



UNIVERSITÀ DI PARMA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA MOLECOLARE

CICLO XXXVIII

**“Disfunzione endoteliale e compromissione polmonare nel COVID-19:
meccanismi patogenetici alla base dell’infezione da SARS-CoV-2”**

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Prisco Mirandola

Tutore:
Chiar.ma Prof.ssa Amelia Barilli

Dottorando: Giulia Recchia Luciani

Anni Accademici 2022/2023 – 2024/2025

INDICE

SOMMARIO	5
INTRODUZIONE.....	8
1. Caratteristiche generali	8
Struttura.....	9
Genoma virale	12
2. Le varianti di SARS-CoV-2	14
Variante alpha	14
Variante beta	15
Variante delta	15
Variante Gamma o P1	15
Variante Omicron o B.1.1.529.....	16
3. Trasmissione e manifestazioni cliniche	17
4. Diagnosi	19
5. Immunopatogenesi	20
6. La disfunzione polmonare	25
Meccanismi patogenetici della disfunzione polmonare	25
Associazione tra COVID-19 e ARDS: CARDS.....	28
7. La disfunzione endoteliale	32
SCOPO DELLO STUDIO	35
MATERIALI E METODI	36
1. Colture cellulari	36
Macrofagi derivati da monociti (MDM).....	36
Cellule epiteliali alveolari (A549)	36
Cellule endoteliali (HLMVEC e HUVEC).....	36
2. Trattamenti sperimentali	37
Trattamenti sperimentali su A549	37
Trattamenti sperimentali su HLMVEC e HUVEC.....	37
3. Analisi di espressione genica	38
Estrazione e purificazione dell'RNA	38
Retrotrascrizione e RT-qPCR.....	38
4. Analisi Western Blot	41
5. Quantificazione delle citochine.....	41
6. Proliferazione cellulare	42

Conta cellulare	42
Saggio della resazurina	42
7. Analisi del ciclo cellulare	42
8. Apoptosi	43
9. Autofagia	43
10. Determinazione della produzione di ossido nitrico	43
11. Analisi statistica	44
RISULTATI	45
1. Effetti della proteina Spike S1 sul fenotipo di cellule epiteliali alveolari	45
Effetti diretti ed immunomediati di Spike S1 sull'epitelio alveolare	45
Effetti immunomediati di Spike S1 sulla vitalità dell'epitelio alveolare	47
iNOS come marker di un fenotipo epiteliale attivato	50
Meccanismi molecolari sottostanti gli effetti immunomediati di Spike S1 sull'epitelio alveolare	51
Ruolo di IRF1 nella modulazione degli effetti immunomediati di Spike S1 sull'epitelio alveolare	53
Ruolo delle citochine infiammatorie negli effetti immunomediati di Spike S1 sull'epitelio alveolare	55
2. Effetti della proteina Spike S1 sul fenotipo di cellule endoteliali	58
Effetti diretti ed immunomediati di Spike S1 sull'endotelio.....	58
Effetti immunomediati di Spike S1 sulla vitalità dell'endotelio.....	65
Effetti immunomediati di Spike S1 sul metabolismo dell'arginina nelle cellule endoteliali	68
Meccanismi molecolari sottostanti gli effetti immunomediati di Spike S1 sulle cellule endoteliali	70
DISCUSSIONE	74
1. La disfunzione polmonare durante l'infezione da SARS-CoV-2.....	74
2. La disfunzione endoteliale durante l'infezione da SARS-CoV-2	79
CONCLUSIONI	83
BIBLIOGRAFIA	84

SOMMARIO

Il presente lavoro di tesi è stato condotto presso il Laboratorio di Patologia Generale del dipartimento di Medicina e Chirurgia dell'Università di Parma. Lo studio ha analizzato i meccanismi patogenetici alla base della disfunzione polmonare e vascolare associata al COVID-19, patologia causata dal virus SARS-CoV-2.

Numerose evidenze indicano che la forma grave della malattia è caratterizzata da una insufficienza multiorgano correlata ad uno stato iperinfiammatorio (la cosiddetta "tempesta di citochine") in combinazione con uno stato protrombotico. Tuttavia, i meccanismi patogenetici alla base della risposta iperinfiammatoria che contribuisce al danno epiteliale alveolare ed endoteliale rimangono ad oggi solo parzialmente compresi.

L'obiettivo del presente lavoro di tesi è stato quello di studiare la risposta dell'epitelio alveolare e dell'endotelio umano alla proteina Spike di SARS-CoV-2. A tal fine le cellule endoteliali microvascolari ed epiteliali alveolari sono state esposte direttamente alla proteina Spike S1 oppure incubate con il medium condizionato ottenuto da macrofagi umani pretrattati con la proteina Spike S1 (CM_S1). Tale disegno sperimentale ha riprodotto in vitro l'effetto del virus SARS-CoV-2 sulle cellule, sia diretto come infezione virale, sia immunomediato dalla presenza di citochine infiammatorie prodotte da macrofagi.

Per quanto riguarda le cellule epiteliali alveolari (linea A549), l'analisi del profilo infiammatorio dopo trattamento diretto con diverse concentrazioni di Spike S1 ha evidenziato una significativa secrezione di alcuni mediatori dell'infiammazione solo alla dose più elevata, pari a 50 nM; la concentrazione di 10 nM, corrispondente indicativamente al livello plasmatico di Spike S1 nei soggetti affetti, non produce invece nessuna attivazione cellulare. Al contrario, il trattamento delle cellule alveolari con CM_S1 induce marcatamente l'espressione genica di varie citochine. Sono stati quindi approfonditi specificamente i processi cellulari e molecolari legati alla modulazione immunomediata del fenotipo infiammatorio nelle cellule A549. Preliminarmente, sono stati valutati eventuali effetti citotossici del CM_S1. Tale trattamento causa cambiamenti morfologici accompagnati da un evidente arresto proliferativo in fase G0/G1 con induzione di autofagia. L'analisi di un altro marcatore notoriamente associato ad un fenotipo epiteliale attivato, cioè iNOS, ha riportato una notevole induzione di questo enzima da parte del CM_S1. È stato inoltre possibile attribuire questi effetti alla presenza simultanea

delle citochine IFN γ , IL-1 e TNF α con attivazione dei pathway molecolari attivati dai fattori di trascrizione NF- κ B, STAT e AP-1.

Utilizzando le cellule A549 IRF1 KO è stato inoltre dimostrato che, negli effetti mediati dal CM_S1, il fattore di trascrizione IRF1, a valle del pathway JAK-STAT, gioca un ruolo chiave, in particolare per l'induzione di iNOS. È stato infine valutato l'effetto del baricitinib, farmaco approvato dalla FDA nel trattamento della forma grave di COVID-19. Tale farmaco, inibitore di JAK-STAT, si è rivelato efficace nel contrastare l'aumento di IRF1 e dei geni coinvolti nella degradazione proteasoma-dipendente e nel ridurre l'autofagia. Coerentemente, in presenza di baricitinib, i cambiamenti morfologici delle cellule A549 indotti dopo esposizione a CM_S1 risultano attenuati ed il numero delle cellule parzialmente ristabilito.

Complessivamente, questi dati suggeriscono:

1. un ruolo chiave della via JAK/STAT/IRF1, nelle cellule epiteliali alveolari, nel mediare gli effetti citostatici prodotti dalle citochine infiammatorie secrete dai macrofagi attivati dalla proteina Spike S1;
2. il farmaco baricitinib si dimostra efficace nel proteggere l'attivazione delle cellule alveolari da citochine infiammatorie.

Nella seconda parte di questo lavoro è stata valutata la risposta dell'endotelio alla proteina virale, sia a seguito della esposizione diretta delle cellule endoteliali alla Spike S1, sia dopo il trattamento con CM_S1.

I risultati ottenuti indicano che l'incubazione delle cellule endoteliali con la sola proteina S1 induce significativamente l'espressione di marcatori tipici di attivazione endoteliale, quali le molecole di adesione ICAM-1 e VCAM-1, nonché delle chemochine infiammatorie CCL2/MCP-1 e CXCL10/IP-10. Questa attivazione risulta nettamente amplificata quando le cellule endoteliali vengono incubate con CM_S1, con un concomitante aumento dei marcatori endoteliali pro-coagulanti. In parallelo il trattamento con questo medium condizionato provoca una significativa riduzione della proliferazione cellulare, accompagnata da evidenti segni di citotossicità. Esplorando i meccanismi molecolari alla base degli effetti antiproliferativi/pro-apoptotici del CM_S1, le proteine p21 e Rb risultano implicate.

Allo scopo di approfondire i meccanismi coinvolti nelle complicanze vascolari associate all'infezione da SARS-CoV-2, l'attenzione si è poi concentrata sull'analisi del metabolismo dell'arginina nelle

HUVEC (human umbelical vascular endothelial cells) che, da studi di letteratura su pazienti con COVID-19, risulta essere disfunzionale.

I risultati ottenuti dimostrano che il terreno condizionato CM_S1 modula l'espressione di eNOS e dell'arginasi, con una soppressione quasi completa dei livelli di NOS3/eNOS ed un concomitante aumento dell'espressione dell'arginasi. Per quanto riguarda lo studio dei pathways JAK-STAT/IRF1 ed NF- κ B in relazione al danno cellulare delle HUVEC, i risultati dimostrano che la compromissione della vitalità endoteliale è riconducibile, almeno in parte, all'attivazione congiunta di tali vie di segnalazione.

Partendo da questi risultati e considerando gli effetti protettivi del baricitinib sulle cellule epiteliali alveolari, lo studio si è concluso valutando l'efficacia di tale farmaco nella modulazione della risposta infiammatoria endoteliale da CM_S1. Il baricitinib si è rivelato inefficace nel contrastare l'induzione di VCAM-1 e solo parzialmente funzionante su ICAM-1. Diversamente, previene completamente l'induzione di IL-6, IP-10 e RANTES.

Alla luce dei risultati si può concludere che, nel COVID-19, l'insorgenza della disfunzione alveolare ed endoteliale abbia alla base sia un effetto citopatico diretto mediato dal virus SARS-CoV-2, sia effetti indiretti, mediati dalla presenza di citochine secrete da macrofagi attivati dalla proteina Spike. I dati ottenuti sostengono inoltre un ruolo promettente del farmaco baricitinib, efficace nel limitare la risposta immunomediata delle cellule epiteliali alveolari ed endoteliali.

INTRODUZIONE

Nel dicembre 2019 è emersa a Wuhan, Hubei, Cina, una serie di casi di polmonite di causa sconosciuta, con presentazioni cliniche molto simili ad una polmonite virale. L'analisi di sequenziamento da campioni del tratto respiratorio inferiore ha indicato un nuovo coronavirus, che è stato denominato SARS-CoV-2 (acronimo di Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2). Questo virus ha manifestato un'alta contagiosità diffondendosi rapidamente nel resto del mondo; l'11 febbraio 2020 l'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) ha annunciato un nuovo nome per la malattia causata dal SARS-CoV-2: malattia da CoV 19 (COVID-19) ed esattamente un mese dopo, l'11 marzo 2020, è stato dichiarato lo stato di pandemia.

1. Caratteristiche generali

Il virus SARS-CoV-2 è un ceppo della specie Coronavirus, un gruppo di virus appartenenti all'ordine Nidovirales, che comprende le famiglie Coronaviridae, Roniviridae e Arteriviridae. I virus di questo ordine condividono alcune proprietà fondamentali: sono tutti virus a RNA a singolo filamento positivo, non segmentati e racchiusi da un involucro lipidico (envelope). Tra i membri della stessa famiglia si trovano anche il coronavirus responsabile della sindrome respiratoria acuta grave (conosciuto come SARS-CoV o SARS-CoV-1), che ha causato l'epidemia di SARS nel 2003 ed è stato trasmesso all'uomo attraverso lo zibetto, e il MERS-CoV, legato alla sindrome respiratoria del Medio Oriente, identificato nel 2012 e trasmesso dai dromedari. A livello genetico, i Coronavirus vengono suddivisi in quattro gruppi principali: Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus e Deltacoronavirus. I virus che infettano l'essere umano appartengono prevalentemente ai generi Alpha- e Betacoronavirus; in quest'ultimo rientrano anche SARS-CoV-1, MERS-CoV e SARS-CoV-2.

I pipistrelli rappresentano ospiti naturali fondamentali per i virus appartenenti ai generi Alphacoronavirus e Betacoronavirus. Il coronavirus finora più simile al SARS-CoV-2 è stato identificato infatti in un pipistrello appartenente alla specie *Rhinolophus affinis*, nella provincia cinese dello Yunnan, ed è stato denominato 'RaTG13'. La sequenza completa del suo genoma mostra una corrispondenza del 96,2% con quella del SARS-CoV-2. Questo virus presenta inoltre più del 90% di identità genetica con il SARS-CoV-2. Le analisi filogenetiche indicano che SARS-CoV-2 è strettamente imparentato con RaTG13. L'alto grado di somiglianza a livello genetico tra i due virus suggerisce dunque che il SARS-CoV-2 abbia avuto origine nei pipistrelli [1]. La scoperta di numerosi coronavirus di pipistrello strettamente legati al SARS-CoV-2 indica che i pipistrelli potrebbero fungere

da serbatoi naturali per questo virus. Oltre ai pipistrelli, i pangolini rappresentano un altro possibile ospite associato al SARS-CoV-2. Nel periodo compreso tra il 2017 e il 2019, sono stati trovati vari virus correlati al SARS-CoV-2 nei tessuti di pangolini malesi, sequestrati nel Sud-est asiatico e introdotti nella Cina meridionale, con una somiglianza genetica del 92,4%. In particolare, il dominio di legame del recettore (RBD) dei coronavirus isolati dai pangolini del Guangdong presenta una notevole somiglianza con quello del SARS-CoV-2. Tuttavia, a differenza dei pipistrelli, che ospitano il virus senza mostrare sintomi evidenti, i pangolini infettati hanno manifestato segni clinici e modificazioni istopatologiche, come polmonite interstiziale e infiltrazione di cellule infiammatorie in vari organi. Questi cambiamenti suggeriscono che i pangolini non siano il serbatoio originario di questi coronavirus ma che abbiano contratto il virus attraverso uno spillover da altri ospiti naturali [2].

Struttura

SARS-CoV-2 presenta una forma sferica ed ha un diametro compreso tra i 60 e 120 nm. Nella parte esterna, le particelle virali includono un pericapside sul quale vengono espresse delle proiezioni che formano una struttura a “corona”, caratteristica per la quale i virus sono stati denominati “Coronavirus” (Figura 1).

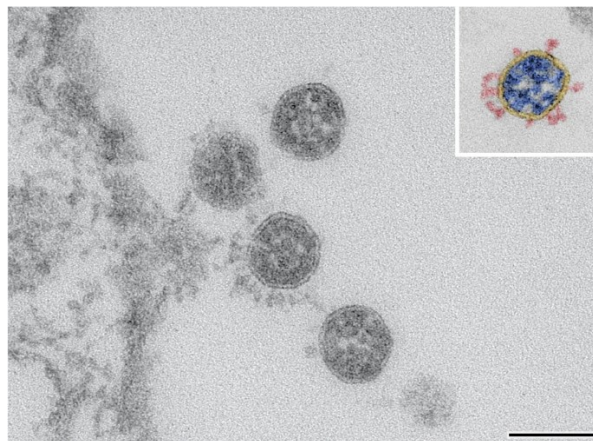


Figura 1. Immagine al microscopio elettronico di SARS-CoV-2. Esempio di un'immagine di quattro particelle di SARS-CoV-2 registrata mediante microscopia elettronica a trasmissione a un ingrandimento di 135.000x. Barra di scala = 100 nm. Da [3]

Il genoma di SARS-CoV-2 (27–32 kb) è un RNA a singolo filamento positivo (+ssRNA). La proteina del nucleocapside (N) forma il capsido all'esterno del genoma e il genoma è ulteriormente impacchettato da un involucro che è associato a tre proteine strutturali: proteina di membrana (M), proteina Spike (S) e proteina dell'involucro (E) (Figura 2). SARS-CoV-2 possiede anche sedici proteine non strutturali (nsp1–16) che assolvono a diverse funzioni [4].

Proteine strutturali:

- Proteina S: L'ingresso del virus SARS-CoV-2 all'interno delle cellule ospiti avviene grazie all'azione della glicoproteina Spike (o proteina S), presente sulla sua superficie. Questa proteina di membrana è organizzata in omotrimeri che sporgono dall'involucro virale, conferendo al virus il caratteristico aspetto "a corona".

La Spike è suddivisa in due subunità principali: S1 e S2, ciascuna con funzioni specifiche.

La subunità S1 comprende il dominio N-terminale (NTD) e il dominio di legame al recettore (RBD), responsabile del riconoscimento e dell'interazione con il recettore della cellula ospite.

La subunità S2, invece, include il peptide di fusione (FP), le regioni a ripetizione eptade HR1 e HR2, l'elica centrale (CH), il dominio connettore (CD), il tratto transmembrana (TM) e la coda citoplasmatica (CT). Il suo ruolo principale è quello di favorire la fusione tra la membrana virale e quella cellulare, permettendo l'ingresso del materiale genetico del virus. Tra le due subunità è presente un sito di clivaggio proteolitico S1/S2, dove intervengono proteasi dell'ospite che scindono la proteina Spike in corrispondenza del sito S2'. Questa scissione è essenziale per attivare la proteina e consentire la fusione delle membrane, tramite modificazioni conformazionali irreversibili.

Il SARS-CoV-2 riconosce e si lega alle cellule umane attraverso l'interazione tra la sua glicoproteina Spike e il recettore ACE2 (enzima di conversione dell'angiotensina 2), passaggio fondamentale per l'infezione [5]. Questo recettore è espresso sulla superficie cellulare di diversi organi come cuore, endotelio, fegato, rene, testicolo, intestino, e polmone; le cellule epiteliali alveolari di tipo II comprendono l'83% delle cellule che esprimono ACE2. Il legame di ACE2 con la subunità S1 induce un cambiamento conformazionale della proteina S che porta all'avvicinamento della membrana virale a quella plasmatica. Le proteasi dell'ospite, tra cui TMPRSS2, una serina proteasi transmembrana cellulare di tipo II, scindono la glicoproteina Spike nel sito di scissione S2' e questo porta alla fusione tra membrane e, infine, all'inglobamento del virus infettante [4].

- Proteina N: La funzione principale della proteina N è quella di impacchettare l'RNA virale nel ribonucleocapside elicoidale legandosi all'RNA tramite il suo dominio adibito specificamente al legame con l'RNA ('RNA-binding domain'), presente nel suo core. Interagisce anche con le altre proteine strutturali durante l'assemblaggio del virione. Il genoma virale è riempito con proteine N che formano un nucleocapside elicoidale protetto da un involucro lipidico [6].
- Proteina M: La proteina di membrana (M) è uno degli elementi funzionali chiave nel virus, gioca un ruolo fondamentale nel mantenimento delle dimensioni e della forma del virione. Essa determina la forma dell'involucro virale ed è la proteina strutturale più abbondante. È una proteina transmembrana composta da 222 aminoacidi, con domini N- e C-terminali che si affacciano rispettivamente all'interno e all'esterno della particella virale, e tre domini transmembrana (TMD1–TMD3). La porzione C-terminale della proteina M può interagire con le proteine N ed E, mentre i domini transmembrana (TMD) sono in grado di legarsi alla proteina S [7]. La proteina M gioca un ruolo fondamentale nell'assemblaggio delle particelle virali. Contribuisce a definire la forma distintiva del pericapside virale, interagendo con le proteine S ed E, e fornisce la matrice necessaria per l'attacco del nucleocapside, facilitando così la sintesi virale [8].
- Proteina E: La proteina E è la più piccola delle proteine strutturali transmembrana, composta da 75 aminoacidi e suddivisa in tre domini: un dominio N-terminale idrofilo all'esterno della particella virale, un dominio transmembrana idrofobico (TMD), seguito da un lungo dominio C-terminale idrofilo all'interno della particella. La proteina E esercita la sua funzione interagendo con altre proteine strutturali, in particolare con la proteina M, per mantenere la forma della particella virale e favorirne il rilascio dalle cellule infette [9].

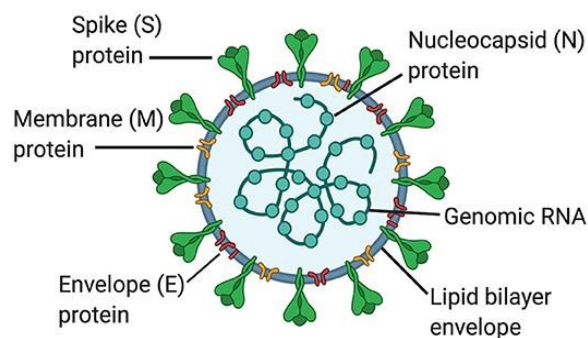


Figura 2. Struttura di SARS-CoV-2. Da [10]

Genoma virale

Il SARS-CoV-2 possiede un genoma costituito da un RNA a singolo filamento a senso positivo. Il contenuto di GC nel suo RNA genomico (gRNA) è relativamente basso, pari al 38%. Il gRNA presenta una struttura con un cappuccio 5' (5'-cap) e una coda 3'-poly-A. Il genoma comprende 11 ORF (Open Reading Frames): l'ORF1ab rappresenta circa due terzi dell'intero genoma ed è formato da geni che codificano per proteine "replicasi". Questi geni producono due poliproteine principali, pp1a e pp1ab, che vengono successivamente scisse in 16 proteine non strutturali (nsp) attraverso un processo di scissione proteolitica mediato da diverse proteasi, tra cui una proteasi simile alla chimotripsina e due proteasi simili alla papaina. Ogni nsp ha un ruolo specifico nel ciclo vitale del virus. Ad esempio, nsp1 interagisce con il ribosoma per inibire la sintesi proteica dell'ospite, mentre nsp2 potrebbe essere coinvolta nel coordinamento della trascrizione virale con la traduzione, interagendo sia con il ribosoma che con i complessi di replicazione-trascrizione (RTC). La proteasi simile alla papaina (PLpro), ovvero nsp3, scinde il polipeptide in tre siti, dando origine agli nsps maturi 1–3, mentre nsp5, conosciuta anche come proteasi principale (Mpro), scinde pp1a e pp1ab in 11 punti, rilasciando gli nsps maturi 4–16 [11].

Il genoma del SARS-CoV-2 contiene anche otto ORF che codificano per proteine accessorie, denominate ORF 3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8a, 8b e 9b. Le proteine accessorie si distinguono dalle proteine non strutturali in quanto non mostrano omologia con proteine di altri gruppi virali. Solitamente sono di piccole dimensioni e hanno un ruolo indiretto nel funzionamento del virus. La parte rimanente del genoma è costituita da ORF che codificano per le quattro proteine strutturali (Figura 3) [12].

