'uso di integratori multivitaminici ha ridotto la mortalità, rallentando notevolmente la progressione dei danni relativi all'infezione virale. Negli Stati Uniti, l'assunzione di vitamina D, Acido folico, Vitamina A, Vitamina C, Vitamina E, Selenio e Zinco è stata associata in modo simile alla riduzione della progressione della malattia e della mortalità. Pertanto, una dieta di buona qualità e un'integrazione multivitaminica sono probabilmente utili per ridurre il rischio di infezione da COVID-1 Sappiamo da tempo che l'alimentazione è strettamente legata all'immunità, sia per quanto concerne il rischio e la gravità delle infezioni. Le infezioni croniche o acute, portano a disturbi nutrizionali o peggiorano lo stato nutrizionale delle persone colpite. Pertanto, è imperativo prestare attenzione alla dieta e allo stato nutrizionale durante la pandemia COVID-19 in corso. Inoltre, il decorso clinico della malattia COVID-19 tende ad essere più grave tra gli individui più anziani e tra le persone con condizioni croniche, come il diabete, l'ipertensione e il cancro, che sono in parte correlati alla nutrizione. Anche se i dati non sono ancora disponibili, le infezioni da COVID-19, in individui in assenza di sintomi, possono anche essere associate a esiti più gravi, e una nutrizione ottimale gioca un ruolo importante nel mantenimento di tale situazione tra i pazienti con tali caratteristiche. Infatti, consumare diete di buona qualità è sempre auspicabile, e questo è particolarmente importante durante la pandemia COVID-19. Una dieta ottimale, dovrà fornire quantità adeguate di macronutrienti e minerali essenziali e

soprattutto vitamine La presenza di infezione da COVID-19, comporta una perdita di calorie che conduce alla perdita di peso involontaria è significativa. Quantità adeguate di minerali e vitamine fornite da una dieta sana, aiuta a garantire un numero sufficiente di cellule immunitarie e anticorpi, che sono importanti come risposta alle infezioni. Lo zinco è un componente di molti enzimi e fattori di trascrizione nelle cellule di tutto il corpo, e livelli di zinco inadeguati limitano la capacità dell'individuo di una risposta immunitaria adeguata alle infezioni. Molteplici meta-analisi e analisi in pool di studi randomizzati controllati (RCT) hanno dimostrato che l'integrazione di zinco per via orale riduce il tasso di incidenza delle infezioni respiratorie acute del 35%, riduce la durata dei sintomi simil- influenzali di circa 2 giorni e migliora il tasso di recupero. Gli studi sono stati condotti negli Stati Uniti e in diversi paesi a basso e medio reddito come l'India, il Sudafrica e il Perù. La dose di zinco in questi studi variava da 20 mg/settimana a 92 mg/giorno. La vitamina C è un cofattore per molti enzimi. Migliora la funzione di molti enzimi in tutto il corpo, mantenendo i loro ioni metallici nella forma ridotta. Agisce anche come antiossidante, limitando l'infiammazione e i danni ai tessuti associati alle risposte immunitarie. L'integrazione di vitamina C riduce significativamente l'incidenza delle infezioni delle vie respiratorie. Diversi studi clinici dimostrano che l'integrazione di vitamina D riduce le probabilità di sviluppare infezioni acute delle vie respiratorie da virus. Questi studi hanno incluso sia l'influenza stagionale che la pandemia influenzale causata dal virus H1N1 nel 2009 (influenza suina). L'effetto benefico dell'integrazione è stato osservato in pazienti di tutte le età e in individui con malattie croniche preesistenti. Tra coloro che erano stati infettati, i sintomi dell'influenza suina erano minori e il recupero più precoce se avevano ricevuto dosi di vitamina D superiori a 1.000 UI.
Nelle polmoniti da infezioni virali in genere come nella SARS COV lo stress ossidativo gioca un ruolo importante. L'utilizzo di antiossidanti attivi e non tossici come ad es. la N-acetilcisteina (NAC) precursore del glutatione, nella terapia antivirale e cortisonica della SARS è sicuramente auspicabile. Alcuni risultati ottenuti in alcuni studi clinici sperimentali hanno dimostrato che la NAC svolge un positivo effetto terapeutico e preventivo sulle infezioni da virus influenzale. Tali considerazioni permettono di prospettare l'impiego degli antiossidanti anche su altre infezioni virali come il COVID-19, nelle quali lo "stress ossidativo" costituisce presumibilmente un importante fattore-patogenetico.
Razionale del progetto COVID-19
Il fine del progetto è quello di verificare gli aspetti positivi della somministrazione dell'integratore Citexivir in pazienti infettati da COVID-19, asintomatici e sintomatici. In particolare la formulazione dell'integratore, oggetto di tale progetto, dovrebbe sia migliorare lo stato nutrizionale dei pazienti, che ridurre la sintomatologia e rallentare la progressione. Diversi parametri clinici saranno controllati, durante i 120 giorni di trattamento in accordo con il protocollo

In particolare i seguenti controlli saranno eseguiti:

- raccolta dei dati anamnestici
-tampone rino-faringeo al fine di selezionare esclusivamente volontari infettati da COVID-19
-saturazione dell'ossigeno (al fine di escludere pazienti che richiederebbero la ventilazione polmonare assistita).
-analisi cliniche dei parametri biochimici (relativi all'infezione)
-controllo dello stato nutrizionale del paziente
- radiografie e tomografie computerizzata del torace
- assistenza domiciliare

- Nel nostro studio sarà fondamentale mettere in correlazione l'aumentata produzione di ROS, e le potenziali difese ematiche antiossidanti, ottenendo una valutazione dello stato redox del pazienti con sintomatologia riconducibile al COVID 19, sottoposti a prelievi capillari di 20 microlitri, con valutazione in parallelo e sullo stesso prelievo, sarà valutata la barriera ematica antiossidante BAP TEST (antiossidanti) come gruppi tiolici (–SH), Vitamina E Vitamina C e Acido Urico che costituiscono una componente rilevante con attività antiossidante endogena.

Selezione dei volontari (fase di inserimento nel trial)

I 60 volontari che parteciperanno al progetto dovranno essere esaminati secondo i test diagnostici attualmente in uso in clinica. l'OMS ha pubblicato un protocollo riguardante il test diagnostico per SARS-CoV-2, sviluppato da una squadra di virologi dell'Ospedale Universitario della Charité in Germania. Per selezionare i volontari adatti per il progetto e per escludere quelli che necessitano di ventilazione polmonare (non inseribili), sarà utilizzata la radiografia o tomografia computerizzata del torace per evidenziare segni riconducibili alla polmonite. La diagnosi viene effettuata grazie all'esecuzione di un esame di reazione a catena della polimerasi inversa in tempo reale (rRT-PCR) su campioni di espettorato o di sangue prelevati dal paziente. Il test, quindi, utilizza la reazione a catena della polimerasi inversa in tempo reale (rRT-PCR). I risultati sono generalmente disponibili entro poche ore o, al massimo, giorni. L'inserimento nel trial sarà effettuato istruendo i pazienti alla metodica di somministrazione del ***Citexivir*** secondo il protocollo terapeutico allegato. I volontari non saranno ospedalizzati, ma seguiranno la terapia in ambito domestico secondo le regole della quarantena. Personale sanitario specializzato, munito di tutti i dispositivi medici di sicurezza, curerà la raccolta dei parametri relativi ai risultati e dei prelievi biologici previsti. I volontari definiti "sintomatici", non necessitando della ventilazione polmonare assistita potranno trascorrere il periodo di quarantena in ambito domestico, rispettando le norme di prevenzione necessarie per gli altri componenti della famiglia. Ogni eventuale segnalazione di peggioramento, dello stato di salute del paziente, comporterà l'immediata ospedalizzazione ed esclusione dal progetto. I volontari definiti "asintomatici" potranno trascorrere la quarantena in ambito

domestico.

Gruppo A: 30 volontari infettati dal COVID-19 (controllati tramite tampone rino-faringeo) privi di sintomi apparenti.

Gruppo B: 30 volontari infettati dal COVID-19 (controllati tramite tampone rino-faringeo) con sintomi evidenti di infezione (temperatura corporea superiore a 37.5 °C. tosse stizzosa, congiuntivite e affanno respiratorio*) ***non sottoposti a ventilazione polmonare**

Diagnosi preliminare

La diagnosi di COVID-19 può essere formulata anche valutando il titolo anticorpale. Tale metodica utilizza un campione di siero ematico, e può fornire un risultato positivo anche se nel paziente il virus non è più presente nell'organismo. Il primo test anticorpale è stato dimostrato da un team dell'Istituto di virologia di Wuhan il 17 febbraio 2020. Il 25 febbraio, la Duke - NUS Medical School di Singapore ha presentato un altro test anticorpale per COVID-19 che può fornire un risultato entro pochi giorni.

Le linee guida diagnostiche attuali che saranno seguite sono relative alle caratteristiche cliniche e al rischio epidemiologico. Utilizzando tali criteri sarà possibile diagnosticare la malattia in volontari che presentano almeno due dei seguenti sintomi : febbre, segni di polmonite all'*imaging* biomedico, conta dei globuli bianchi normale o ridotta o riduzione della conta dei linfociti. Uno studio recente ha evidenziato che l'esecuzione di una tomografia computerizzata ha una sensibilità maggiore (98%) rispetto alla reazione a catena della polimerasi (71%) nella diagnosi di COVID-19. Per questo motivo tutti i volontari del presente progetto saranno sottoposti ad una tomografia computerizzata.

Personale Medico e Sanitario coinvolto nel progetto

Il sistema di gestione del rischio è stato introdotto nella legislazione europea nel 2004, ma il Piano di gestione del Rischio (Risk Management Plan, RMP). Le linee guida di riferimento sono essenzialmente riferite alla descrizione delle misure per prevenire o minimizzare i rischi, inclusa una valutazione dell'efficacia di tali interventi. Saranno soddisfatti gli eventuali obblighi post- autorizzativi che sono stati imposti come condizione all'AIC (PASS, PAES).

Primo assistente alla ricerca	Il Direttore del laboratorio	Il Responsabile Scientifico
Dott. Francesco Antonelli	*Prof. Simone Beninati*	*Dott.Pacquale Ferorelli*