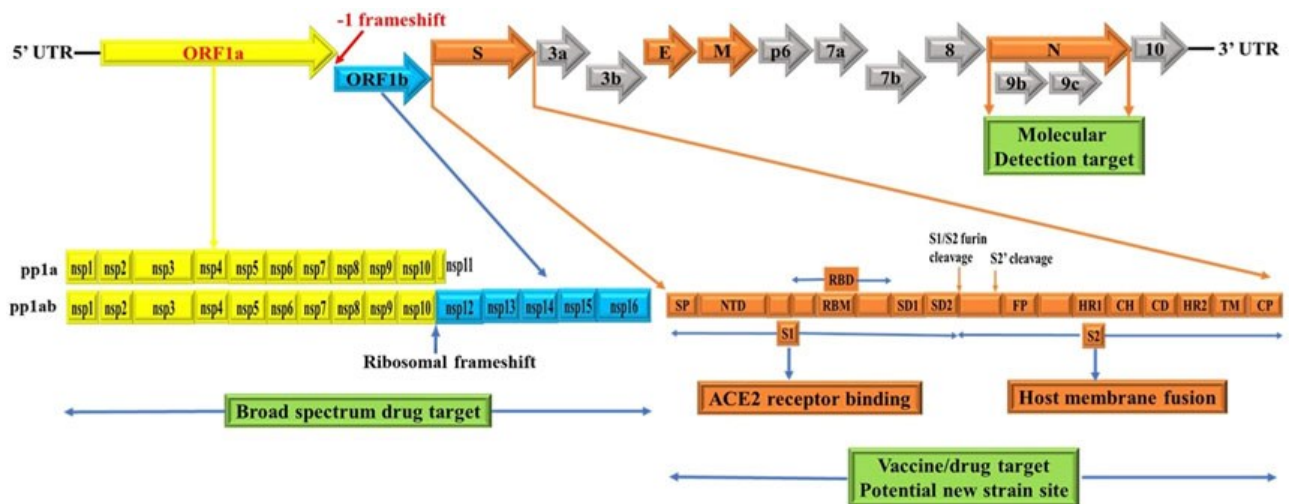


Figura 3. Struttura del genoma di SARS-CoV-2 e delle sue proteine codificate. L'open reading frame 1a (ORF1a) e l'ORF1b sono mostrati rispettivamente come riquadri giallo e azzurro, che codificano per 16 proteine non strutturali (NSP). I geni che codificano le principali proteine strutturali, tra cui Spike (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapside (N), sono rappresentati come riquadri arancioni. Da [13]

Tra le proteine non strutturali, la RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp), codificata da nsp12, ha un ruolo fondamentale sia nella replicazione dell'RNA che nella trascrizione [4]. Le RdRp dei coronavirus si distinguono perché replicano grandi molecole di RNA (fino a 32 kb). Nsp12 sintetizza il primo filamento negativo (RNA (-)) legandosi all'estremità 3' del gRNA. I coronavirus possiedono anche altre attività tipiche dei virus a RNA (+), come quelle elicasiche e di capping. Attività di processing dell'RNA meno comuni o addirittura uniche sono associate ad altre nsp, come nsp14, che possiede un'attività esonucleasica 3'-5' (ExoN) nel suo dominio ammino-terminale [14] e nsp15 con attività endoribonucleasica (NendoU) [15].

Una volta prodotto, il filamento intermedio di RNA (-) viene replicato per generare un filamento di RNA a senso positivo, che costituirà il materiale genetico da "impacchettare" nei nuovi virioni in formazione. Oltre alla replicazione, il filamento intermedio di RNA (-) subisce anche un processo di "trascrizione discontinua". La RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp) si lega a vari punti del filamento intermedio di RNA (-) e inizia la trascrizione. Questo processo genera trascritti di mRNA (+) di diverse lunghezze, che codificheranno per diverse proteine, le quali verranno poi "impacchettate" nei virioni. Questi trascritti di mRNA (+) sono noti come mRNA subgenomici (sgmRNA), poiché derivano tutti dallo stesso filamento intermedio di RNA antisense.

A questo punto, gli sgmRNA vengono tradotti dai ribosomi, che sono associati al reticolo endoplasmatico (ER), in diverse proteine virali, tra cui le proteine strutturali Spike (S), Envelope (E) e Membrana (M). L'ER forma vescicole a doppia membrana (DMV), all'interno delle quali l'RNA virale viene replicato e protetto dal sistema immunitario innato dell'ospite. La proteina M agisce come un elemento chiave nell'organizzazione dell'assemblaggio del virione, grazie alle sue interazioni con le altre proteine strutturali [16]. Oltre a interagire con la proteina N, la proteina M si coordina con la proteina E per dirigere e trattenere la proteina S nei siti di assemblaggio del virione, facilitando anche la sua maturazione. La nsp3 crea pori che permettono all'RNA virale di uscire dalle DMV per il processo di assemblaggio del virione. Le proteine del nucleocapside (N) rimangono nel citoplasma e si assemblano con l'RNA genomico. Successivamente, esse si fondono con il precursore del virione, che viene trasportato dall'ER attraverso l'apparato di Golgi verso la superficie cellulare, all'interno di piccole vescicole. Infine, i virioni vengono rilasciati dalla cellula infetta tramite esocitosi.

2. Le varianti di SARS-CoV-2

Secondo i dati epidemiologici più recenti, con la diffusione globale della malattia, sono emerse rapidamente diverse varianti genetiche di SARS-CoV-2. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha classificato queste varianti come varianti di preoccupazione ("variant of concern", VOC) e varianti di interesse ("variant of interest", VOI). Le VOC sono varianti che presentano una maggiore trasmissibilità o modificazioni dannose nell'epidemiologia del COVID-19, una maggiore virulenza o cambiamenti nella presentazione clinica della malattia, e/o una ridotta efficacia delle misure di sanità pubblica e sociali, nonché di diagnosi, vaccini e terapie disponibili. Le VOC includono le varianti B.1.1.7 (Alpha), B.1.351 (Beta), P.1 (Gamma) e B.1.617.2 (Delta), che sono diventate varianti di rilevante importanza. Le VOI, invece, sono varianti con mutazioni genetiche previste o note per influenzare le caratteristiche del virus. Un rapporto dell'OMS del settembre 2021 ha incluso tra le VOI le varianti C.37 (Lambda) e B.1.621 (Mu). Le varianti si differenziano principalmente per il numero maggiore di mutazioni, in particolare nella proteina Spike, e presentano distinte proprietà fenotipiche, come un'alterata trasmissibilità e antigenicità.

Variante alpha

La variante Alpha (lignaggio B.1.1.7) è stata scoperta per la prima volta nel novembre 2020 nel Regno Unito [17]. Questa variante è una delle VOC, con un incremento del 50% nella trasmissibilità rispetto al ceppo wild type di SARS-CoV-2. È diventata dominante negli Stati Uniti e in molti paesi europei durante il secondo trimestre del 2021. La variante presenta 14 mutazioni puntiformi non sinonime

e tre delezioni, di cui otto sono localizzate nella proteina Spike. Le mutazioni nella proteina Spike sono state considerate la causa principale della sua alta trasmissibilità [18]. Poiché sfugge alla neutralizzazione degli anticorpi, questa variazione con mutazioni del dominio di legame del recettore (RBD) ha causato ricoveri ospedalieri e aumentato i tassi di mortalità.

Variante beta

La variante Beta, identificata come lignaggio B.1.351, è una delle varianti di SARS-CoV-2 che è stata rilevata per la prima volta in Sud Africa nel maggio 2020, dove ha causato la seconda ondata di infezioni. I Centri statunitensi per il controllo e la prevenzione delle malattie (CDC) hanno riportato che la variante Beta ha una capacità di trasmissione superiore del 50%. Questa variante presenta tre mutazioni nella sua regione RBD: K417N, E484K e N501Y. Altre mutazioni nella proteina Spike includono L18F, D80A, D215G, R264I e A701V. La combinazione delle mutazioni K417N, E484K e N501Y ha portato a una riduzione della risposta anticorpale di diversi anticorpi neutralizzanti e dei vaccini. La diffusione del lignaggio Beta nel mondo è stata del 33% in Europa, seguita dal 25% in Asia, 27% in Africa, 12% nelle Americhe e 3% in Oceania. Dopo oltre un anno, il lignaggio Beta è diventato il secondo più diffuso a livello globale, con una presenza in oltre 90 paesi e regioni. [19]

Variante delta

Secondo i dati e i report dell'OMS di dicembre 2020, l'India ospitava uno dei ceppi di coronavirus più letali. Questo ceppo, conosciuto come variante Delta (B.1.617.2), si è rivelato significativamente più patogeno rispetto ai suoi predecessori. Sono state identificate diverse mutazioni nella proteina Spike della variante Delta, tra cui T19R, L452R, T478K, D614G, P681R e D950N. Oltre alla regione RBD della proteina Spike, anche la zona del dominio N-terminale (NTD) della variante Delta presenta numerose mutazioni degli amminoacidi, una caratteristica che la distingue da altre varianti di preoccupazione (VOC). Sebbene i sintomi della variante Delta siano simili a quelli della variante Alpha, le persone infettate dalla Delta hanno manifestato sintomi più gravi, necessitando di trattamenti intensivi e ricoveri in terapia intensiva [20].

Variante Gamma o P1

La variante Gamma o P1, nota anche come variante brasiliana, è stata segnalata per la prima volta nel novembre 2020 in Brasile. Secondo la ricerca, la variante Gamma deriva da B.1.1.28 [21]. La variante Gamma presenta un insieme unico di mutazioni amminoacidiche nella sua proteina Spike. Tra queste mutazioni si trovano L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, H655Y e T1027I. Mentre le varianti

Alpha e Beta condividono la mutazione N501Y, le varianti Beta e Gamma condividono la mutazione E484K. Studi sulla variante Gamma hanno rivelato che questa è 1,7-2,4 volte più frequente rispetto ad altre varianti in Brasile. Inoltre, la variante Gamma è in grado di causare reinfezioni ed è da 2,521 a 10 volte più trasmissibile rispetto al ceppo wild type, rendendola una delle varianti più trasmissibili tra le VOC di SARS-CoV-2. Il 17 gennaio 2021 è stato scoperto a Sergipe il primo paziente infetto da Gamma. Di conseguenza, tra la fine del 2020 e l'inizio del 2021, questo coronavirus è stato identificato come il più frequente in Brasile. I sintomi nelle varianti Gamma sono simili a quelli dei ceppi precedenti, sebbene l'intensità sia minore [21].

Variante Omicron o B.1.1.529

Il 26 novembre 2021 è stata identificata una nuova variante di SARS-CoV-2, denominata Omicron o B.1.1.529 (variante 21K e BA.1), segnalata per la prima volta in Sudafrica. Omicron è stata osservata inizialmente a Tshwane City, nella provincia di Gauteng, dove è diventata rapidamente la variante dominante, diffondendosi successivamente in altre aree circostanti. Omicron presenta più di 30 mutazioni nella sua proteina Spike, e si prevede che alcune di queste mutazioni, in particolare quelle che coinvolgono le regioni RBD e NTD, possano alterare gli epitopi di neutralizzazione degli anticorpi. Le sottovarianti di Omicron condividono diverse mutazioni comuni, ma presentano anche molte mutazioni uniche. Tra le mutazioni condivise, come E484A, K417N, T478K, N501Y e P681H, molte si trovano anche in altre VOC e sono associate a maggiore trasmissibilità, maggiore affinità per il legame con ACE2 e una più elevata capacità di evadere la risposta anticorpale. Oltre a queste mutazioni comuni, la sottovariante BA.1 presenta altre 13 mutazioni amminoacidiche uniche. I sintomi causati dalla variante Omicron sono simili a quelli delle varianti precedenti, come Alpha, Beta e Delta. [22]. Secondo le ricerche attuali, Omicron è frequente nella fascia di età più giovane. Inoltre, le persone infette da Omicron presentavano un rischio inferiore di ospedalizzazione e mortalità rispetto alle persone infette dalle specie precedenti [23].

Diverse varianti di SARS-CoV-2 sono emerse autonomamente in tutto il mondo, in un contesto di crescente immunità della popolazione. Per ridurre l'impatto VOC e delle VOI sono state adottate varie strategie, molte delle quali continuano a rivelarsi efficaci. Ad esempio, non esistono prove che le attuali misure di prevenzione per la salute pubblica, come l'uso delle mascherine, il distanziamento sociale e l'igiene delle mani, siano inefficaci contro le diverse varianti. Inoltre, diversi anticorpi monoclonali, come il sotrovimab, e agenti antivirali, come il remdesivir e il molnupiravir,

restano attivi contro la maggior parte dei ceppi di SARS-CoV-2 [24]. Tuttavia, la preoccupazione principale potrebbe essere la protezione fornita dai vaccini.

Un'altra possibile soluzione per migliorare la protezione contro le varianti emergenti di SARS-CoV-2, che potrebbero diventare resistenti ai vaccini, è l'introduzione di nuovi vaccini modificati con antigeni efficaci contro le varianti preesistenti. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per capire se i nuovi immunogeni possano stimolare una risposta più ampia e duratura contro le VOC, piuttosto che limitarsi a potenziare gli anticorpi già generati da infezioni precedenti o dalle vaccinazioni attuali. Fino a quando non saranno disponibili ulteriori dati, le migliori strategie per contrastare l'impatto delle varianti emergenti restano la sorveglianza genomica, con la continua condivisione dei dati, le misure di prevenzione per la salute pubblica e una vaccinazione completa, comprensiva di richiami.

3. Trasmissione e manifestazioni cliniche

Il SARS-CoV-2 si trasmette principalmente da persona a persona attraverso le goccioline respiratorie emesse durante la parlata, la tosse o gli starnuti, o tramite il contatto diretto con le mucose nasale, congiuntivale o orale. L'esposizione in ambienti chiusi è generalmente associata a una maggiore efficienza di trasmissione rispetto agli ambienti all'aperto. La trasmissione aerea, che avviene tramite goccioline più piccole che rimangono sospese nell'aria, è stata osservata in ambienti controllati, ma i dati attuali non sono sufficienti per determinare quanto questa modalità di trasmissione influisca nella diffusione del virus. Esiste anche la possibilità di trasmissione tramite fomite, ossia il trasferimento del virus da una superficie inanimata contaminata, poiché il SARS-CoV-2 può rimanere vitale per diversi giorni su superfici come vetro, acciaio inossidabile e plastica. Tuttavia, si ritiene che questa via di trasmissione sia di scarsa rilevanza. Infine, la trasmissione verticale, cioè dal corpo materno al feto durante la gravidanza, sembra essere rara e non è stata collegata a effetti clinici significativi sul feto.

L'infezione da SARS-CoV-2 può manifestarsi con una vasta gamma di segni e sintomi. La principale manifestazione del COVID-19 è la polmonite, spesso accompagnata da una malattia che coinvolge più organi. Tuttavia, l'infezione da SARS-CoV-2 può presentarsi con un ampio spettro di manifestazioni cliniche, che vanno da casi asintomatici a forme più lievi che interessano le vie respiratorie superiori. Si stima che tra il 17,9% e il 33,3% dei pazienti infetti non manifesti alcun sintomo [25]. I sintomi iniziali del COVID-19 possono includere febbre, tosse secca, respiro corto, affaticamento, mialgie, nausea/vomito/diarrea, mal di testa e debolezza. La perdita dell'olfatto (anosmia) e del gusto (ageusia) può essere l'unico sintomo di presentazione in una minoranza di

individui infetti. In base al grado di severità del quadro clinico, che tiene conto dei sintomi, delle alterazioni di laboratorio e radiografiche, dei parametri emodinamici e della funzionalità d'organo, il National Institutes of Health (NIH) ha definito una classificazione del COVID-19 articolata in cinque categorie principali:

- ✓ Infezione asintomatica o presintomatica: riguarda individui risultati positivi al test per SARS-CoV-2 ma che non manifestano alcun sintomo riconducibile alla malattia.
- ✓ Forma lieve: include soggetti con sintomi generali come febbre, tosse, mal di gola, cefalea, mialgia, nausea, vomito, diarrea, perdita dell'olfatto (anosmia) o del gusto (disgeusia), senza tuttavia evidenza di dispnea né alterazioni radiografiche polmonari.
- ✓ Forma moderata: comprende pazienti con segni clinici o radiologici di interessamento delle vie respiratorie inferiori, ma con una saturazione periferica dell'ossigeno (SpO_2) pari o superiore al 94%.
- ✓ Forma grave: caratterizzata da una SpO_2 inferiore al 94%, da un rapporto $PaO_2/FiO_2 < 300$, da una frequenza respiratoria superiore a 30 atti/minuto oppure dalla presenza di infiltrati polmonari che coinvolgono più del 50% del parenchima polmonare.
- ✓ Forma critica: comprende i casi più severi, in cui si osservano insufficienza respiratoria acuta, shock settico o disfunzione multiorgano.

I pazienti con COVID-19 grave possono sviluppare la sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS). La diagnosi di ARDS richiede la presenza di criteri clinici, radiologici e ventilatori. Si presenta tipicamente a distanza di nove-dieci giorni dall'esordio dei primi sintomi e può rappresentare il primo riscontro di insufficienza respiratoria o il peggioramento di una condizione già instauratasi precedentemente [26].

Sulla base dei criteri di Berlino [26] si definiscono tre diverse forme di ARDS:

- Lieve: P/F (rapporto tra PaO_2 e Frazione Inspirata di Ossigeno, FiO_2) compreso tra 300 e 200 mmHg con PEEP (Positive End Expiratory Pressure) o CPAP (Continuous positive airway pressure) ≥ 5 cmH₂O;
- Moderata: P/F compreso tra 200 e 100 mmHg con PEEP o CPAP ≥ 5 cmH₂O;
- Severa: P/F inferiore a 100 mmHg con PEEP o CPAP ≥ 5 cmH₂O.

4. Diagnosi

Una diagnosi precoce e accurata dell'infezione da SARS-CoV-2 è essenziale per la prevenzione e il contenimento della pandemia. L'eterogeneità della presentazione clinica, da individui asintomatici a casi gravi, e la rilevante diversità di manifestazioni cliniche aspecifiche del COVID-19 rafforzano la necessità di test con buona sensibilità e specificità.

- **Rilevamento del gene virale mediante RT-PCR**

La RT-qPCR è considerata il metodo di riferimento (gold standard) per il rilevamento del SARS-CoV-2 ed è attualmente uno dei test più utilizzati in numerosi paesi per lo screening delle popolazioni. Questa tecnica si basa su due reazioni successive: a) la conversione dell'RNA in DNA complementare (cDNA) tramite l'enzima trascrittasi inversa, e b) l'amplificazione del campione di cDNA attraverso la reazione a catena della polimerasi (PCR), utilizzando primer specifici per il gene di interesse e sonde di idrolisi marcate con fluorescenza. Il primo passaggio produce il DNA necessario per il secondo, durante il quale il numero di copie di DNA viene incrementato attraverso cicli termici ripetuti. Le sonde generano segnali fluorescenti ogni volta che una regione genetica viene amplificata con successo, permettendo così una quantificazione accurata della reazione. Sono stati sviluppati test RT-qPCR per amplificare diversi geni, tra cui il gene della RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp), il gene del nucleocapside (N), il gene dell'involucro (E), il gene Spike (S) e le regioni ORF1b o ORF8 del genoma del SARS-CoV-2.

- **Test antigenico rapido**

I test antigenici rapidi sono immunoassays progettati per rilevare la presenza di specifiche proteine virali (come la proteina S, M o N), glicani o acidi nucleici in campioni biologici prelevati tramite tampone oro-nasofaringeo. Questi test si basano sulla presenza di anticorpi specifici su una striscia di membrana, che permettono di individuare la presenza del virus in pochi minuti. Sono in grado di rilevare un'infezione attiva da SARS-CoV-2 in modo rapido ed efficace.

- **Test sierologico**

I test sierologici sono progettati per rilevare anticorpi specifici contro il SARS-CoV-2 in campioni ematici come siero, plasma o sangue intero. Poiché le risposte immunitarie al SARS-CoV-2 di solito compaiono dopo circa 1-2 settimane dall'infezione, questi test hanno una utilità limitata nella diagnosi di SARS-CoV-2 nelle fasi acute della malattia, ma possono essere

utili quando le risposte immunitarie sono già in atto. I test sierologici impiegano frequentemente antigeni ricombinanti per catturare gli anticorpi diretti contro il virus, come la proteina N o il dominio di legame al recettore (RBD) della subunità S1 della glicoproteina Spike. I metodi sierologici possono essere indirizzati a uno o più isotipi di immunoglobuline, come IgA, IgM e IgG. In particolare, IgM e IgG sono le immunoglobuline più comunemente rilevate nei test sierologici per SARS-CoV-2, mentre il rilevamento di IgA è meno comune.

5. Immunopatogenesi

Anche se diversi studi osservazionali hanno indicato che l'età avanzata e la presenza di comorbilità sono fattori di rischio per una malattia grave nei pazienti affetti da COVID-19, è ormai evidente che anche individui più giovani, privi di condizioni mediche preesistenti, possono sviluppare forme gravi della malattia. Alti livelli di marcatori infiammatori nel sangue, come proteina C-reattiva, ferritina e D-dimeri, un aumento del rapporto neutrofili/linfociti e un innalzamento dei livelli sierici di varie citochine e chemochine infiammatorie sono stati correlati con una maggiore gravità della malattia e con esiti letali. I profili citochinici sistemici riscontrati nei pazienti con forme gravi di COVID-19 presentano somiglianze con quelli tipici delle sindromi da rilascio di citochine, come la sindrome da attivazione macrofagica. In particolare, si osserva un aumento nella produzione del fattore stimolante le colonie granulocito-macrofagiche (GM-CSF), delle citochine IL-6, IL-7, TNF α , IFN γ , IL-1 β , IP-10, nonché delle chemochine infiammatorie come CCL2, CCL3, CXCL10 e della forma solubile della catena α del recettore dell'IL-2[27]. Ciò ha portato all'ipotesi che l'attivazione disregolata dei fagociti mononucleati (MNP) contribuisca all'iperinfiammazione associata al COVID-19.

Diversi meccanismi contribuiscono all'attivazione esagerata dei macrofagi e all'instaurarsi dello storm citochinico osservato in COVID-19 (Figura 4).

Gli pneumociti rappresentano uno dei principali target del virus SARS-CoV-2. L'intensa replicazione virale all'interno di queste cellule provoca una marcata distruzione cellulare (citólisi), accompagnata dal rilascio di numerose molecole associate al danno tra cui ATP, acidi nucleici e mediatori infiammatori come citochine e chemochine. Questi mediatori, a loro volta, stimolano l'attivazione dei macrofagi, amplificando la risposta infiammatoria locale.

Diversi meccanismi contribuiscono all'eccessiva attivazione macrofagica osservata nei polmoni dei pazienti con COVID-19. Uno di questi è il ritardo nella produzione di interferoni di tipo I da parte delle cellule epiteliali alveolari e di altre cellule immunitarie residenti, che favorisce la chemiotassi

dei monociti dal circolo sanguigno al tessuto polmonare. Una volta infiltrati, questi monociti si differenziano in macrofagi pro-infiammatori, responsabili della secrezione di ulteriori mediatori dell'infiammazione. Le cellule T attivate e le cellule natural killer (NK) contribuiscono a potenziare questa cascata infiammatoria, rilasciando citochine come GM-CSF, TNF- α e IFN γ , che mantengono l'attivazione dei macrofagi. Allo stesso tempo, i fosfolipidi ossidati (OxPLs) generati dai radicali liberi dell'ossigeno (ROS) durante la flogosi si accumulano nel parenchima polmonare, dove attivano ulteriormente i macrofagi attraverso la via di segnalazione TLR4-TRAF6-NF- κ B. Il riconoscimento dell'RNA virale a singolo filamento da parte del recettore TLR7 nei macrofagi induce un'ulteriore risposta infiammatoria, mentre l'infezione virale stessa stimola l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3, che promuove la secrezione delle citochine IL-1 β e IL-18. In particolare, l'IL-1 β può rinforzare l'attivazione macrofagica sia in maniera autocrina che paracrina. Infine, l'interazione tra gli anticorpi IgG diretti contro la proteina Spike e i recettori Fc γ (Fc γ Rs) presenti sui macrofagi può contribuire a una risposta infiammatoria secondaria, aggravando il danno tissutale.

Nel complesso, questi eventi determinano una iper-attivazione dei macrofagi derivati dai monociti circolanti, con rilascio massivo di citochine pro-infiammatorie e instaurazione del caratteristico "storm citochinico" osservato nelle forme più severe di COVID-19 [28].

I mediatori rilasciati nel microambiente infiammatorio favoriscono il reclutamento di nuovi monociti e linfociti T nel sito dell'infezione, generando un feedback pro-infiammatorio che amplifica sia l'accumulo di cellule immunitarie sia la secrezione di ulteriori citochine infiammatorie.

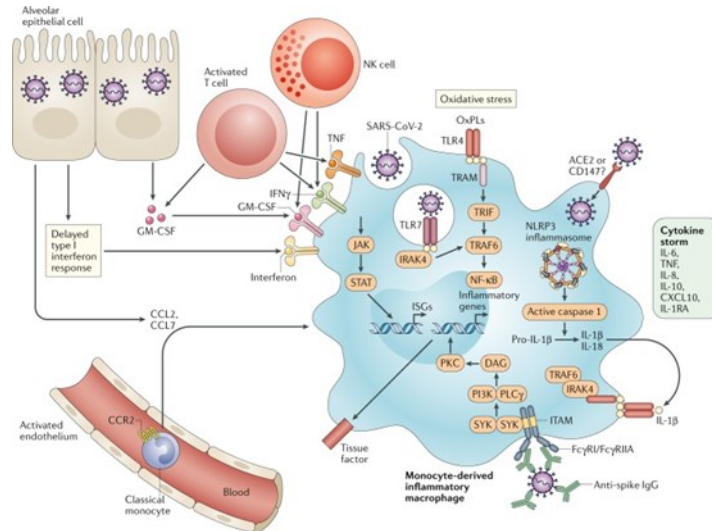


Figura 4. Ruolo dei macrofagi in COVID-19. Diversi meccanismi contribuiscono all'iperattivazione dei macrofagi derivati dai monociti che si osserva nei pazienti affetti da COVID-19. La figura riporta un ruolo da parte dei mediatori prodotti dalle cellule alveolari infettate, di quelli rilasciati da cellule T e NK, degli OxPLs, delle porzioni Fc delle immunoglobuline IgG leganti porzioni virali e delle stesse componenti del virus che attivano l'inflammosoma. Da [28]

Le citochine sono piccole proteine (circa 5-25 kDa) che svolgono un ruolo cruciale nella segnalazione cellulare e sono fondamentali per la regolazione dello sviluppo e dell'attività delle cellule del sangue e del sistema immunitario. Questi mediatori immunologici sono agenti immunomodulatori che vengono espressi in modo transitorio in risposta a stimoli, e partecipano a meccanismi di segnalazione autocrini, paracrini ed endocrini. Le citochine influenzano una vasta gamma di processi biologici, come la riparazione dei tessuti danneggiati, lo sviluppo e la progressione del cancro, il controllo della replicazione cellulare e la regolazione della morte cellulare. Inoltre, sono essenziali nella comunicazione tra le cellule del sistema immunitario, contribuendo a coordinarne la risposta in situazioni di infiammazione o infezione. Quando necessario, le citochine vengono rapidamente secrete dalle cellule e modulano le funzioni immunologiche, influenzando la risposta infiammatoria e l'attivazione o inibizione di specifici tipi di cellule immunitarie.

- **IL-6:** è una glicoproteina appartenente alla famiglia delle citochine, che gioca un ruolo chiave in vari processi fisiologici e patologici. È anche nota come "fattore stimolante gli epatociti" o "fattore stimolante le cellule B", ed è prodotta da molteplici tipi di cellule, tra cui linfociti T e B, monociti/macrofagi, fibroblasti, cellule dendritiche e cellule endoteliali.

Le concentrazioni plasmatiche di IL-6 aumentano significativamente in diverse condizioni patologiche, come lo shock settico, traumi gravi, ustioni e malattie infiammatorie. Come citochina pleiotropica, l'IL-6 ha molteplici effetti biologici, che includono:

differenziazione dei linfociti B, aumento della produzione di piastrine. Inoltre, l'IL-6 stimola gli epatociti nel fegato a produrre proteine di fase acuta, tra cui la proteina C reattiva (PCR) e fibrinogeno, due marcatori chiave di infiammazione.

- **TNF α** : Il fattore di necrosi tumorale (TNF α) è una citochina proinfiammatoria che può essere prodotta da diverse tipologie di cellule, tra cui macrofagi, cellule T, mastociti, cellule muscolari lisce e cellule epiteliali. La sua sintesi può essere attivata da modelli molecolari associati a patogeni, nonché dall' IL-1 β , tramite l'attivazione di NF- κ B. Il TNF α appartiene a una famiglia di citochine che giocano un ruolo centrale nella reazione di fase acuta. La funzione principale del TNF α è regolare l'attività delle cellule del sistema immunitario, influenzando numerosi processi biologici.

In quanto pirogeno endogeno, il TNF α è capace di indurre febbre, promuovere l'apoptosi delle cellule, provocare cachessia (perdita di peso e atrofia muscolare), e contribuire alla risposta infiammatoria. Inoltre, il TNF α è coinvolto nel blocco della carcinogenesi, ostacolando la crescita delle cellule tumorali, e nella replicazione virale.

Nel contesto della sepsi, il TNF α risponde stimolando la produzione di altre citochine importanti, come IL-1 β e IL-6, che amplificano la risposta infiammatoria sistemica.

- **IL-1 β** : è una citochina pleiotropica prodotta da monociti/macrofagi, cellule dendritiche, neutrofili, fibroblasti sinoviali e linfociti B. È stato dimostrato che l'IL-1 β induce la sintesi di IL-6 [29] e la sintesi della cicloossigenasi e dell'ossido nitrico sintetasi inducibile (iNOS). Inoltre, l'IL-1 β potrebbe incrementare l'espressione di chemochine e molecole di adesione, specialmente nelle cellule endoteliali e mesenchimali, favorendo così l'infiltrazione delle cellule immunitarie nei tessuti danneggiati. Inoltre, poiché stimola il midollo osseo, l'IL-1 β promuove un aumento del numero delle cellule progenitrici mieloidi e il rilascio di neutrofili, determinando una condizione di neutrofilia.
- **IFN γ** : l'IFN γ è una citochina proinfiammatoria cruciale nel contrastare i patogeni intracellulari e nel controllo delle neoplasie. Come parte della risposta immunitaria, l'IFN γ viene prodotto dalle cellule natural killer. Nelle fasi iniziali dell'immunità adattativa specifica per l'antigene, l'IFN γ può essere rilasciato dalle cellule T effettrici derivanti dalle cellule Th1 CD4 e dai linfociti T citotossici CD8. L'IFN γ svolge un ruolo essenziale nel riconoscimento e

nell'eliminazione dei patogeni. In quanto principale effettore dell'immunità cellulo-mediata, l'IFN γ è in grado di coordinare numerose funzioni antimicrobiche. Può potenziare la presentazione dell'antigene da parte delle cellule presentanti l'antigene (APC), migliorando l'interazione con le cellule T, incrementare la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e di intermedi reattivi dell'azoto (RNI), oltre a stimolare risposte antivirali. Inoltre, l'IFN γ ha la capacità di distruggere le cellule tumorali inducendo uno stato antiproliferativo.

- **GM-CSF:** il GM-CSF (Fattore stimolante le colonie di granulociti-macrofagi), noto anche come CSF2, è una citochina e chemochina proinfiammatoria appartenente alla superfamiglia del CSF. Si tratta di una glicoproteina monomerica che viene prodotta da macrofagi, linfociti T, mastociti, cellule NK, cellule endoteliali e fibroblasti. Sebbene inizialmente fosse considerato un fattore di crescita emopoietico, oggi si riconosce che il GM-CSF riveste un ruolo cruciale nella comunicazione tra linfociti che penetrano nei tessuti e cellule mieloidi, stimolando la produzione di citochine e chemochine proinfiammatorie, come IL-1 β , IL-6 e TNF α [30]. Può inoltre indurre una maggiore espressione di proteine di fase acuta e attivare le risposte dei linfociti Th17 [31].
- **Chemochine:** Le chemochine sono una famiglia di proteine a basso peso molecolare espresse, sia costitutivamente che in modo inducibile, da diversi tipi di cellule. Svolgono un ruolo importante nella risposta infiammatoria attraendo i leucociti verso i siti di infezione. Queste piccole proteine contribuiscono anche alla circolazione dei leucociti attraverso i tessuti [32]. Attualmente sono state riconosciute e classificate 50 chemochine e 20 recettori per le chemochine. Sono denominate secondo la nomenclatura più recente, che le classifica in base alla loro struttura chimica, nelle famiglie C, CC, CXC e CX3C [33]. Il legame delle chemochine ai loro recettori è responsabile della loro capacità chemioattrattiva. I recettori per le chemochine appartengono ai recettori accoppiati a proteine G che attraversano sette membrane, che sono espressi principalmente sui leucociti ma anche su altre cellule, ad esempio le cellule endoteliali [34]. Le numerose funzioni delle chemochine includono il controllo della proliferazione e della differenziazione cellulare, la regolazione dell'angiogenesi e delle risposte immunitarie e infiammatorie, la crescita del tumore e le metastasi [35].

Il corpo richiede un equilibrio omeostatico dei livelli di citochine. Tuttavia, livelli eccessivi e un'omeostasi perturbata delle citochine potrebbero danneggiare il sistema ospite. Lo storm

citochinico deriva dall'effetto combinato di numerose molecole immunoattive. Interferoni, interleuchine, chemochine, fattori stimolanti le colonie (CSF) e TNF α rappresentano i principali componenti coinvolti nello sviluppo della tempesta citochinica.

6. La disfunzione polmonare

Il coinvolgimento polmonare rappresenta una delle manifestazioni più comuni dell'infezione da COVID-19. Nella maggioranza dei casi, i sintomi respiratori rimangono di entità lieve o moderata; tuttavia, in una minoranza di pazienti, generalmente dopo circa una settimana dall'esordio dei sintomi, si osserva una progressione verso una polmonite interstiziale severa, che può evolvere nella sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS). I soggetti più a rischio di sviluppare questa complicanza sono gli anziani, in particolare coloro che superano i 60 anni di età, e i pazienti affetti da patologie croniche preesistenti (cardiovascolari, metaboliche o respiratorie). Le evidenze cliniche indicano che le forme gravi di COVID-19 si associano frequentemente alla comparsa di ARDS, la quale costituisce una delle principali cause di mortalità nei pazienti critici. In questa condizione, il danno polmonare diffuso coinvolge sia le cellule epiteliali alveolari sia le cellule endoteliali capillari, con conseguente compromissione della barriera alveolo-capillare. L'aumento della permeabilità vascolare e la riduzione della compliance polmonare ostacolano il normale scambio gassoso, determinando una grave ipossiemia e una marcata difficoltà respiratoria, caratteristiche distintive della fase avanzata della malattia.

Meccanismi patogenetici della disfunzione polmonare

I recettori ACE2 sono presenti in modo diffuso in tutto il corpo, ma la loro concentrazione è particolarmente alta nell'endotelio vascolare polmonare e nel tratto respiratorio. Pertanto, le prime cellule a essere infettate dal SARS-CoV-2 dopo l'inalazione sono quelle localizzate nel rinofaringe e nelle vie aeree superiori, come le cellule multiciliate e le cellule di supporto della mucosa olfattiva. Se il sistema immunitario dell'ospite non è in grado di eliminare rapidamente l'infezione da SARS-CoV-2, il virus si diffonde verso il tratto respiratorio inferiore, sia tramite aspirazione delle particelle virali provenienti dall'orofaringe, sia per un'infezione progressiva che percorre l'albero tracheobronchiale. In alcuni casi, il virus può evitare del tutto il tratto respiratorio superiore e colpire direttamente le vie aeree inferiori [36]. Una volta che il SARS-CoV-2 raggiunge gli alveoli, il virus attacca principalmente le cellule alveolari di tipo 2 (AT2). In condizioni normali, queste cellule hanno il compito di produrre il surfattante polmonare e di rigenerare le cellule AT1, che rappresentano la maggior parte dell'epitelio alveolare [37].

È stato inoltre dimostrato che l'iperattivazione della risposta immunitaria innata, causata dall'infezione virale nelle membrane respiratorie, gioca un ruolo cruciale nello sviluppo dell'ARDS iperinflammatoria [38]. Come in altre infezioni virali, la risposta immunitaria innata contro il SARS-CoV-2 viene attivata dal riconoscimento degli agenti patogeni e dei loro modelli molecolari associati (PAMP). Questi vengono identificati dai recettori di riconoscimento dei modelli (PRR), come i recettori Toll-like 3, 7 e 8 (TLR3, TLR7, TLR8), che si trovano sulle cellule epiteliali delle vie respiratorie, sui macrofagi residenti nei tessuti e sulle cellule dendritiche [39]. Queste cellule danno avvio alla risposta infiammatoria polmonare, principalmente attraverso una sovraregolazione degli interferoni di tipo I e dei geni stimolati dall'interferone (ISG), un processo che risulta particolarmente marcato nelle fasi iniziali della malattia, caratterizzate da una carica virale elevata [40]; la risposta antivirale mediata dall'IFN di tipo I sembra essere cruciale per la gravità del COVID-19 [41]. Questa risposta infiammatoria può esacerbare il danno epiteliale ed endoteliale, in particolare interferendo con le giunzioni di adesione cellulare, come nel caso della VE-caderina. Ciò comporta un indebolimento dei legami tra le cellule endoteliali, aumentando la permeabilità vascolare, un fenomeno distintivo della fase essudativa dell'ARDS [42].

In effetti, l'edema polmonare e la capillarostasi sono tra i cambiamenti microscopici più frequentemente osservati nel COVID-19, e il gene CDH5, che codifica per la VE-caderina, è uno dei geni che risulta essere sottoregolato. Inoltre, la capacità dei pneumociti di assorbire il fluido in eccesso dallo spazio alveolare attraverso il trasporto attivo del sodio è compromessa, aggravando ulteriormente l'edema [43]. L'edema contribuisce alla formazione della membrana ialina nel contesto del danno alveolare diffuso (DAD), una caratteristica tipica di questa condizione. Questo processo è seguito da iperplasia degli pneumociti di tipo 2, segnando l'inizio della fase proliferativa del DAD [42]. Pertanto, gli pneumociti diventano funzionalmente compromessi nella produzione di surfattante [44] oltre ad essere ulteriormente gravemente compromessi dall'infezione da SARS-CoV-2.

Inoltre, il danno o la morte delle cellule alveolari causano la rottura dell'epitelio alveolare, innescando così uno squilibrio tra l'attivazione della coagulazione e la fibrinolisi [45]. Il SARS-CoV-2 stimola l'inflammasoma NLPR3 con conseguente produzione di interleuchina IL-1- β e IL-18 [46] e contemporaneamente si verifica un aumento del rilascio di IL-6 dall'epitelio alveolare che a sua volta stimola la produzione di fattori di coagulazione a livello epatico e del fattore tissutale (TF) nell'endotelio [45]. Inoltre, i neutrofili attivati rilasciano trappole extracellulari dei neutrofili (NET),

che attivano direttamente il fattore XII e legano il fattore di von Willebrand per promuovere il reclutamento delle piastrine [46]. Gli istoni NET e i frammenti del complemento C3a e C5a attivano le piastrine, mentre l'elastasi neutrofila e la mieloperossidasi inattivano le molecole anticoagulanti [46]. Le piastrine associate a NET attivano il pathway intrinseco della coagulazione e rilasciano grandi quantità di citochine pro-infiammatorie (Figura 5).

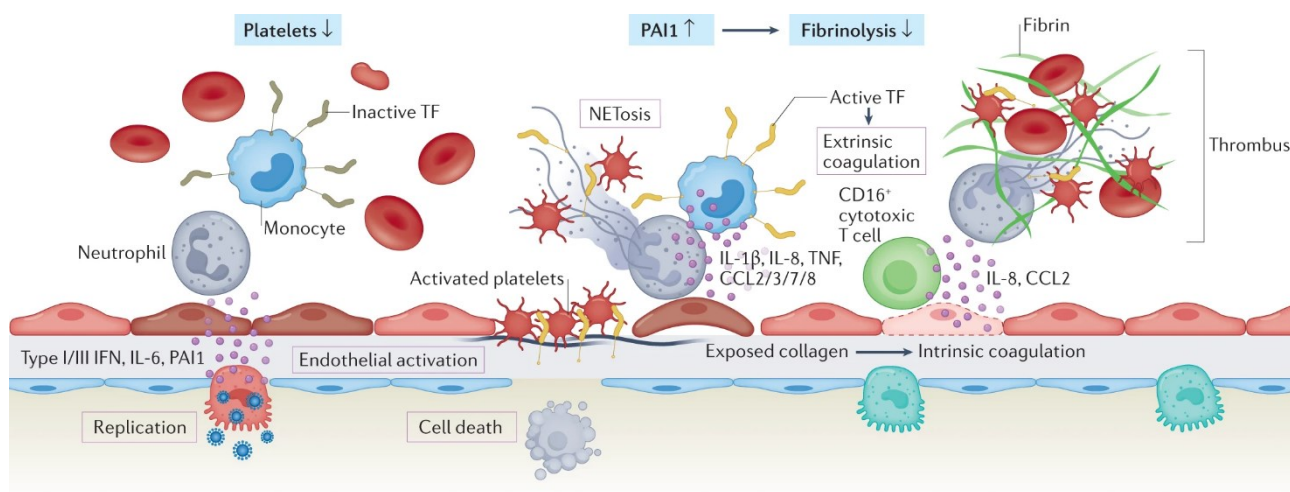


Figura 5. Meccanismi patogenetici del danno polmonare. La malattia grave da coronavirus 19 è caratterizzata da ipercoagulabilità e ipofibrinolisi mediate dalle cellule immunitarie. Ipossia, citochine, chemochine, profili molecolari associati al danno e infezione diretta da parte del virus contribuiscono alla morte delle cellule alveolari ed endoteliali e alla rottura della barriera alveolo-capillare. Da [45]

In aggiunta, i meccanismi sopra descritti (paragrafo 5) attivano i macrofagi che rilasciano grandi quantità di citochine pro-infiammatorie, contribuendo alla formazione dello storm citochinico. I mediatori prodotti attirano ulteriori monociti e cellule T nel sito dell'infezione generando un meccanismo di feedback pro-infiammatorio che comporta l'accumulo di altre cellule infiammatorie e produzione di ulteriori citochine che, a livello del polmone, contribuiscono a danneggiarne l'infrastruttura. In particolare, la produzione di TNF-α induce l'apoptosi delle cellule epiteliali ed endoteliali polmonari, determinando il danneggiamento della barriera alveolo-capillare e provocando alterazioni della parete vascolare associate a edema [47]. Inoltre, in seguito al danno tissutale, citochine come IL-6, IL-1β e TNF-α stimolano l'endothelium polmonare a esprimere molecole di adesione cellulare (CAM) e il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF). Tali processi

favoriscono uno stato di ipercoagulabilità e agevolano la disseminazione del virus verso altri organi che presentano il recettore ACE2. [48].

Infine, un ulteriore fattore che contribuisce al danno polmonare è la disfunzione del sistema renina-angiotensina-aldosterone, conseguente alla ridotta espressione di ACE2 dopo l'ingresso del virus nelle cellule. La diminuzione di ACE2 sulla membrana cellulare provoca uno squilibrio tra ACE e ACE2, determinando un accumulo di angiotensina II. Quest'ultima, legandosi al recettore ATR1, aumenta la permeabilità vascolare e promuove il danno ai tessuti, peggiorando le lesioni polmonari [47].

Dunque, un primo meccanismo patogenetico legato all'infezione da SARS-CoV-2 sembra essere il risultato degli effetti citopatici diretti mediati dal virus, che si esplicano soprattutto a carico delle cellule dell'epitelio alveolare e dell'endotelio respiratorio. Parallelamente, svolgono un ruolo cruciale nella patogenesi anche i meccanismi immunomediati riconducibili all'attivazione di cellule dell'immunità sia innata che adattativa [49].

Associazione tra COVID-19 e ARDS: CARDS

La sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS) rappresenta una forma grave di insufficienza respiratoria non dovuta a cause cardiogene, che insorge come conseguenza di numerose patologie in grado di determinare un accumulo di liquidi negli alveoli polmonari. Tale condizione compromette lo scambio gassoso, riducendo la quantità di ossigeno disponibile nel sangue.

L'insufficienza respiratoria si verifica quando il sistema respiratorio non è più in grado di mantenere livelli adeguati di ossigeno nel sangue o di eliminare efficacemente l'anidride carbonica (CO₂).

Il quadro clinico dell'ARDS è stato identificato per la prima volta nel 1967, in pazienti con grave cianosi refrattaria che necessitavano di ventilazione meccanica. Da allora, i criteri diagnostici sono stati oggetto di numerosi aggiornamenti e oggi si riconosce come elemento essenziale la presenza di opacità bilaterali alla radiografia o alla tomografia computerizzata del torace, non spiegabili da cause cardiache o da versamento pleurico.

La classificazione di gravità dell'ARDS si basa sul rapporto tra la pressione arteriosa di ossigeno (PaO₂) e la frazione inspirata di ossigeno (FiO₂):

- Lieve: PaO₂/FiO₂ tra 200 e 300 mmHg;
- Moderata: tra 100 e 200 mmHg;
- Grave: inferiore a 100 mmHg.

Dal punto di vista eziologico, si distinguono due principali categorie di fattori scatenanti:

- Cause dirette (o polmonari), come polmonite, aspirazione di materiale gastrico, contusione polmonare o inalazione di sostanze tossiche.
- Cause indirette (o extrapolmonari), tra cui la sepsi, responsabile di una risposta infiammatoria sistemica con danno secondario al tessuto polmonare.

Indipendentemente dall'agente causale, la sindrome è caratterizzata da un danno diffuso alla membrana alveolo-capillare (DAD), che determina un edema polmonare non cardiogenico ricco di proteine e una conseguente insufficienza respiratoria acuta (ARF). La perdita di integrità della barriera alveolare consente la fuoriuscita di fluidi e cellule infiammatorie negli spazi interstiziali e alveolari. Parallelamente, la riduzione del surfattante polmonare — sostanza fondamentale per mantenere gli alveoli espansi — provoca collasso alveolare (atelettasia) e grave compromissione dello scambio gassoso.

Il risultato è un quadro di ipossiemia severa, che può associarsi a una risposta infiammatoria sistemica con coinvolgimento di altri organi (rene, cuore, tratto gastrointestinale). La suscettibilità alle sovrainfezioni batteriche, in particolare alle polmoniti secondarie, rappresenta una complicanza frequente.

L'ossigenoterapia e la ventilazione meccanica costituiscono gli elementi fondamentali del trattamento. La sopravvivenza varia tra il 60% e il 75%, a seconda della gravità del danno e della tempestività dell'intervento. Tuttavia, i pazienti sottoposti a ventilazione prolungata possono sviluppare fibrosi polmonare, con conseguente riduzione cronica della funzione respiratoria.

Durante la pandemia da SARS-CoV-2, è emersa una forma particolare di ARDS definita CARDS (COVID-19-related ARDS). In questi pazienti, il danno polmonare è amplificato da infiammazione endoteliale, edema alveolare e tendenza alla trombosi microvascolare. Il rilascio massivo di citochine proinfiammatorie contribuisce alla progressione del danno tissutale e alla disfunzione multiorgano.

Nel decorso dell'ARDS si distinguono tre fasi principali:

1. Essudativa precoce, caratterizzata da danno alveolare diffuso e aumento della permeabilità capillare (Figura 6).
2. Proliferativa, che si manifesta dopo 7–14 giorni e comporta rigenerazione cellulare e proliferazione dei fibroblasti.

3. Fibrotica, presente solo in alcuni pazienti, contraddistinta da infiammazione cronica e formazione di tessuto cicatriziale che compromette la funzionalità polmonare (Figura 7).

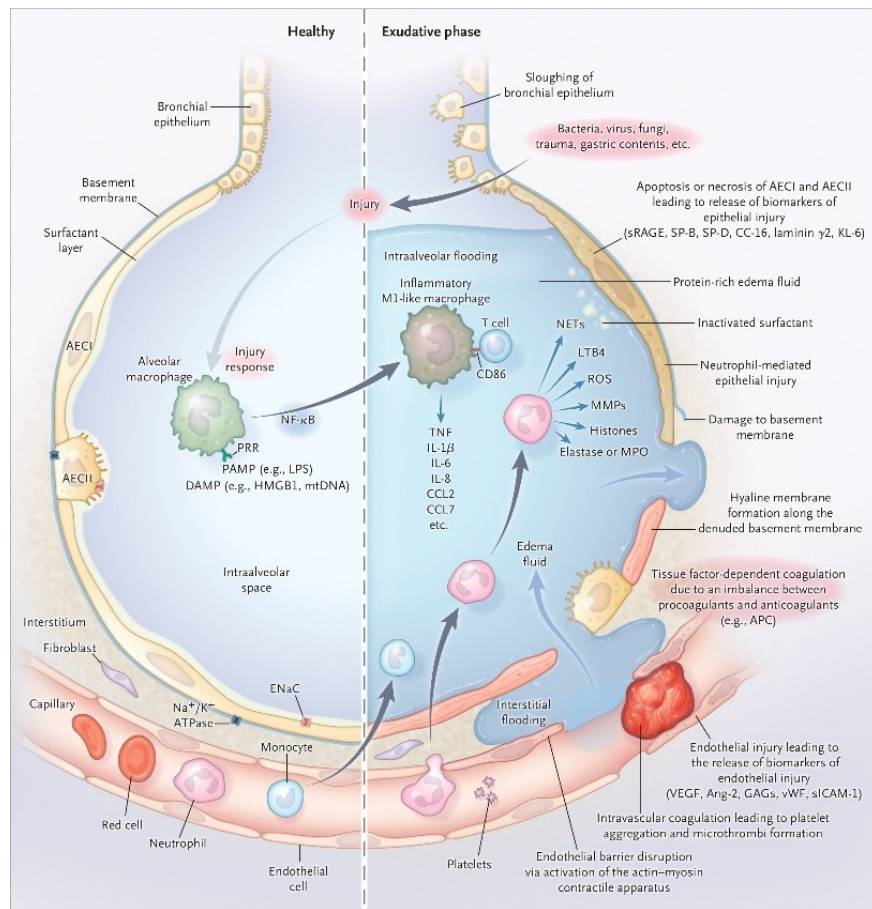


Figura 6. Danno della barriera epiteliale-endoteliale alveolare con rilascio di biomarcatori di danno e conseguente edema dei compartimenti alveolari e interstiziale. Da [50]

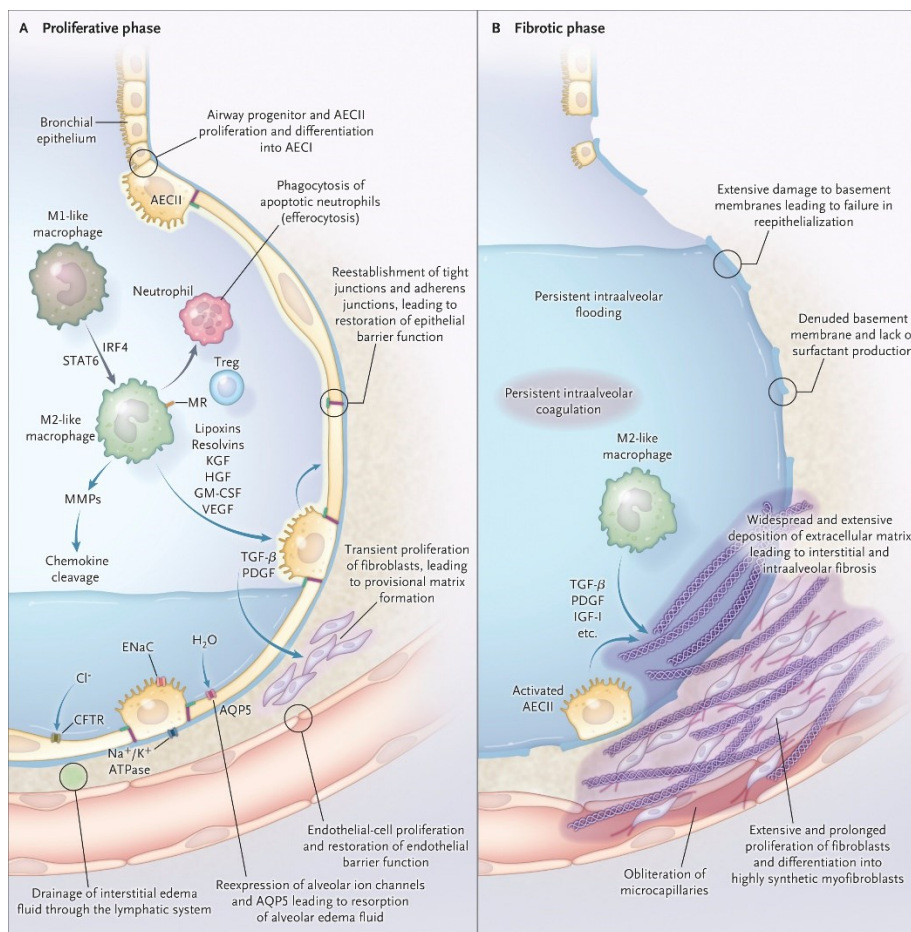


Figura 7. Riparazione della lesione tramite processi di ricostituzione della barriera epiteliale-endoteliale e drenaggio dei liquidi. Il danno esteso porta all'induzione di processi di riparazione con formazione di tessuto fibroso cicatriziale polmonare. Da [50]

Sebbene sia ormai riconosciuto che l'infezione da SARS-CoV-2 aumenti il rischio di coagulopatie e di eventi tromboembolici rispetto alle forme classiche di ARDS, i meccanismi fisiopatologici che determinano l'esordio e la progressione della sindrome non sono ancora completamente definiti. Un ruolo di primo piano sembra spettare alla risposta infiammatoria sistemica eccessiva, la tempesta citochinica. L'elevata concentrazione di queste molecole è stata messa in relazione con la gravità del quadro clinico nei pazienti affetti da COVID-19.

A livello polmonare, l'infezione virale provoca un'intensa infiammazione alveolare, che coinvolge diverse popolazioni cellulari del sistema immunitario, in particolare linfociti T, cellule natural killer, neutrofili e macrofagi. Durante la fase acuta, la barriera alveolo-capillare subisce un danno diffuso che ne aumenta la permeabilità, consentendo l'accumulo di liquidi e cellule infiammatorie negli spazi alveolari. Questo processo determina vasocostrizione dei capillari polmonari, perdita del surfattante

con conseguente atelettasia e una marcata riduzione della compliance polmonare, fattori che contribuiscono al grave deficit di ossigenazione tipico dell'ARDS da COVID-19.

7. La disfunzione endoteliale

Sebbene gli pneumociti rappresentino il principale target del SARS-CoV-2, è ormai riconosciuto che la disfunzione endoteliale svolge un ruolo determinante nella patogenesi delle forme gravi di COVID-19. [51]. Un'analisi condotta su un campione di 5.700 pazienti ospedalizzati per COVID-19 ha mostrato come le patologie concomitanti più comuni fossero ipertensione arteriosa, obesità e diabete mellito. Poiché tali condizioni condividono una condizione di disfunzione endoteliale cronica, questi risultati supportano l'ipotesi che il SARS-CoV-2 eserciti i suoi effetti patogeni non solo a livello epiteliale, ma anche a carico delle cellule endoteliali [52]. Le analisi post-mortem condotte su pazienti deceduti per COVID-19 hanno evidenziato la presenza di trombi nei vasi polmonari e una significativa alterazione dei meccanismi dell'emostasi, accompagnata da livelli plasmatici elevati di fattore di von Willebrand (vWF) e D-dimero. Questi markers, insieme ad altri, segnalano un aumento del rischio di Coagulazione Intravascolare Disseminata (CID). La CID, riportata in circa il 70% dei pazienti deceduti, si manifesta con la formazione diffusa di microtrombi nei vasi di piccolo calibro, ostacolando il flusso sanguigno e contribuendo al danno tissutale.

Resta oggetto di dibattito se le profonde alterazioni dell'omeostasi vascolare derivino direttamente dall'infezione delle cellule endoteliali da parte del SARS-CoV-2 o siano il risultato secondario di una risposta infiammatoria sistemica. Il modello patogenetico attualmente più accreditato propone che entrambe le vie — l'infezione diretta e gli effetti dell'infiammazione sistemica — concorrano allo sviluppo del danno endoteliale.

Rimane controversa la reale capacità del virus di infettare direttamente l'endotelio; tuttavia, studi clinici e post-mortem hanno documentato la presenza di particelle virali nelle cellule endoteliali, suggerendo che il SARS-CoV-2 possa indurre endotelite in diversi organi sia attraverso il contatto diretto con le cellule sia mediante la risposta infiammatoria dell'ospite [53]. Tuttavia, nell'endotelio sono stati rilevati livelli molto bassi o assenti del recettore ACE2 [54]; risultano invece abbondantemente espressi nelle cellule endoteliali polmonari e olfattive co-recettori come la neuropilina-1 (NRP1) e la neuropilina-2 (NRP-2) [55]. È plausibile, dunque, che il SARS-CoV-2 interagisca direttamente con le cellule endoteliali, provocando una compromissione della barriera endoteliale, un aumento della permeabilità vascolare, danno cellulare e induzione di apoptosi (Figura 8).

Questi eventi contribuiscono all'attivazione della risposta immunitaria, stimolando il rilascio di numerose citochine pro-infiammatorie, e favoriscono un microambiente locale altamente infiammatorio [56]. Parallelamente, il danno endoteliale stimola il rilascio del Tissue Factor (TF) e l'esposizione del fattore di von Willebrand (vWF), promuovendo l'attivazione della cascata coagulativa e la produzione di trombina.

Anche i meccanismi immuno-mediati sono coinvolti nella disfunzione endoteliale osservata nel COVID-19 (Figura 8). In particolare, la proteina nucleocapside del virus può attivare indirettamente MASP-2, una serin-proteasi della via della lectina del complemento, provocando una risposta eccessiva del sistema e aggravando il danno polmonare. A supporto di questa teoria, nei pazienti con forme gravi di COVID-19 — a differenza di quelli con forme lievi — è stato rilevato un aumento dei livelli plasmatici del frammento C5a, quest'ultimo facilita la formazione del complesso di attacco alla membrana (MAC, C5b-C9), che può determinare la lisi delle cellule endoteliali. La via classica del complemento può contribuire ulteriormente al danno: gli immunocomplessi formati da antigeni virali e anticorpi attivano la proteina C1, intensificando la risposta infiammatoria.

Un ruolo chiave nella disfunzione endoteliale è esercitato dall'iperattivazione della risposta infiammatoria, con elevati livelli di IL-6 e TNF- α . L'IL-6 aumenta la permeabilità vascolare e stimola le cellule endoteliali a produrre ulteriori citochine, amplificando l'infiammazione. Il TNF- α , invece, attiva enzimi come la glucuronidasi e la ialuronano sintasi 2, favorendo la degradazione del glicocalice e la deposizione di acido ialuronico nella matrice extracellulare.

Sotto l'effetto combinato di TNF- α e IL-1 β , le cellule endoteliali mostrano una maggiore espressione di molecole di adesione (come la P-selectina) e rilasciano fattori pro-coagulanti come il vWF e il fibrinogeno, facilitando l'interazione con le piastrine. Le piastrine attivate secernono VEGF (fattore di crescita endoteliale vascolare), che stimola ulteriormente l'espressione di Tissue Factor da parte dell'endotelio, innescando la cascata coagulativa e promuovendo la formazione di fibrina e trombi nei vasi.

È stato anche ipotizzato che la riduzione dell'attività di ossido nitrico sintasi endoteliale (NOS3), responsabile della produzione di ossido nitrico e mediatore chiave della vasodilatazione, contribuisce ulteriormente alla compromissione della funzione vascolare.

Infine, i neutrofili infiltrati e attivati rilasciano quantità significative di mediatori tossici, tra cui specie reattive dell'ossigeno e NETs (Neutrophil Extracellular Traps), osservate nei microtrombi arteriosi nei polmoni di pazienti deceduti per COVID-19.

Questi meccanismi portano al danno e alla morte delle cellule endoteliali, con conseguente esposizione della membrana basale, elevato potenziale trombogenico e attivazione della cascata coagulativa. Ne derivano un intenso stato infiammatorio, formazione di trombi nei piccoli vasi, edema vascolare e fenomeni emorragici, tipici dell'interessamento polmonare nei pazienti con COVID-19. Le cellule immunitarie attivate, le citochine e i fattori della coagulazione contribuiscono a intensificare la risposta trombotica, che può evolvere in coagulazione intravascolare disseminata (CID), tromboembolia venosa e embolia polmonare.

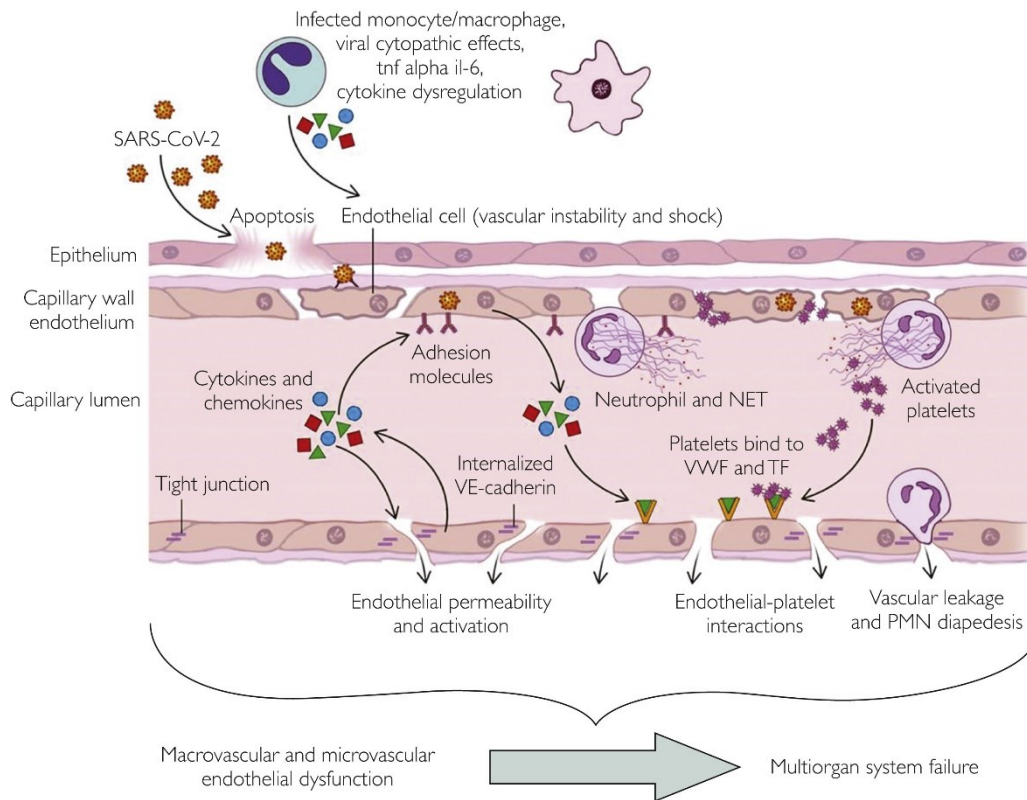


Figura 8. Pathways attivi nella disfunzione endoteliale in COVID-19. Il virus può infettare le cellule endoteliali ed i monociti provocando effetti citopatici, aumento dei livelli di citochine, tra cui IL-6 e TNF α , disregolazione delle citochine, causare attivazione piastrinica e alterazioni nel legame piastrinico, nella permeabilità vascolare, può generare interazioni piastriniche endoteliali che possono a loro volta causare disfunzione endoteliale diffusa, tempesta di citochine, aumento della risposta immunitaria e coinvolgimento di sistemi multiorgano e potenziale insufficienza. Da: [57]

SCOPO DELLO STUDIO

I meccanismi patogenetici alla base della risposta iperinfiammatoria che contribuisce al danno epiteliale alveolare ed endoteliale rimangono ad oggi solo parzialmente compresi.

Diverse evidenze di letteratura indicano che il sistema immunitario reagisce all'infezione virale secernendo quantità massicce di mediatori infiammatori, che, a loro volta, determinano un significativo rafforzamento delle risposte al virus. Inoltre, studi condotti dal mio gruppo di ricerca avevano dimostrato che i macrofagi umani in coltura, ottenuti da monociti circolanti (i cosiddetti Monocyte-derived macrophages, MDM), esprimono recettori noti per la proteina Spike S1 e rispondono alla proteina virale secernendo quantità massicce di mediatori infiammatori [58] che determinano un significativo rafforzamento delle risposte alla proteina virale. Nel complesso, è stato quindi possibile ipotizzare che il processo di attivazione infiammatorio osservato nel COVID-19 coinvolga meccanismi sia diretti del virus che immunomediati.

L'obiettivo del presente lavoro di tesi è stato quindi quello di studiare la risposta dell'epitelio alveolare e dell'endotelio alla proteina Spike di SARS-CoV-2. A tal fine le cellule endoteliali microvascolari ed epiteliali alveolari sono state direttamente esposte alla proteina Spike oppure incubate con il medium condizionato ottenuto da macrofagi umani pretrattati con la proteina Spike. Tale disegno sperimentale riproduce in vitro l'effetto del virus SARS-CoV-2 sulle cellule, sia diretto come infezione virale, sia immunomediato dalla presenza di citochine infiammatorie prodotte da macrofagi. I risultati ottenuti posso fornire chiarimenti sui meccanismi patogenetici alla base del danno alveolare e vascolare nel COVID-19.

MATERIALI E METODI

1. Colture cellulari

Macrofagi derivati da monociti (MDM)

I monociti umani sono stati isolati dal buffy coat di donatori sani, forniti dall'Unità di Immunoematologia e Trasfusione dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma, il protocollo dello studio è stato approvato dal comitato etico locale (460/2021/TESS/UNIPR) e condotto secondo la Dichiarazione di Helsinki (1964). Il buffy coat è stato diluito 1:3 con PBS (Phosphate Buffered Saline), poi stratificato su 4 tubi contenenti 15 mL di Lympholyte H e successivamente centrifugato a 800 g per 20 minuti a RT. Le cellule mononucleate (PBMC) presenti nell'anello all'interfaccia tra plasma e parte corpuscolata sono state raccolte e lavate due volte in PBS mediante centrifugazione a 400 g per 10 min a RT. Dopo il secondo lavaggio, le PMBC sono state sospese in medium completo di crescita, contenente RPMI1640, l'1% di penicillina/streptomicina ed il 10% di siero fetale bovino (FBS), e seminate su piastre di coltura multiwell (Falcon). Dopo un'incubazione di 30 minuti a 37°C in un'atmosfera al 5% di CO₂, le cellule non aderenti (per la maggior parte linfociti) sono state rimosse con 3 lavaggi vigorosi con PBS. I monociti rimasti adesi alla superficie sono stati quindi differenziati in macrofagi (MDM, monocyte-derived macrophages) mediante incubazione per 5 giorni in medium completo addizionato con 50 ng/mL Granulocyte M ϕ -Colony-Stimulating Factor (GM-CSF).

Cellule epiteliali alveolari (A549)

Come modello di epitelio alveolare sono state utilizzate le cellule A549, derivate da carcinoma alveolare (ATCC - American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). In parallelo è stata utilizzata anche la linea cellulare di A549 knockout per il fattore di trascrizione IRF1 (IRF1 KO, ab267042) fornita da Abcam plc. (Prodotti Gianni S.r.l., Milano, Italia).

Entrambi i modelli cellulari sono stati routinariamente coltivati in terreno di coltura RPMI1640 supplementato con il 10% di FBS e l'1% di penicillina/streptomicina a 37 °C in atmosfera umidificata con il 5% di CO₂.

Cellule endoteliali (HLMVEC e HUVEC)

Per gli studi sull'endotelio umano sono state utilizzate sia cellule endoteliali microvascolari polmonari umane (HLMVEC) acquistate presso la Neobiotech (Pasadena, CA, USA) che cellule

endoteliali da vena ombelicale umana (HUVEC), acquistate da Thermo Fisher Scientific (Monza, Italia). Le cellule sono state coltivate regolarmente secondo le istruzioni del produttore.

2. Trattamenti sperimentali

Trattamenti sperimentali su A549

Per gli esperimenti, le cellule sono state incubate per tempi diversi con la subunità S1 della proteina ricombinante Spike di SARS-CoV-2 (ARG70218; Arigo Biolaboratories, Hsinchu, Taiwan), la cui contaminazione da endotossine è $<0,1$ EU/ μ g di proteina, come certificato dal produttore. Per escludere ogni possibile contaminazione da parte del lipopolisaccaride (LPS), la proteina S1 è stata miscelata con 2 μ g/mL di Polimixina B (Merck, Roma, Italia) e incubata per 30 min a RT prima dell'aggiunta alle colture cellulari. Il mezzo condizionato è stato ottenuto dall'incubazione per 24 ore di macrofagi derivati da monociti (MDM) in assenza (CM_cont) e in presenza di 10 nM S1 (CM_S1). I mezzi condizionati raccolti da MDM di 16 donatori diversi (MDM-CM) sono stati mescolati in un pool che è stato utilizzato per il trattamento delle A549. In alternativa, le A549 sono state incubate con CM_cont, a cui sono stati aggiunti 50 ng/mL di IFN γ , IL-1 β , TNF α e IL-6 (R&S di Biotechne, Milano, Italia), utilizzati singolarmente o in combinazione. Dove indicato, le cellule sono state pretrattate con 1 μ M di baricitinib per 2 ore prima dell'aggiunta del trattamento e l'inibitore è stato lasciato nel terreno di coltura per tutta la durata dell'esperimento.

Trattamenti sperimentali su HLMVEC e HUVEC

Per gli esperimenti, le cellule endoteliali sono state trattate con la subunità S1 della proteina ricombinante Spike di SARSCoV-2 miscelata con polimixina B e incubata per 30 minuti a temperatura ambiente prima dell'aggiunta alle colture cellulari. Ove indicato, il MDM-CM ottenuto come descritto precedentemente è stato utilizzato per il trattamento delle cellule; lì dove erano incubate con CM_cont o CM_S1, è stato aggiunto il Large Vessel Endothelial Supplement (LVES; 10X) per fornire alle cellule HUVEC gli integratori necessari per la crescita, carenti nel terreno RPMI 1640.

Quando richiesto, 1 μ M di baricitinib veniva aggiunto 2 ore prima del trattamento sperimentale e lasciato nel terreno di coltura per tutta la durata dell'esperimento.

3. Analisi di espressione genica

Estrazione e purificazione dell'RNA

Esistono diversi protocolli per l'estrazione degli acidi nucleici da cellule in coltura. Per questo lavoro di tesi è stato utilizzato un approccio di estrazione e purificazione in fase solida che prevede l'utilizzo di colonnine con matrice di Silice in grado di legare gli acidi nucleici in presenza di alte concentrazioni saline, pH < 7 e in presenza di Etanolo.

In particolare, abbiamo eseguito l'estrazione dell'RNA totale mediante l'uso del kit GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit, in accordo con la metodica descritta dal produttore. In breve, si procedeva con l'eliminazione del medium di coltura e lavaggio delle cellule con PBS freddo per rimuovere eventuali residui di medium; successivamente le cellule sono state lisate mediante incubazione con 250 µL di Lysis Buffer addizionato con β-mercaptoetanololo, un agente riducente che contribuisce alla denaturazione delle RNAsi. Successivamente, sono stati aggiunti 150 µL di Etanolo 100% ai lisati, che sono poi stati trasferiti sulle colonnine e centrifugati a 11.000 g per 1 minuto. Dopo un lavaggio con Wash Buffer 1 e due lavaggi con Wash Buffer 2, l'RNA legato alla membrana di Silice nella colonnina è stato eluito aggiungendo 30 µL di acqua e centrifugando a 13.000g per un minuto.

Si procedeva poi alla quantificazione dell'acido nucleico estratto mediante lettura spettrofotometrica a 260 nM effettuata con lo spettrofotometro NanoDrop™ (ThermoFisher); i valori ottenuti sono stati utilizzati per quantificare il materiale genetico mediante la legge di Lambert-Beer che correla la quantità di luce assorbita da una soluzione alla concentrazione del soluto nella stessa e al cammino ottico percorso:

$$A = \epsilon \times C \times d$$

dove A= assorbanza ϵ = coefficiente di estinzione molare (40 per RNA)

C= concentrazione d= cammino ottico (1cm)

Retrotrascrizione e RT-qPCR

L'espressione genica è stata analizzata tramite RT-qPCR; alla quantificazione dell'estratto è, quindi, seguita la retrotrascrizione di 1µg di RNA totale in cDNA con il Kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific, Italia). Il protocollo prevede l'aggiunta di 1 µL di Random Primers (dN6) alla miscela di RNA e acqua (fino a 20 µL) e una prima incubazione di 5 minuti a 90°C. Al

termine sono stati aggiunti 12 μ L di una mix di reazione (contenente i nucleotidi dNTP 10mM ognuno, Reaction Buffer 5x, un inibitore di RNasi e 1 μ L dell'enzima Trascrittasi inversa (Improm II)) e i campioni sono stati incubati per 5 minuti a 4°C, quindi a 25°C per 5 minuti e, infine, a 42°C per un'ora.

Terminata la retrotrascrizione, i campioni di cDNA sono stati sottoposti a una reazione di PCR che è stata eseguita su un sistema StepOnePlus Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific) utilizzando 5 μ L di SYBR™ Green o TaqMan Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific) e 0.5 μ L di mix di primers forward e reverse specifici per i geni di interesse (Tabella 1). I primers sono stati disegnati in base alle sequenze riportate in GenBank e con il supporto del programma "Primer Blast". L'espressione del gene housekeeping RPL15 (Ribosomal like protein 15, Gene ID:6138) è stata utilizzata come riferimento per la normalizzazione dell'espressione di tutti gli altri geni d'interesse.

Il protocollo di reazione prevedeva due passaggi iniziali prima dell'amplificazione ovvero uno step a 50 °C per 2 minuti e uno a 95°C per 2 minuti per attivare gli enzimi di reazione e denaturare le strutture secondarie del cDNA. Successivamente il protocollo prevedeva 40 cicli di reazione consecutivi, ciascuno caratterizzato da tre passaggi a diverse temperature: una fase di denaturazione a 95°C per 15 secondi, una di annealing a 57°C per 30 secondi e infine la fase di allungamento a 72°C per 30 secondi.

Terminata la reazione di amplificazione si procedeva con l'analisi dei dati. Il livello di espressione dei geni dopo il trattamento con la proteina Spike S1 è stato calcolato con il metodo del $\Delta\Delta C_t$ [59] ed espresso come induzione rispetto ai valori misurati in cellule di controllo non trattate (=1).

L'espressione del recettore del SARS-CoV-2 Angiotensin-converting Enzyme 2 (ACE2) e dei corecettori Neuropilin 1 e 2 (NRP1 e NRP2) è stata, invece, determinata tramite quantificazione assoluta dei rispettivi mRNA [60]. A questo scopo sono stati preliminarmente ottenuti campioni a concentrazione nota di cDNA per ognuno dei geni in esame; questi, opportunamente diluiti, sono stati analizzati mediante analisi RT-qPCR e utilizzati per la costruzione di rette standard per la quantificazione assoluta dei diversi trascritti nei campioni in esame.

Tabella 1. Sequenze delle coppie di primer utilizzate per l'analisi RT-qPCR.

Gene/proteina	Forward primer	Reverse primer
RPL15/RPL15	Hs03855120_g1 (TaqMan® Assay, Thermo Fisher Scientific)	
IL1B/IL-1	Hs99999029_m1 (TaqMan® Assay, Thermo Fisher Scientific)	
IL6/IL-6	AACCTGAACCTTCCAAAGATGG	TCTGGCTTGTTCTCACTACT
TNFA/TNF	ATGAGCACTGAAAGCATGATCC	GAGGGCTGATTAGAGAGAGGTC
CXCL8/IL-8	ACTGAGAGTGATTGAGAGTGGAC	AACCTCTGCACCCAGTTTTTC
CXCL10/IP-10	GTGGCATTCAAGGAGTACCTC	TGATGGCCTTCGATTCTGGATT
CCL2/MCP-1	CAGCCAGATGCAATCAATGCC	TGGAATCCTGAACCCACTTCT
CCL5/RANTES	CTCCCCATATTCCTCGGACA	GTTGATGTACTCCCGAACCC
IRF1/IRF1	CTGTGCGAGTGACCGGATG	ATCCCCACATGACTTCCTCTT
PSMB8/ PSMB8	CACGCTCGCCTTCAAGTTC	AGGCACTAATGTAGGACCCAG
TRIM22/TRIM22	ACCAAACATTCCGCATAAACGA	AGGCGGTTCTCTTGTCTGA
UBD/UBD	GAAGCCTCTCATCTTATGGCATT	CCTCATCACCTGACTCCACAA
NOS2/iNOS	CACGCTCGCCTTCAAGTTC	AGGCACTAATGTAGGACCCAG
ACE2/ACE2	ACAGTCCACACTTGCCCAAAT	TGAGAGCACTGAAGACCCATT
NRP1/NRP1	ACCCAAGTGAAAAATGCGAATG	CCTCCAAATCGAAGTGAGGGTT
NRP2/NRP2	GCTGGCTATATCACCTCTCCC	TCTCGATTTCAAAGTGAGGGTTG
ICAM1/ICAM-1	TGAACCCACAGTCACCTATG	CTCGTCTCTGCGGTAC
VCAM1/VCAM-1	GGGAAGATGGTCGTGATCCTT	TCTGGGGTGGTCTCGATTTTA
PECAM1/CD31	GCTGACCCTTCTGCTCTGTT	ATCTGGTGCTGAGGCTTGAC
THBD/THBD	ACCTTCCTCAATGCCAGTCA	AAGGAAATGACATCGGCAGC

F3/TF	GGCGCTTCAGGCACTACAA	TTGATTGACGGGTTTGGGTTTC
CDKN1A/p21	CCTGTCACTGTCTTGTACCCT	GCGTTTGGAGTGGTAGAAATCT
CDKN1B/p27	TAATTGGGGCTCCGGCTAACT	TGCAGGTCGCTTCCTTATTCC
NOS3/ eNOS	TGGTACATGAGCACTGAGATCG	CCACGTTGATTCCACTGCTG
ARG2/arginase	AAGCTGGCTTGATGAAAAGGC	GCGTGGATTCACTATCAGGTTGT

4. Analisi Western Blot

Per la determinazione dell'espressione proteica, le cellule sono state lisate in RIPA buffer aggiunto con una miscela di inibitori delle proteasi (cOmplete™, Mini, senza EDTA, Roche). 20 µg di proteine sono state separate su SDS-PAGE (4-12% di Acrilamide) e trasferite elettroforeticamente su membrane PVDF (membrana Immobilon-P, Merck). Le membrane sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente in soluzione salina tamponata con Tris (TBS; 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) contenente il 5% di latte secco non grasso per bloccare i siti aspecifici della membrana, poi incubate over night a 4°C in TBST (TBS + 0.5% Tween) contenente 5% di Albumina di siero bovino (BSA) e anticorpi policlonali di coniglio o anticorpi monoclonali di topo per le diverse proteine da testare. Come standard interno è stata impiegata la Vinculina, rilevata con un anticorpo monoclonale di topo anti-Vinculina (1:2000; Merck). L'immunoreattività è stata visualizzata con SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent HRP Substrate (Thermo Fisher Scientific). Le immagini dei Western Blot sono state acquisite con il sistema di imaging iBright FL1500 (Thermo Fisher Scientific) e analizzate con il software iBright Analysis.

5. Quantificazione delle citochine

La quantità di citochine e chemochine rilasciate nel medium di coltura dalle cellule trattate con la proteina Spike è stata misurata utilizzando il pannello Cytokine Human Magnetic 10-Plex (Thermo Fisher Scientific) per la piattaforma Luminex™. In breve, tutti i surnatanti sono stati chiarificati prima dell'analisi mediante centrifugazione (12.000×g per 10 min a 4 °C); come richiesto dalla procedura 50 µl di ogni medium sono stati poi aggiunti alla piastra di lettura. Dopo 2 ore di incubazione a RT e al buio, la piastra è stata lavata due volte con Wash buffer e poi incubata per 1h con l'anticorpo rivelatore biotinilato. Infine, dopo 30 minuti in presenza di soluzione di Streptavidina-RPE, la piastra è stata lavata nuovamente due volte e inserita nel sistema Bio-Plex di Bio-Rad per

l'analisi. In parallelo è stata eseguita una curva standard utilizzando campioni forniti nel test; il range di concentrazione analizzato per ogni citochina era 6-5.190 (in pg/ml) per TNF α , 12-8.890 per IL-1 β , 7-5.120 per IL-6, e 6-4,450 per IFN γ . La quantità di citochine in ogni campione è stata calcolata tramite la curva standard utilizzando il software di Bio-Rad ed espressa come pg/mL di medium di incubazione.

6. Proliferazione cellulare

Conta cellulare

Dopo il trattamento richiesto, la proliferazione cellulare è stata valutata contando il numero di cellule aderenti; a tal fine, i monostrati sono stati lavati due volte in PBS, staccati mediante tripsinizzazione e poi contati con un contatore di cellule ZM (Coulter Electronics Ltd, Luton, U.K.).

Saggio della resazurina

Questo saggio misura l'attività metabolica delle cellule come indice di vitalità. Le cellule vive riducono, con enzimi intracellulari NADH-dipendenti, il composto non fluorescente resazurina, di colore blu, in resorufina, un composto fluorescente di colore rosa (Figura 9). La resorufina si accumula nel medium, la sua quantità e l'intensità di fluorescenza rilevata nel medium di coltura sono correlate direttamente alla quantità di cellule metabolicamente attive e, quindi, vive. Il saggio prevede, dopo il trattamento, che le cellule siano incubate per 1 ora a 37 °C con medium di crescita fresco supplementato con 44 μ M di resazurina. In seguito, è stata misurata la fluorescenza a 572 nm con un fluorimetro (Enspire Multimode Plate readers; PerkinElmer, Monza, Italy).

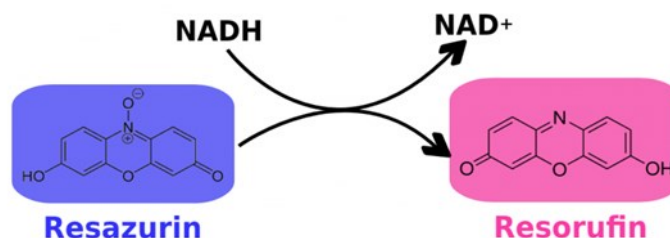


Figura 9. Conversione della Resazurina in Resorufina.

7. Analisi del ciclo cellulare

Per l'analisi del ciclo cellulare, le cellule sono state trattate con i rispettivi trattamenti il giorno dopo la semina, quindi raccolte mediante tripsinizzazione e incubate per 18 ore a 4°C in una soluzione

ipotonica contenente 50 µg/mL di ioduro di propidio (PI) e 10 µg/mL di RNaseA. La distribuzione del ciclo cellulare è stata determinata utilizzando un citofluorimetro a flusso FACScan (Cytoflex; Beckman Coulter, Milano, Italia).

8. Apoptosi

L'apoptosi è stata valutata con Annexin V FITC/Dead Cell Apoptosis Kit per citometria a flusso (Thermo Fisher Scientific). Dopo il trattamento, sia le cellule in sospensione che quelle aderenti sono state raccolte, lavate due volte con PBS e risospese in 200 µl di binding buffer contenente Annexin-V FITC e ioduro di propidio (PI). Dopo un'incubazione di 20 minuti a RT al buio, sono stati aggiunti 300 µl di binding buffer e i campioni sono stati, quindi, analizzati con un citometro a flusso Cytoflex (Beckman Coulter). Nei diagrammi di dispersione, le cellule negative sia al PI che all'Annexina V erano considerate sane (Q1-LL), mentre le cellule apoptotiche precoci e tardive erano identificate come PI negative/Annexin V positive (Q1-LR) e Annexin V e PI positive (Q1-UR). Le cellule PI positive/Annexina V negative sono considerate cellule necrotiche (Q1-UL).

9. Autofagia

L'autofagia è stata determinata nelle cellule utilizzando il kit di rilevamento dell'autofagia CYTO-ID®, come specificato dalle istruzioni del produttore (ENZO Lyfe Sciences, Euroclone, Milano, Italia).

10. Determinazione della produzione di ossido nitrico

La produzione di ossido nitrico (NO) è stata determinata mediante un approccio fluorimetrico, verificando la produzione della molecola fluorescente 1-(H)-naftotriazolo dal 2,3-diaminaftalene (DAN) in ambiente acido. In totale, 100 µL di terreno cellulare sono stati miscelati con 20 µL di DAN (0,025 mg/mL in 0,31 M HCl). Dopo 10 minuti a temperatura ambiente, sono stati aggiunti 20 µL di NaOH 0,7 M e la fluorescenza è stata letta con il lettore di piastre EnSpire® Multimode (PerkinElmer, Milano, Italia). La produzione di nitriti è stata espressa in nmoli/ml di terreno extracellulare (µM).

11. Analisi statistica

Per l'analisi statistica è stato utilizzato GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). I valori di p sono stati calcolati con l'ANOVA a una via per i confronti multipli o il t-test per i dati appaiati. $p < 0,05$ è stato considerato significativo.

RISULTATI

1. Effetti della proteina Spike S1 sul fenotipo di cellule epiteliali alveolari

Effetti diretti ed immunomediati di Spike S1 sull'epitelio alveolare

Per comprendere i meccanismi responsabili della disfunzione polmonare indotta da SARS-CoV-2 è stata inizialmente studiata la risposta delle cellule epiteliali alveolari alla subunità S1 della proteina Spike virale. A tal fine, si è analizzato il profilo infiammatorio delle cellule A549 in seguito a trattamento diretto con S1. Le cellule sono state incubate per 4 ore con concentrazioni crescenti di S1 e successivamente è stata valutata l'espressione genica di diverse citochine e chemochine infiammatorie. Come evidenziato nel pannello A della Figura 10, l'esposizione a 10 nM di S1 non ha provocato modifiche significative nell'espressione dei geni analizzati. Al contrario, a 25 nM è stato rilevato un lieve incremento dell'espressione di IL1B/IL-1; tale incremento è risultato più marcato a 50 nM, concentrazione alla quale sono state osservate anche aumentate espressioni di IL-6, e IL8 rispetto alle cellule di controllo non trattate. Per quanto riguarda il TNF α , è stato rilevato un lieve incremento dose-dipendente, che tuttavia non ha raggiunto una significatività statistica. Al contrario, le chemochine MCP-1, IP-10 e RANTES non hanno mostrato modificazioni significative in risposta all'esposizione a concentrazioni crescenti di S1.

Studi preliminari svolti presso il laboratorio dove ho condotto la mia attività di ricerca avevano già evidenziato che i macrofagi derivati da monociti (MDM) esprimono recettori noti per la subunità S1 della proteina Spike e reagiscono al contatto con la proteina virale attraverso la produzione massiva di mediatori infiammatori [58]. Per valutare il ruolo degli effetti immunomediati nella risposta delle cellule epiteliali alla proteina S1, è stata analizzata la produzione di citochine da parte delle cellule A549 coltivate in presenza di un mezzo di incubazione ottenuto da macrofagi trattati per 24 ore con la proteina virale (CM_S1). Dopo 5 ore di incubazione con CM_S1, è stato rilevato un aumento marcato dei livelli di mRNA di tutti i mediatori infiammatori analizzati, evidenziando così un effetto infiammatorio immunomediato (Figura 10B). L'induzione ha riguardato tutte le citochine esaminate (IL-1 β , IL-6 e TNF α) e le chemochine IL-8 e MCP-1, risultando particolarmente intensa per RANTES (circa 300 volte) e ancora più elevata per IP-10 (circa 1000 volte). Al contrario, non sono state riscontrate variazioni nei livelli di espressione quando le cellule sono state coltivate con terreno di coltura condizionato proveniente da macrofagi non trattati (CM_cont), utilizzato come controllo.

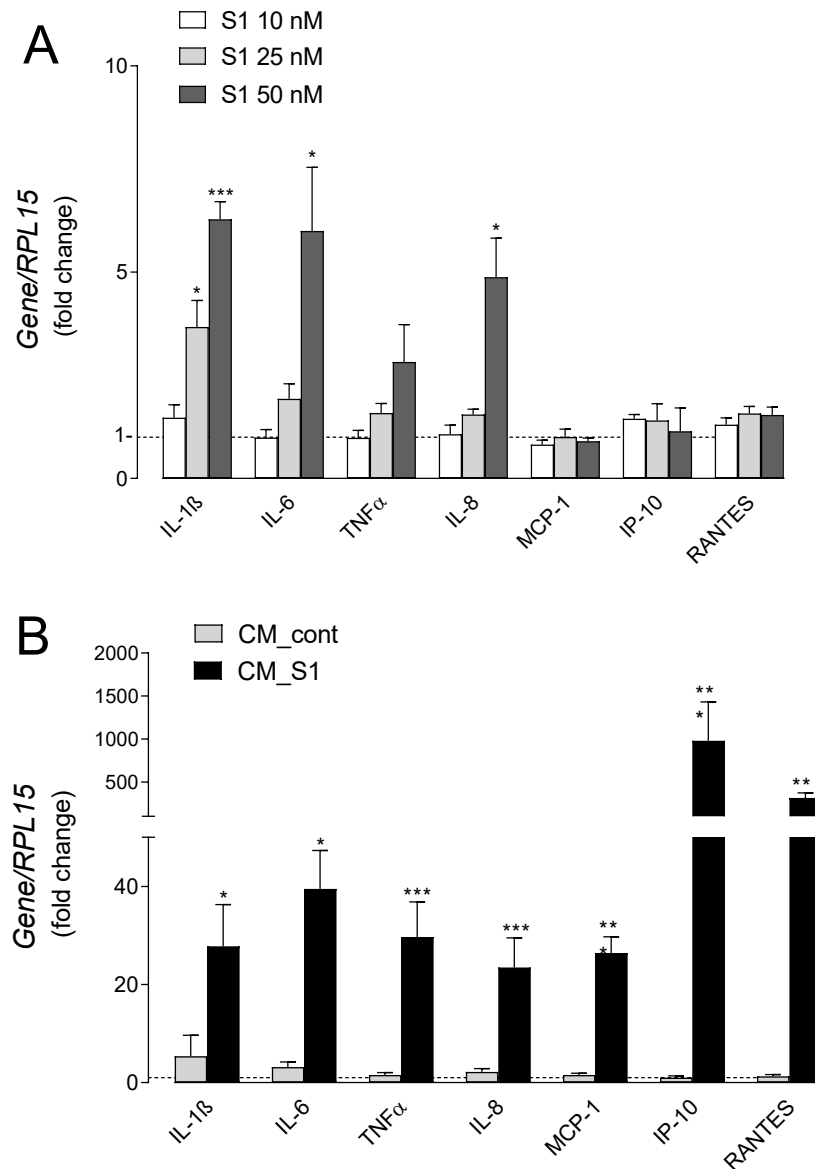


Figura 10. Effetti della subunità S1 e del CM_S1 sull'espressione genica di cellule epiteliali alveolari. Le cellule epiteliali alveolari A549 sono state incubate per 4 ore con le concentrazioni indicate di proteina Spike S1 (Pannello A) o con terreno condizionato (CM) ottenuto incubando macrofagi derivati da monociti (MDM) per 24 ore in assenza (CM_cont) o in presenza di 10 nM di Spike S1 (CM_S1) (Pannello B). L'espressione dei geni indicati è stata misurata mediante RT-qPCR e calcolata rispetto alle cellule non trattate (=1; linea tratteggiata) previa normalizzazione per il gene housekeeping RPL15, come descritto nella sezione Materiali e Metodi. I dati sono le medie SEM di quattro determinazioni, ciascuna eseguita in duplicato. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ rispetto alle cellule non trattate.

Data l'entità degli effetti immunomediati, si è deciso di procedere approfondendo specificamente i processi cellulari legati alla modulazione immunomediata del fenotipo infiammatorio nelle cellule A549.

Effetti immunomediati di Spike S1 sulla vitalità dell'epitelio alveolare

A questo scopo, sono stati preliminarmente valutati eventuali effetti citotossici e di danno cellulare del CM_S1.

A tal fine, le cellule A549 sono state mantenute fino a 72 ore in presenza di medium condizionato CM_cont o CM_S1. I risultati mostrano che il CM_S1 induce un netto cambiamento morfologico, come evidenziato dalle immagini ottenute tramite microscopia a contrasto di fase (Figura 11A). In particolare, le colture mantenute in CM_cont risultano confluenti con cellule dalla tipica forma poligonale, mentre quelle trattate con CM_S1 mostrano cellule con morfologia fusiforme e distribuite in modo più sparso. Tuttavia, non si osservano evidenti segni di distacco o morte cellulare suggerendo che, nelle condizioni sperimentali adottate, l'effetto sia principalmente citostatico piuttosto che citotossico.

Abbiamo poi valutato l'effetto dei medium condizionati sullo stato proliferativo delle cellule epiteliali alveolari. Per farlo, abbiamo monitorato la proliferazione e la vitalità cellulare in colture mantenute con CM_cont o CM_S1 per diversi intervalli temporali. I risultati, riportati in Figura 11B, mostrano che, mentre il CM_cont non modifica la proliferazione rispetto alle cellule coltivate in condizioni normali (cioè in medium completo di crescita, RPMI1640 + 10% FBS), il trattamento con CM_S1 induce un netto arresto della crescita delle cellule A549. In particolare, sia il numero (a sinistra) che la vitalità (a destra) delle cellule aderenti esposte a CM_S1 rimangono stabili nel tempo senza aumenti significativi. Questi dati sono confermati dall'analisi in citometria a flusso (Figura 11C), che evidenzia come la distribuzione delle cellule nelle fasi del ciclo cellulare (G0/G1, S e G2/M) rimanga simile in CM_cont rispetto a condizioni di controllo, mentre con CM_S1 si osserva una riduzione delle cellule in fase S (dal 18,5% all'8,7%) e un aumento di quelle in G0/G1 (dal 66,3% all'81,2%). Inoltre, dopo 72 ore di esposizione a CM_S1, le cellule A549 mostrano un significativo incremento dell'attività autofagica rispetto a quelle trattate con CM_cont (Figura 11D).

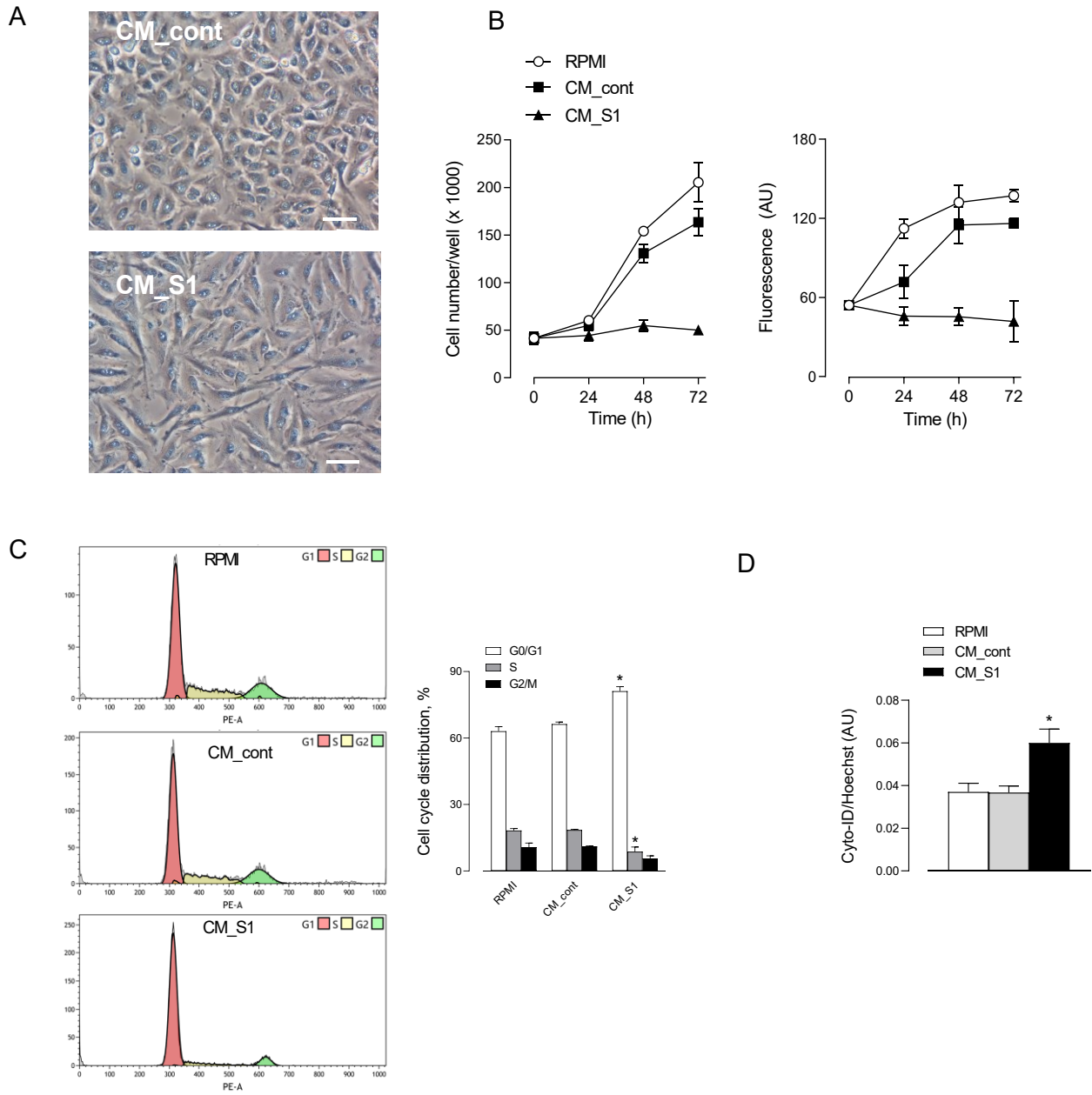


Figura 11. Effetti del CM_S1 sulla vitalità e la proliferazione delle cellule epiteliali alveolari. Le cellule A549 sono state mantenute in terreno RPMI1640 (RPMI) o incubate in terreno condizionato ottenuto incubando macrofagi derivati da monociti in assenza (CM_cont) o in presenza di 10 nM di S1 (CM_S1). (A) Immagini di microscopia a contrasto di fase di cellule trattate per 48 ore. Barra = 100 μ M. (B) Proliferazione cellulare. Ai tempi indicati, la proliferazione cellulare è stata valutata contando il numero di cellule aderenti (sinistra) o misurando la vitalità cellulare attraverso il saggio della resazurina (destra), come descritto nella sezione Materiali e Metodi. Ogni punto rappresenta la deviazione standard di cinque determinazioni in un esperimento rappresentativo che, ripetuto tre volte, ha fornito risultati comparabili. (C) Analisi del ciclo cellulare. Dopo 24 ore di incubazione, le cellule sono state raccolte, colorate con ioduro di propidio e analizzate per il ciclo cellulare con

citometria a flusso, come descritto in Materiali e Metodi. Sono mostrati i grafici ottenuti in un esperimento rappresentativo (a sinistra). È mostrata anche la distribuzione cellulare in ciascuna fase del ciclo cellulare (a destra); le barre rappresentano la media SEM dei dati ottenuti in tre esperimenti indipendenti. * $p < 0,05$ rispetto a CM_cont con ANOVA. (D) Induzione dell'autofagia. L'autofagia è stata determinata dopo 72 ore, come descritto in Materiali e Metodi. Le barre rappresentano la media SEM di quattro determinazioni. * $p < 0,05$ rispetto a CM_cont con ANOVA.

Per approfondire ulteriormente questo aspetto, abbiamo analizzato il profilo di espressione di alcuni marcatori associati alle vie di degradazione proteica (Figura 12). In particolare, sono stati esaminati i livelli di espressione di geni legati all'attività del proteasoma, come l'Ubiquitina D (UbD), che regola la degradazione proteica dipendente dal proteasoma, TRIM22 (Tripartite Motif Containing 22), notoriamente coinvolto nei processi autofagici, e la subunità PSMB8 dell'immunoproteasoma. I dati ottenuti mostrano un aumento significativo dei livelli di mRNA di tutti questi geni già dopo 4 ore di trattamento con CM_S1, con un incremento particolarmente marcato per TRIM22 dopo 24 ore di esposizione.

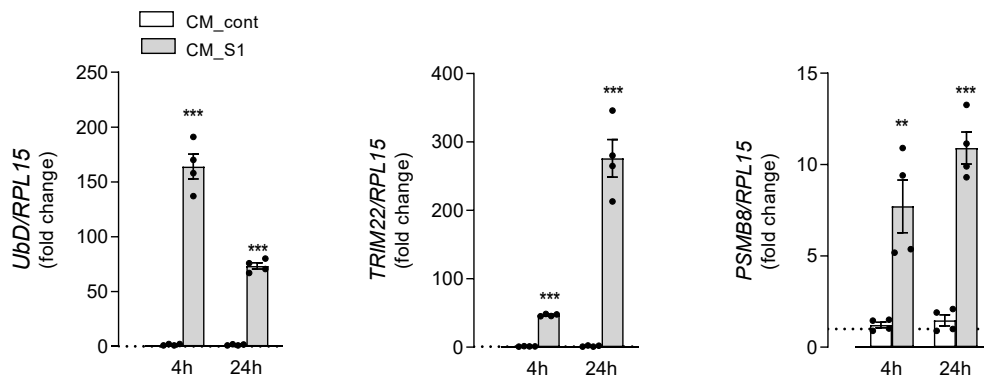


Figura 12. Effetti del CM_S1 sull'espressione di proteine correlate al proteasoma in cellule epiteliali alveolari. Le cellule A549 sono state incubate nelle stesse condizioni della Figura 11. L'espressione dei geni indicati è stata misurata dopo 4 o 24 ore di incubazione mediante RT-qPCR, come descritto nella sezione Materiali e Metodi. L'espressione di ciascun gene è mostrata come induzione di mRNA misurata in cellule mantenute in RPMI (=1, linea tratteggiata). Le barre rappresentano le medie \pm SEM di quattro esperimenti indipendenti (punti singoli), ciascuno eseguito in duplicato. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. CM_cont con t-test di Student.

iNOS come marker di un fenotipo epiteliale attivato

Un altro marcatore notoriamente associato ad un fenotipo epiteliale attivato è la proteina iNOS (NOS2), isoforma inducibile dell'enzima ossido nitrico sintetasi. Di questo enzima sono note diverse isoforme, tutte responsabili della conversione dell'aminoacido L-arginina in citrullina e ossido nitrico (NO). Quest'ultimo è un radicale libero versatile che esercita diverse funzioni fisiologiche e patologiche con effetti sia tossici che regolatori [61]. Nelle cellule endoteliali, la produzione adeguata di ossido nitrico (NO) tramite l'attività costitutiva di eNOS (ossido nitrico sintetasi endoteliale) è fondamentale per mantenere l'omeostasi vascolare, favorendo la regolazione del tono dei vasi sanguigni. Al contrario, l'NO generato dall'isoforma inducibile iNOS presenta effetti sia benefici che nocivi: infatti, possiede proprietà antimicrobiche e antitumorali, ma una sua produzione eccessiva è fortemente coinvolta nel perpetuarsi dell'infiammazione cronica e può provocare danni ai tessuti tramite la formazione di specie reattive dell'ossido nitrico (RNOS)[62]. Recenti evidenze indicano l'induzione di iNOS come componente della risposta infiammatoria a SARS-CoV-2, dal momento che NOS2 è upregolato nei pazienti COVID-19 critici. Per approfondire gli effetti immunomediati della proteina Spike in questo ambito abbiamo quindi valutato l'induzione di questo enzima nelle cellule epiteliali respiratorie.

Come evidenziato in Figura 13, l'espressione dell'mRNA di NOS2 è aumentata in modo tempo-dipendente dopo l'esposizione a CM_S1, raggiungendo il picco massimo a 8 ore di incubazione. Allo stesso modo, la proteina iNOS è risultata indotta già dopo 4 ore di trattamento, con un'espressione massima osservata a 8 ore, seguita da un successivo calo.

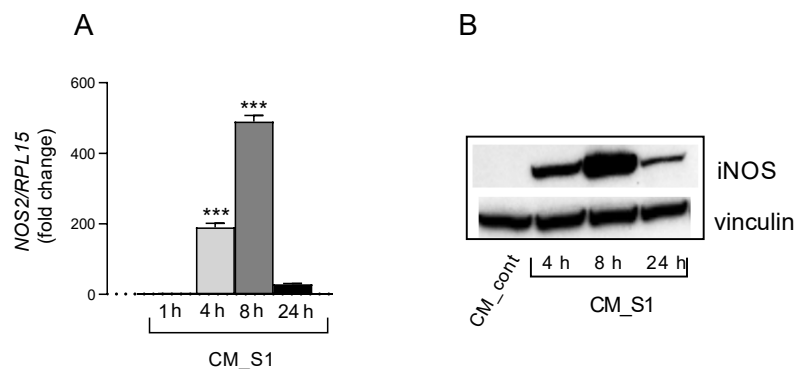


Figura 13. Effetto del CM_S1 sull'induzione di iNOS in cellule epiteliali alveolari. Le cellule A549 WT sono state incubate con un terreno condizionato (CM) da macrofagi derivati da monociti (MDM). Ai tempi indicati, l'espressione di NOS2 è stata misurata mediante RT-qPCR e calcolata relativamente a CM_cont (=1; linea tratteggiata) dopo normalizzazione per il gene housekeeping RPL15 (A). Le barre rappresentano le medie SEM di tre esperimenti, ciascuno eseguito in duplicato. Allo stesso tempo, la quantità di proteina iNOS è stata valutata mediante analisi Western Blot (B); sono mostrati blot rappresentativi per tre diversi esperimenti. *** $p < 0,001$ vs. CM_cont con ANOVA ordinaria a una via.

Meccanismi molecolari sottostanti gli effetti immunomediati di Spike S1 sull'epitelio alveolare

Allo scopo di valutare i meccanismi molecolari responsabili degli effetti osservati, lo studio è proseguito monitorando l'attivazione dei fattori di trascrizione NF- κ B, STAT e AP-1 durante l'incubazione con CM_cont o CM_S1 per differenti intervalli temporali. I dati mostrati in Figura 14 evidenziano che nessuno di questi fattori risulta attivato nelle cellule A549 coltivate con CM, fatta eccezione per una lieve e transitoria fosforilazione di STAT3. Al contrario, l'esposizione delle A549 al CM_S1 ha determinato un'attivazione rapida e persistente di NF- κ B, confermata dalla fosforilazione della subunità p65 e dell'inibitore I κ B α . Per quanto riguarda i fattori STAT, STAT1 ha mostrato un pattern di attivazione simile a NF- κ B, mentre STAT3 ha subito una fosforilazione rapida ma transitoria, raggiungendo un picco massimo a 4 ore dall'incubazione e diminuendo entro 24 ore. Infine, una significativa attivazione di AP-1, evidenziata dalla fosforilazione della proteina c-fos, è stata osservata dopo 90 minuti di esposizione a CM_S1, con una riduzione entro le 24 ore successive.

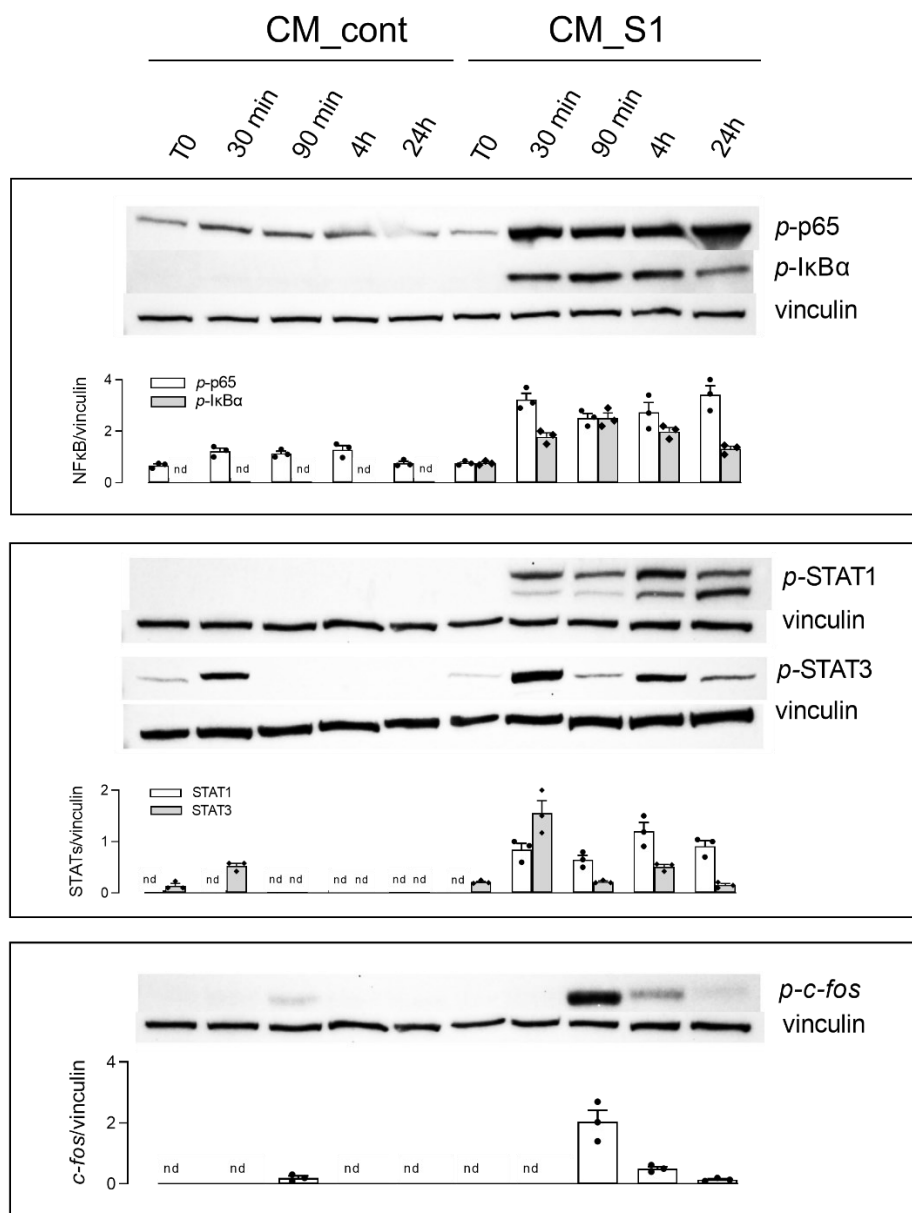


Figura 14. Effetti del CM_S1 sui pathways molecolari mediati da NF-κB, STAT e AP1 in cellule epiteliali alveolari. Le cellule A549 sono state incubate per i tempi indicati con terreno condizionato (CM) da macrofagi derivati da monociti (MDM) non trattati (CM_cont) o trattati con S1 (CM_S1). L'espressione delle proteine indicate è stata valutata mediante analisi Western Blot, come descritto nella sezione Materiali e Metodi; sono mostrati blot rappresentativi e l'analisi densitometrica di tre diversi esperimenti.

Questi dati sono in linea con evidenze recenti, che dimostrano come numerose proteine virali siano in grado di iperattivare il percorso di segnalazione di NF-κB, il quale, rafforzando il rilascio di citochine, contribuisce a diffondere il danno multiorgano [63]; effettivamente, anche nella patologia COVID-19, l'attivazione di questo fattore di trascrizione è un segno distintivo di severità [64]. Allo

stesso modo, è noto che anche l'asse Janus Kinases (JAK)/Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) è profondamente coinvolto nell'insorgenza della tempesta di citochine conseguente all'infezione da SARS-CoV-2 [65], così come il fattore di trascrizione AP-1 [66].

Ruolo di IRF1 nella modulazione degli effetti immunomediati di Spike S1 sull'epitelio alveolare

A questo proposito è importante ricordare che la modulazione trascrizionale sia di iNOS che dei geni analizzati correlati al proteasoma è sotto il controllo del fattore di trascrizione IRF1 (Interferon Regulatory Factor 1), tipicamente indotto dall'IFN γ come parte della risposta antivirale dell'ospite [67]. È ben noto, infatti, che l'IFN γ , attraverso il legame al recettore IFNGR, provoca l'attivazione della via di segnalazione JAK/STAT1 che, in definitiva, si traduce nella trascrizione di molti geni, tra cui IRF1. Per questo motivo, gli inibitori di tale via sono apparsi fin da subito dei buoni candidati come target molecolari di terapie farmacologiche per il trattamento del COVID-19 [68]. Per lo stesso motivo sono anche stati ampiamente utilizzati anche farmaci inibitori di JAK/STAT, tra i quali il baricitinib è risultato particolarmente efficace. Inizialmente approvato dalla Food and Drug Administration - FDA statunitense per il trattamento dell'artrite reumatoide attiva, è stato più di recente utilizzato per il trattamento della polmonite grave da COVID-19 (autorizzazione della FDA del 19 novembre 2020 all'uso in emergenza - EUA). Per confermare l'attivazione di questa via di segnalazione nelle nostre condizioni sperimentali, abbiamo valutato l'espressione del fattore di trascrizione IRF1 nelle cellule A549 trattate con terreno di coltura condizionato, sia in assenza che in presenza di baricitinib. Analogamente a quanto osservato per UbD, TRIM22 e PSMB8, l'espressione di IRF1 viene stimolata dall'incubazione con CM_S1 sia a livello di RNA che di proteina, con un aumento significativo già dopo 4 ore di trattamento, seguito da una riduzione dopo 24 ore (Figura 15A). L'aggiunta di baricitinib al terreno di coltura blocca efficacemente l'aumento di mRNA e proteina di IRF1, dimostrando l'attivazione dell'asse JAK/STAT-IRF1 durante l'esposizione delle cellule alveolari a CM_S1. Inoltre, il farmaco inibisce l'induzione, mediata da CM_S1, dei geni coinvolti nella degradazione proteasoma-dipendente (Figura 15B) e riduce l'attivazione dell'autofagia (Figura 15C). Coerentemente, in presenza di baricitinib, i cambiamenti morfologici tipici delle cellule A549 esposte a CM_S1 risultano attenuati (Figura 15E), mentre il numero cellulare aumenta significativamente rispetto a quello osservato con il solo trattamento CM_S1 (Figura 15D). Complessivamente, questi dati suggeriscono un ruolo chiave della via JAK/STAT, attraverso meccanismi dipendenti da IRF1, nel mediare gli effetti citostatici delle citochine prodotte dai macrofagi attivati dalla proteina S1 sulle cellule epiteliali alveolari, evidenziando anche l'efficacia protettiva del baricitinib in questo contesto.

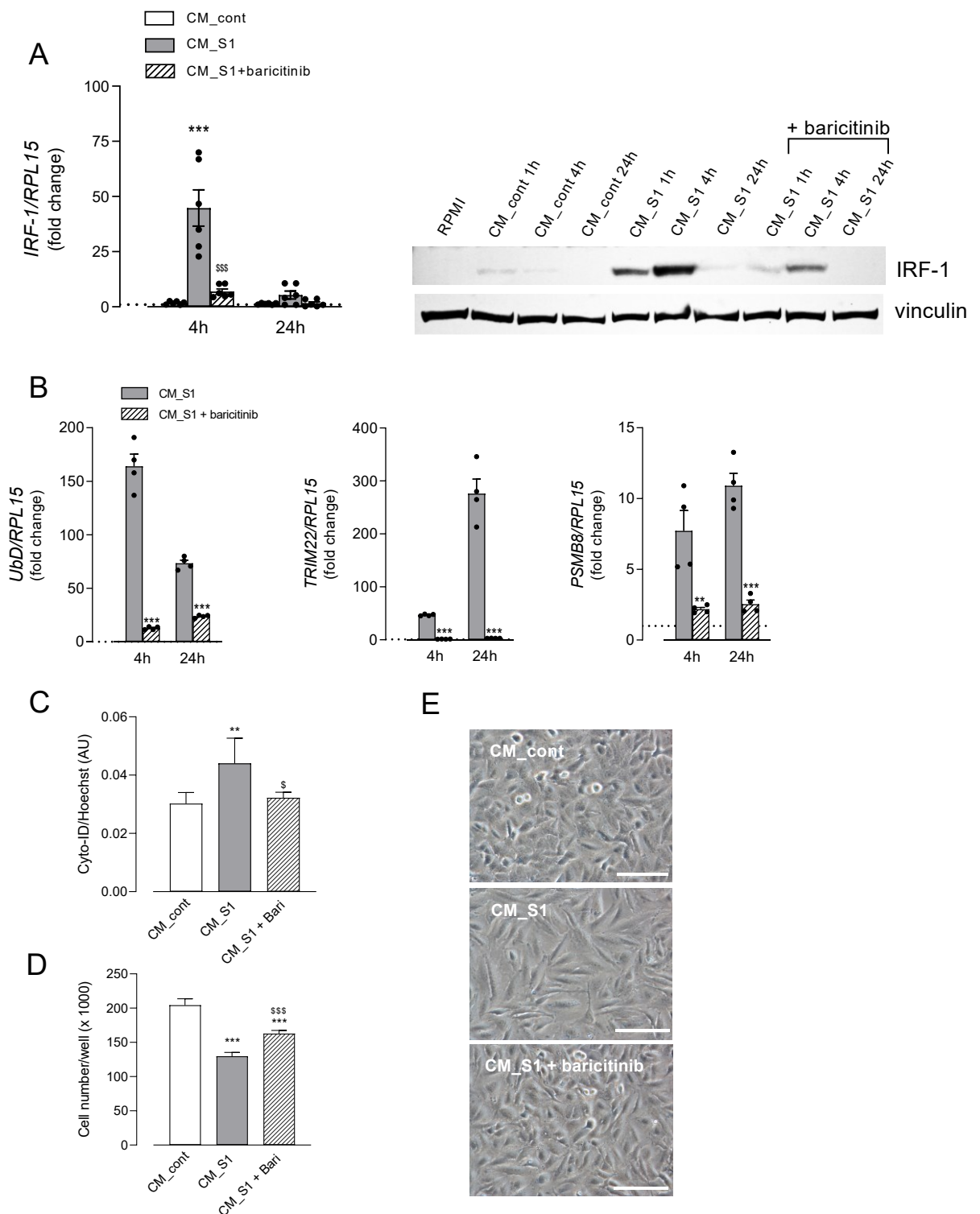


Figura 15. Azione del baricitinib sugli effetti citostatici del CM_S1 in cellule epiteliali alveolari. Le cellule A549 sono state mantenute in RPMI o incubate in CM_cont o CM_S1 per tempi diversi; dove indicato, 1 μ M di baricitinib è stato aggiunto a CM_S1, come descritto in Materiali e Metodi. (A) Espressione di IRF1. L'espressione dell'mRNA di IRF1 (a sinistra) è stata misurata mediante RT-qPCR ed espressa come fold change delle cellule mantenute in RPMI (=1, linea tratteggiata). Le barre

rappresentano le medie \pm SEM di quattro esperimenti indipendenti (punti singoli), ciascuno eseguito in duplicato. *** $p < 0,001$ vs. CM_cont; \$\$\$ $p < 0,001$ vs. CM_S1 con ANOVA. L'espressione della proteina IRF1 è stata valutata mediante analisi Western Blot (a destra), come descritto in Materiali e Metodi. Viene mostrato un blot rappresentativo che, ripetuto tre volte, ha dato risultati comparabili. (B) Espressione genica. L'espressione dei geni indicati è stata misurata dopo 4 o 24 ore di incubazione mediante RT-qPCR, come descritto nella sezione Materiali e Metodi. I livelli di espressione di ciascun gene sono espressi come fold change delle cellule mantenute in RPMI (=1, linea tratteggiata). Le barre rappresentano le medie \pm SEM di quattro esperimenti indipendenti (punti singoli), ciascuno eseguito in duplicato. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. CM_S1 con t-test di Student. (C) Autofagia. Dopo 72 ore, l'autofagia è stata determinata utilizzando il kit di rilevamento dell'autofagia CYTO-ID®, come descritto nella sezione Materiali e Metodi. Ogni barra rappresenta la media \pm DS di cinque determinazioni all'interno di un esperimento rappresentativo che, ripetuto tre volte, ha fornito risultati comparabili. ** $p < 0,01$ vs. CM_cont; \$ $p < 0,05$ vs. CM_S1 con ANOVA. (D) Proliferazione cellulare. Le cellule sono state contate dopo 48 ore di trattamento, come descritto nella sezione Materiali e Metodi. Ogni barra rappresenta la media \pm DS di cinque determinazioni all'interno di un esperimento rappresentativo che, ripetuto tre volte, ha fornito risultati comparabili. *** $p < 0,001$ vs. CM_cont; \$\$\$ $p < 0,001$ vs. CM_S1 con ANOVA. (E) Immagini di microscopia a contrasto di fase di cellule A549 trattate per 72 ore. Barra = 100 μ M.

Ruolo delle citochine infiammatorie negli effetti immunomediati di Spike S1 sull'epitelio alveolare

Come precedentemente dimostrato, il terreno condizionato di macrofagi umani trattati con S1 è ricco di numerose citochine e chemochine [69]. Tra le citochine presenti, abbiamo rilevato che TNF α e IL-6 nel CM_S1 usato in questo studio raggiungevano concentrazioni di circa 50 ng/mL, mentre IL-1 β e IFN γ si aggiravano intorno a 1 ng/mL (Figura 16A). Per analizzare il contributo di queste citochine negli effetti immunomediati osservati, le cellule A549 sono state trattate con una combinazione di questi mediatori a diverse concentrazioni; si è proceduto, quindi, alla valutazione degli effetti di tali trattamenti sull'induzione di iNOS nelle cellule A549.

Come mostrato in Figura 16B, si è osservato un aumento dose-dipendente nell'espressione di NOS2, raggiungendo il massimo livello quando tutti i mediatori erano presenti a 50 ng/mL ciascuno. Per identificare quale di questi fattori fosse principalmente responsabile dell'induzione di NOS2, le cellule A549 sono state trattate con 50 ng/mL di ciascuna citochina, singolarmente o in combinazione. I dati mostrati in Figura 17A indicano che l'IL-6 non aveva effetto, mentre IFN γ , TNF α e IL-1 β provocavano un lieve incremento di NOS2 se somministrati singolarmente. Un'induzione più significativa è stata riscontrata con la co-somministrazione di IFN γ e TNF α o, soprattutto, di IFN γ e IL-1 β , mentre IL-6 non contribuiva a questo effetto, suggerendo un'azione sinergica tra le citochine.

In linea con ciò, la combinazione simultanea di IFN γ , TNF α e IL-1 β (citomix) ha portato a un'espressione di NOS2 sorprendentemente elevata.

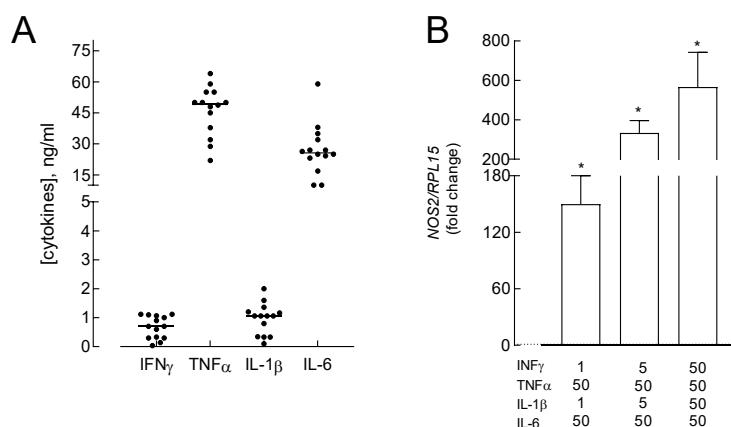


Figura 16. Effetti di diverse citochine sull'espressione di iNOS in cellule epiteliali alveolari. (A) Le citochine rilasciate dai macrofagi trattati con S1 provenienti da diversi donatori sono state quantificate come descritto nella sezione Metodi. I dati rappresentano le medie SEM di 14 determinazioni, ciascuna eseguita in duplicato. (B) A549 WT sono state incubate con le concentrazioni di citochine indicate. Dopo 6 ore, l'espressione di NOS2 è stata misurata mediante RT-qPCR e calcolata relativamente a CM_cont (=1; linea tratteggiata) dopo la normalizzazione per il gene housekeeping RPL15. * $p < 0,05$ vs. CM_cont con t-test a un campione.

Dato il ruolo di IRF1 nella modulazione di iNOS [70], lo studio è proseguito esplorando il ruolo del fattore di trascrizione nella stimolazione immuno-dipendente di iNOS, utilizzando una linea cellulare A549 knockout per IRF1 (IRF1 KO). A questo scopo, le citochine responsabili dell'induzione di NOS2 nelle cellule A549 wild-type (WT) sono state testate anche su cellule IRF1 knockout (KO). Come mostrato in Figura 17A, il profilo di espressione nelle cellule KO risultava simile a quello osservato nelle cellule wild-type, sebbene gli effetti osservati fossero molto inferiori in tutte le condizioni sperimentali. Di conseguenza, la proteina NOS2, chiaramente rilevabile nelle cellule WT durante tutto il periodo di incubazione con il citomix, era molto meno espressa nelle cellule IRF1 KO, risultando visibile soltanto dopo 8 ore di trattamento (Figura 17B). Coerentemente con questi dati, i livelli di nitriti e dei derivati stabili dell'ossido nitrico erano rilevabili dopo 24 ore solo nelle cellule WT, mentre risultavano assenti nelle cellule KO per IRF1 (Figura 17C).

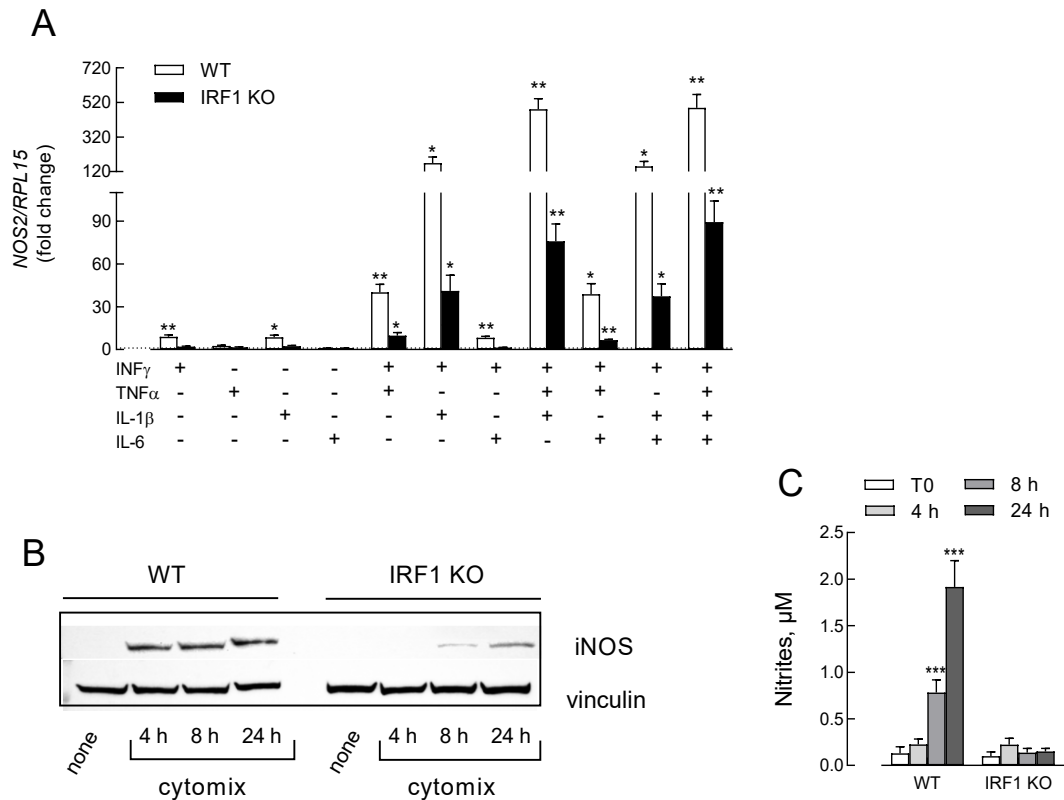


Figura 17. Effetti del cytomix sull'espressione di iNOS e sulla produzione di nitriti in cellule epiteliali alveolari. (A) A549 WT e IRF1 KO sono state incubate in presenza di 50 ng/mL delle citochine indicate. Dopo 6 ore, l'espressione di NOS2 è stata misurata mediante RT-qPCR. Le barre rappresentano le medie SEM di quattro esperimenti, ciascuno eseguito in duplicato. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. CM_cont con t-test a un campione. (B) A549 WT e IRF1 KO sono state incubate in presenza di cytomix (IFN γ + TNF α + IL-1 β , 50 ng/mL ciascuno). Ai tempi indicati, l'espressione della proteina iNOS è stata valutata mediante analisi Western Blot; sono mostrati blot rappresentativi per tre diversi esperimenti. (C) A549 WT e IRF1 KO sono state incubate in presenza di cytomix. Ai tempi indicati, è stato determinato il numero di nitriti nel mezzo di incubazione, come descritto nella sezione Materiali e Metodi. Le barre rappresentano le medie SEM di tre esperimenti indipendenti. *** $p < 0,001$ vs. T0 con ANOVA ordinaria a una via.

Il terreno condizionato ottenuto da macrofagi trattati con la proteina Spike S1 di SARS-CoV-2 induce in modo marcato l'espressione di iNOS nelle cellule epiteliali alveolari A549, verosimilmente grazie alla concomitante presenza di IFN γ , IL-1 β e TNF α . Queste citochine, se considerate singolarmente, stimolano debolmente l'espressione di NOS2; tuttavia, quando combinate, l'IFN γ mostra un'azione sinergica con TNF α e ancor più con IL-1 β , portando a livelli di espressione di NOS2 molto elevati,

comparabili a quelli ottenuti con il terreno condizionato. Inoltre, gli esperimenti condotti su cellule A549 prive del fattore IRF1 indicano che l'attivazione di questa via di segnalazione, attraverso il percorso JAK/STAT, rappresenta il meccanismo principale responsabile dell'induzione di iNOS da parte del terreno condizionato di macrofagi esposti a S1 o al cytomix.

2. Effetti della proteina Spike S1 sul fenotipo di cellule endoteliali

Effetti diretti ed immunomediati di Spike S1 sull'endotelio

Allo scopo di valutare l'effetto della proteina Spike nell'endotelio, preliminarmente è stata verificata l'espressione dell'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2), bersaglio della proteina virale, nelle cellule endoteliali microvascolari polmonari umane (HLMVEC) ed anche nei macrofagi derivati da monociti (MDM). Per confronto sono state utilizzate le cellule epiteliali respiratorie Calu-3, un modello noto per esprimere elevati livelli di ACE2 [71]. I risultati ottenuti indicano che ACE2 è rilevabile in tutti i modelli testati, seppur a livelli inferiori sia nei MDM che HLMVEC rispetto alle cellule Calu-3. Per quanto riguarda i trascritti per le Neuropiline NRP1 e NRP2, co-recettori che potenziano l'infettività del SARS-CoV-2 [55] e valutati in parallelo, i dati dimostrano che questi recettori sono molto più abbondanti nei macrofagi e nelle cellule endoteliali piuttosto che nell'epitelio respiratorio (Figura 18).

Il riscontro della presenza dell'espressione genica di ACE2, NRP1 e NRP2, anche se in misura diversa, nelle cellule endoteliali HLMVEC risulta coerente con quella parte di letteratura che sostiene una suscettibilità diretta di queste cellule all'infezione da SARS-CoV-2.

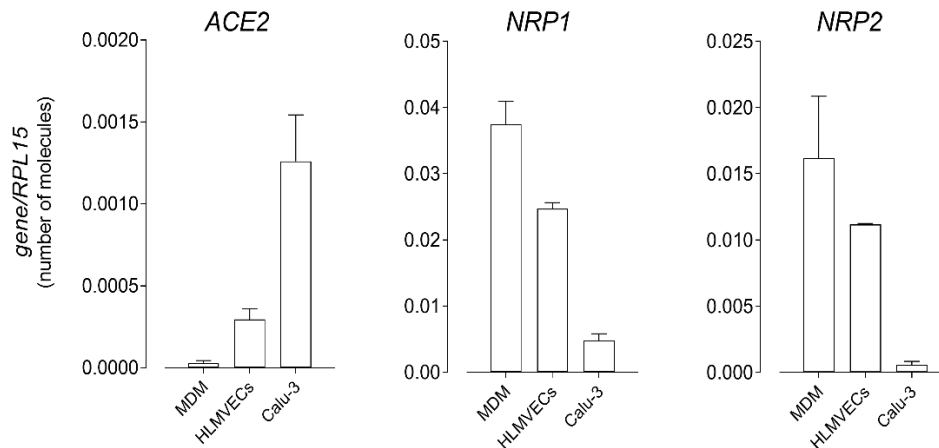


Figura 18. Espressione di ACE2, NRP1 e NRP2 in MDM, HMLVEC e Calu3. Il numero assoluto di molecole di mRNA per i geni indicati è stato calcolato nei MDM, nelle HLMVEC e nelle Calu-3 mediante RT-qPCR ed espresso in relazione a quello del gene housekeeping RPL15, come descritto nella sezione Materiali e Metodi. I dati sono espressi come media \pm SEM (errore standard di misura) di sei (MDM) o tre (HLMVEC e Calu-3) determinazioni, ciascuna eseguita in duplicato.

Lo studio è quindi proseguito valutando gli effetti della proteina Spike S1 sul fenotipo e sulla funzione delle cellule endoteliali, sia diretti che mediati dal sistema immunitario.

Poiché le cellule endoteliali sono in grado di rispondere agli stimoli esterni producendo un'ampia gamma di mediatori che regolano il tono vascolare, l'adesione cellulare, la coagulazione, la proliferazione delle cellule muscolari lisce e l'infiammazione della parete dei vasi, gli effetti della proteina S1 erano stati inizialmente valutati sull'espressione di alcune delle principali molecole di adesione, responsabili del mantenimento dell'integrità strutturale endoteliale. Tra queste, particolarmente rilevanti sono E-selectina e P-selectina, notoriamente indotte in risposta alle citochine proinfiammatorie, quali le interleuchine IL-1 β e IL-6 e il TNF α , così come le molecole responsabili dell'interazione con i leucociti, ICAM-1 (molecola di adesione intercellulare-1, nota anche come CD54) e VCAM-1 (molecola di adesione delle cellule vascolari-1, nota anche come CD106) [72]. PECAM-1 (Molecola di adesione delle cellule endoteliali e delle piastrine 1), infine, è altamente espressa nelle giunzioni tra cellule endoteliali dove, in risposta ad uno stress, cerca di mantenere l'integrità e accelerare il ripristino della barriera di permeabilità vascolare dopo un evento infiammatorio o trombotico.

Le cellule sono state quindi incubate per 6h in presenza di concentrazioni crescenti (da 0,25 a 25 nM) di S1; è stata poi valutata l'attivazione endoteliale in termini di espressione delle molecole di adesione quali ICAM-1, VCAM-1 e PECAM-1 ed anche di altre molecole quali la chemochina CXCL8 e MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1). Come indicato nella Figura 19, i livelli di mRNA di entrambi i membri della superfamiglia delle immunoglobuline ICAM-1 e VCAM-1 risultano indotti dalla proteina Spike in maniera dose-dipendente, mentre l'espressione di PECAM1/CD31 non appare modificata da nessuna concentrazione di proteina Spike. Nelle stesse condizioni, i dati ottenuti mostrano un leggero aumento nell'espressione delle chemochine CXCL8/IL-8 e, ancora più marcatamente, di CCL2/MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) e CXCL10/IP-10 (IFN γ inducible protein 10); per quest'ultima, l'induzione appariva particolarmente elevata essendo i livelli basali di espressione molto bassi nelle cellule non trattate (Figura 19).

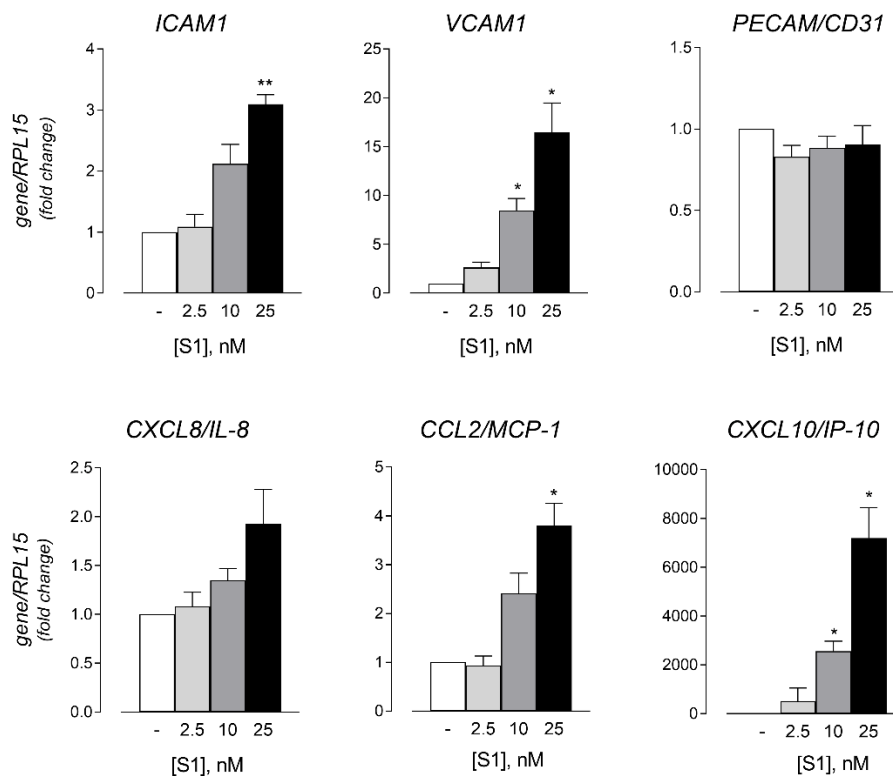


Figura 19. Effetto di dosi crescenti di proteina Spike S1 sul fenotipo endoteliale. Le cellule HLMVEC sono state incubate per 6 ore in assenza (-) o in presenza delle concentrazioni indicate di proteina Spike di SARS-CoV-2 (S1). L'espressione dei geni indicati è stata quindi misurata mediante RT-qPCR, normalizzata per quella del gene housekeeping RPL15, e per le cellule di controllo espresse (=1). I dati sono la media SEM di tre esperimenti, ciascuno eseguito in duplicato. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. nessuno (-) con "t-test a campione singolo".

Successivamente, per indagare il possibile coinvolgimento delle cellule immunitarie negli effetti della proteina Spike sulle cellule endoteliali, il nostro studio è proseguito con esperimenti condotti trattando cellule endoteliali microvascolari polmonari umane (HLMVEC) con terreno CM_cont e CM_S1. Per valutare in modo specifico l'effetto immunomediato della proteina Spike sull'attivazione dell'endotelio, le cellule HLMVEC sono state incubate per 6 ore in presenza di CM_cont e CM_S1. I risultati hanno evidenziato un'induzione dell'espressione genica delle molecole di adesione ICAM-1 e VCAM-1 (Figura 20), ancora più evidente di quanto osservato in seguito a trattamento diretto con 10 nM di Spike S1 (Figura 19). In accordo con questi dati, l'analisi proteica tramite Western Blot ha rivelato l'espressione evidente delle corrispondenti proteine nelle cellule trattate con CM_S1, mentre erano assenti nel trattamento con la sola S1. Al contrario, l'espressione di PECAM1/CD31 non ha mostrato variazioni rilevanti tra i diversi trattamenti.

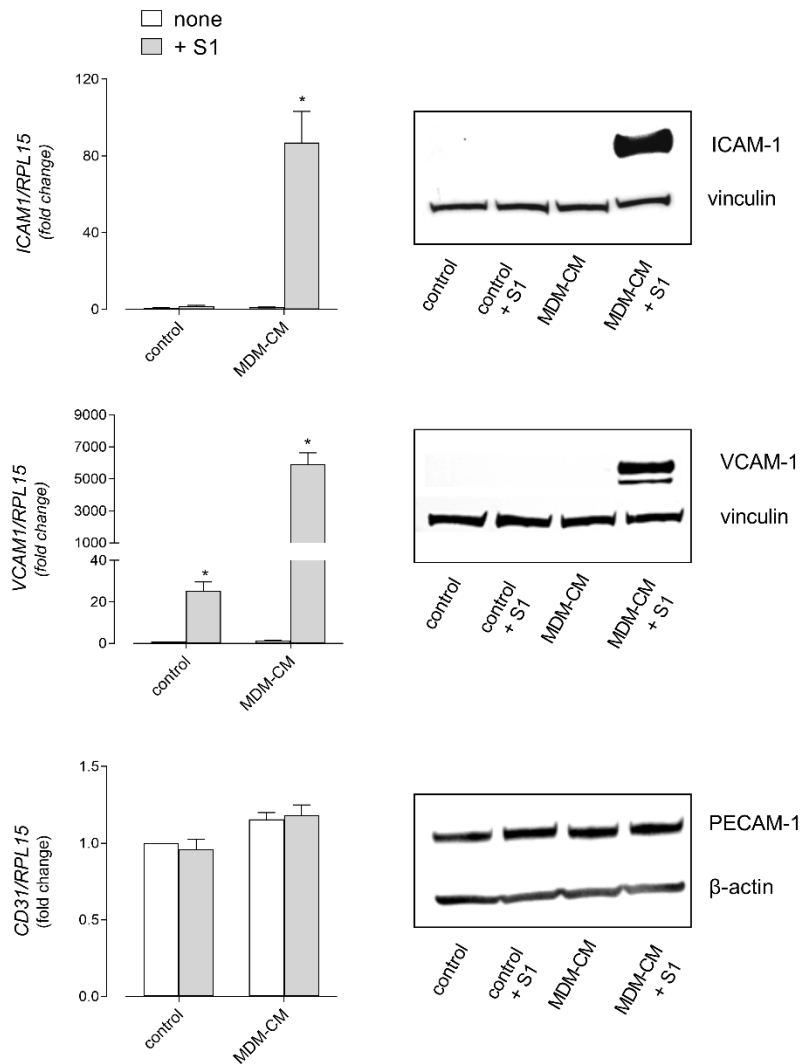


Figura 20. Effetti del trattamento con MDM-CM sull'espressione di molecole di adesione nelle cellule endoteliali. Le cellule HLMVEC sono state incubate per 6 ore in un terreno di coltura fresco RPMI1640 (controllo) in assenza (nessuno) o in presenza di 10 nM di proteina Spike SARS-CoV-2 (S1) o in un terreno condizionato MDM (MDM-CM), ottenuto incubando MDM per 24 ore in assenza (nessuno) o in presenza di 10 nM di S1. L'espressione dei geni indicati (pannelli di sinistra) è stata quindi misurata mediante RT-qPCR, normalizzata per quella del gene housekeeping RPL15 ed espressa rispetto a nessuno nelle cellule di controllo (=1); I dati sono medie \pm errore standard di tre esperimenti, ciascuno eseguito in duplicato. * $p < 0,05$ vs. nessuno nel controllo con "test t a campione singolo". La quantità delle proteine corrispondenti (riquadri a destra) è stata valutata mediante analisi Western Blot (vedi Sezione 2); i blot rappresentativi mostrati sono stati ripetuti due volte e hanno fornito risultati comparabili.

Utilizzando lo stesso approccio sperimentale, cioè in cellule endoteliali trattate con medium condizionato, è stata analizzata l'espressione di molecole di adesione e citochine pro-infiammatorie. Come illustrato in Figura 21, i risultati mostrano un incremento ancora più marcato dell'espressione genica di CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1 e CXCL10/IP-10 rispetto al trattamento diretto con la sola proteina Spike (per confronto si veda Figura 19).

In modo analogo, anche l'espressione di citochine infiammatorie come IL-1 β , e in misura più significativa IL-6 e TNF α , risulta notevolmente potenziata nelle cellule incubate con CM_S1 rispetto a quelle esposte unicamente alla proteina virale.

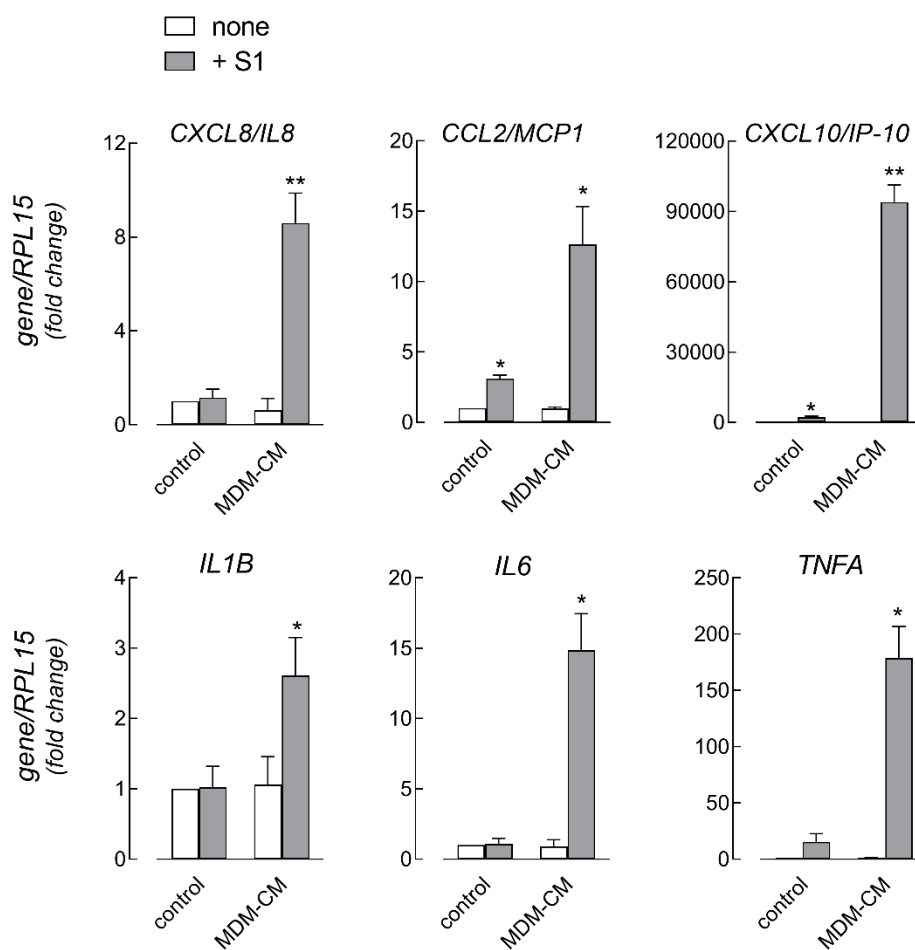


Figura 21. Effetti del trattamento con MDM-CM sullo stato di attivazione delle HMLVEC. Le cellule HLMVEC sono state incubate per 6 ore in RPMI1640 fresco (controllo) o in terreno condizionato con MDM (MDM-CM), come descritto in Figura 20. L'espressione dei geni indicati è stata quindi misurata mediante RT-qPCR, normalizzata per quella del gene housekeeping RPL15, ed espressa rispetto a nessuno nelle cellule di controllo (=1). I dati sono la media \pm SEM di tre esperimenti, ciascuno eseguito in duplicato. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. nessuno nel controllo con "test t a campione singolo".

Gli effetti sia diretti che immunomediati della proteina Spike S1 sono stati poi valutati sul fenotipo pro-coagulante delle cellule endoteliali, focalizzando l'attenzione sull'espressione di marcatori implicati nella regolazione della coagulazione: la Trombomodulina (THBD), con funzione anticoagulante, e il Tissue Factor (TF/F3), promotore della coagulazione. L'esposizione delle cellule endoteliali unicamente alla proteina S1 ha determinato una riduzione moderata, ma significativa, dell'espressione di THBD, accompagnata da un lieve aumento del trascritto per TF (Figura 22). Tali alterazioni risultano tuttavia notevolmente amplificate quando le cellule HLMVEC vengono trattate con terreno condizionato derivato da macrofagi stimolati con Spike (CM_S1). In queste condizioni, è stata osservata anche l'evidente comparsa della proteina TF tramite Western blot, non rilevabile invece nel trattamento con la sola proteina virale. Nel complesso, questi dati rafforzano l'evidenza che la proteina Spike di SARS-CoV-2 sia in grado di promuovere un fenotipo endoteliale pro-coagulante, un effetto che risulta notevolmente potenziato in presenza della risposta immunitaria innata attivata dalla stessa proteina.

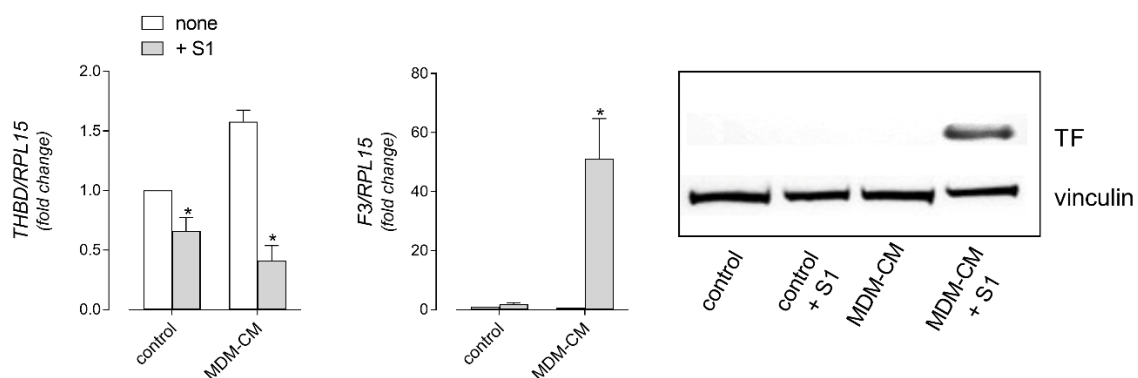


Figura 22. Effetti della proteina Spike S1 e del MDM-CM sulla produzione di markers correlati alla coagulazione in cellule endoteliali. Le cellule HLMVEC sono state incubate per 6 ore in RPMI1640 fresco (controllo) o in terreno condizionato MDM (MDM-CM), come descritto in Figura 20. L'espressione dei geni indicati (pannelli sinistro e centrale) è stata quindi misurata mediante RT-qPCR, normalizzata per quella del gene housekeeping RPL15, ed espressa rispetto a nessuno nelle cellule di controllo (=1); i dati sono medie \pm SEM di tre esperimenti, ciascuno eseguito in duplicato. * $p < 0,05$, vs. nessuno nel controllo, con "test t a campione singolo". La quantità della proteina fattore tissutale (TF) è stata valutata mediante analisi Western Blot, come descritto in Materiali e Metodi (pannello destro); il blot rappresentativo mostrato è stato ripetuto due volte e ha fornito risultati comparabili.

Effetti immunomediati di Spike S1 sulla vitalità dell'endotelio

Dunque, i mediatori infiammatori rilasciati dai macrofagi trattati con la proteina Spike rafforzano l'attivazione delle cellule endoteliali, stimolando l'espressione di molecole di adesione, marcatori procoagulanti e chemochine, contribuendo probabilmente alla compromissione dell'integrità vascolare. Per approfondire ulteriormente questo aspetto, lo studio è proseguito valutando gli effetti del CM_S1 sull'integrità endoteliale in termini di vitalità e proliferazione delle cellule endoteliali.

Per valutare l'impatto immunomediato della proteina Spike S1 di SARS-CoV-2 sull'integrità delle cellule endoteliali, abbiamo inizialmente esposto cellule HUVEC a CM_cont e CM_S1, monitorando la proliferazione cellulare in diversi momenti temporali. I dati ottenuti evidenziano che, mentre il CM_cont determina solo una leggera riduzione della crescita rispetto al controllo in condizioni di coltura standard, l'incubazione con CM_S1 compromette in modo significativo la proliferazione delle cellule endoteliali, riducendone il numero di circa la metà dopo 72 ore di trattamento (Figura 23A, pannello sinistro). Oltre alla riduzione della crescita, il CM_S1 ha anche indotto marcate alterazioni morfologiche, chiaramente osservabili tramite microscopia a contrasto di fase (Figura 23A, pannello destro). In presenza di CM_S1, le cellule HUVEC si presentano meno numerose e mostrano una morfologia allungata e fusiforme, in contrasto con l'aspetto tipicamente poligonale osservato nei controlli. Al contrario, le cellule trattate con CM_cont non hanno mostrato variazioni significative né in termini di densità né di morfologia.

Per definire meglio i meccanismi coinvolti nella riduzione osservata della popolazione cellulare, abbiamo successivamente misurato l'espressione di geni e proteine correlati al ciclo cellulare. A tal fine, abbiamo inizialmente analizzato il livello di mRNA di due noti inibitori della progressione del ciclo cellulare, p21 e p27 [73]. Dopo l'incubazione con CM_S1, è stata rilevata una significativa induzione dell'mRNA di p21, ma non di p27, rispetto alle cellule trattate con CM_cont (Figura 23B, pannello sinistro). Coerentemente, un aumento transitorio della proteina p21 è stato evidente subito dopo 4 ore di incubazione con CM_S1, sebbene un leggero aumento sia stato osservato anche con CM_cont. Dopo 24 ore in presenza di CM_S1, l'espressione di p21 è tornata ai livelli basali, mentre la proteina Rb, regolatore centrale del ciclo cellulare [74], appariva ipofosforilata (Figura 23B, pannello destro). Pertanto, la diminuzione del numero di cellule osservata in queste condizioni era probabilmente correlata a un arresto del ciclo cellulare, dovuto all'ipofosforilazione di Rb mediata dall'induzione della proteina p21.

In parallelo, è stata esaminata anche la possibilità che il terreno condizionato da macrofagi stimolati con la proteina Spike (CM_S1) potesse indurre effetti citotossici sulle cellule endoteliali. A tal fine, è stato analizzato l'eventuale incremento della morte cellulare mediante citometria a flusso, utilizzando la doppia colorazione con annessina V e ioduro di propidio (Figura 23C). I risultati ottenuti mostrano che l'esposizione delle HUVEC a CM_cont per 48 ore comporta una riduzione significativa della percentuale di cellule vitali rispetto al controllo in condizioni basali ($76,6 \pm 1,78\%$ vs. $80,8 \pm 0,48\%$) e un aumento delle cellule in apoptosi tardiva ($16,6 \pm 2,06\%$ rispetto all' $11,8 \pm 1,6\%$). Tuttavia, l'effetto è risultato notevolmente più marcato in presenza di CM_S1: in queste condizioni, la popolazione di cellule vitali si è ulteriormente ridotta al $66,2 \pm 3,7\%$, mentre le cellule in apoptosi tardiva sono aumentate fino al $27,9 \pm 2,6\%$. Coerentemente, la percentuale complessiva di cellule non vitali è passata dal $23,4 \pm 2\%$ (CM_cont) al $33,8 \pm 2,6\%$ (CM_S1), indicando che il trattamento con terreno condizionato da macrofagi esposti alla proteina Spike induce una chiara risposta citotossica nelle cellule endoteliali in vitro.

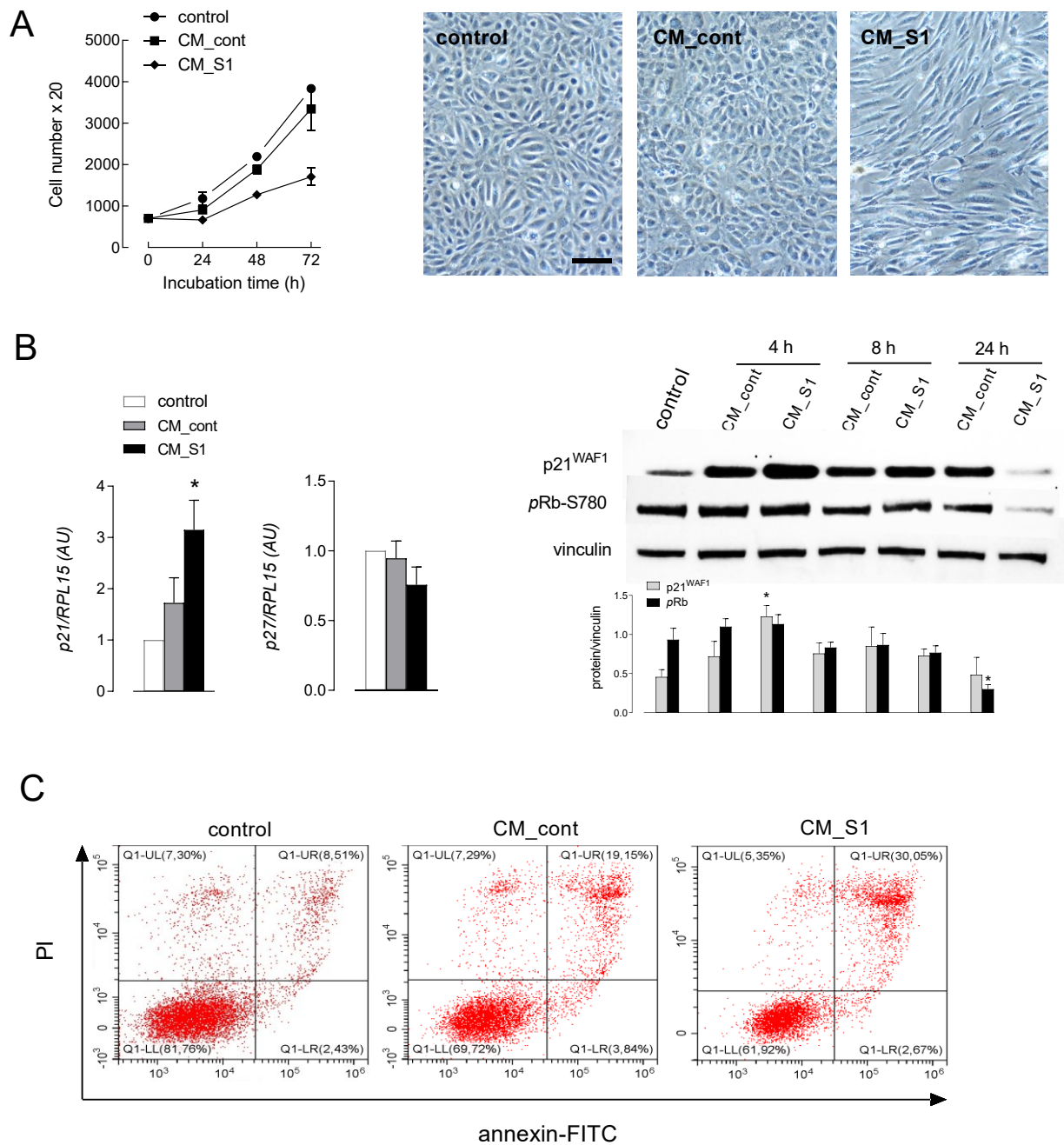


Figura 23. Effetti del CM_S1 sull'integrità endoteliale. Le cellule HUVEC sono state mantenute in terreno di coltura (controllo) o trattate con terreno condizionato ottenuto incubando macrofagi derivati da monociti in assenza (CM_cont) o in presenza di 5 nM di S1 (CM_S1). (A) La proliferazione cellulare è stata determinata come specificato nella sezione Materiali e Metodi ai tempi di incubazione indicati. Ogni punto rappresenta il terreno \pm DS di tre determinazioni in un esperimento rappresentativo che, ripetuto tre volte, ha fornito risultati comparabili. A destra: sono mostrate le immagini di microscopia a contrasto di fase delle cellule trattate per 72 ore. Barra = 100 μ M. (B) Dopo 4 ore, l'espressione dell'mRNA degli inibitori del ciclo cellulare p21 e p27 (a sinistra) è stata misurata mediante RT-qPCR ed espressa come variazione del folding delle cellule di controllo (=1). Le barre rappresentano le medie \pm SEM di quattro esperimenti indipendenti, ciascuno eseguito in

duplicato. * $p < 0,05$ rispetto al controllo con test di Kruskal-Wallis. Ai tempi indicati, l'espressione di p21WAF1 e delle proteine Rb fosforilate è stata valutata mediante analisi Western blot (a destra), come descritto nella sezione Materiali e Metodi. Sono mostrati blot rappresentativi, insieme alla media \pm DS dell'analisi densitometrica di tre diversi esperimenti. * $p < 0,05$ rispetto alle cellule di controllo con test di Kruskal-Wallis. (C) Dopo 48 ore di trattamento, la morte cellulare è stata valutata mediante citometria a flusso dopo colorazione con annessina V-FITC/ioduro di propidio (vedere Materiali e Metodi). Sono mostrati diagrammi di dispersione rappresentativi con la percentuale indicata di cellule vitali e apoptotiche/necrotiche su 10.000 eventi. Gli esperimenti sono stati replicati tre volte con risultati comparabili; il pannello di destra mostra la media \pm DS delle cellule vitali (LL) e morte (UL + UR + LR) nei tre esperimenti.

Effetti immunomediati di Spike S1 sul metabolismo dell'arginina nelle cellule endoteliali

Prove crescenti suggeriscono che l'infezione da SARS-CoV-2 determini alterazioni del metabolismo dell'arginina che, nei pazienti con COVID-19, sono state associate a disfunzione immunitaria e vascolare [75]. L'arginina è un amminoacido semi-essenziale, metabolizzato alternativamente dall'ossido nitrico sintasi (NOS) a citrullina e ossido nitrico (NO) o dall'arginasi (Arg) a urea e ornitina. Le cellule endoteliali esprimono l'isoforma costitutiva eNOS [76] e l'NO sintetizzato rappresenta il meccanismo chiave per il mantenimento dell'omeostasi endoteliale attraverso la regolazione del tono vascolare e un'azione antitrombotica [77]. In realtà, è stato dimostrato che la perdita di NO derivato dall'endotelio provoca gravi anomalie cardiovascolari [78]. Per quanto riguarda l'arginasi invece, due distinte isoforme dell'enzima sono state rilevate nelle cellule endoteliali, ovvero l'arginasi I citosolica (Arg1) e l'arginasi II mitocondriale (Arg2). Arg1 è espressa principalmente nel fegato, dove è coinvolta nella sintesi dell'urea; Arg2 è, invece, ampiamente espressa in diversi tessuti, dove, promuovendo la sintesi di L-ornitina, precursore delle poliammine e della prolina, regola la sintesi del collagene, la riparazione tissutale e la proliferazione [79].

Per approfondire i meccanismi coinvolti nelle complicanze vascolari associate all'infezione da SARS-CoV-2, l'attenzione si è concentrata sull'analisi del metabolismo dell'arginina nelle HUVEC.

In particolare, è stato indagato il ruolo delle vie metaboliche dell'arginina nel danno endoteliale mediato dalla risposta immunitaria indotta dalla proteina Spike S1 del virus. A tale scopo, le HUVEC sono state incubate per 4 e 24 ore con terreno condizionato da macrofagi non trattati (CM_cont) o trattati con Spike (CM_S1). Come illustrato in Figura 24 (Pannello A), l'esposizione a CM_S1 ha determinato una riduzione dell'mRNA codificante per l'enzima endoteliale ossido nitrico sintasi

(eNOS/NOS3), con una soppressione statisticamente significativa osservata a 24 ore. Il calo dell'espressione genica si è tradotto in una marcata riduzione dei livelli proteici di eNOS, rilevata mediante Western blot dopo 24 e 48 ore (Pannello B), dove risultava visibile solo una debole banda specifica nelle cellule trattate con CM_S1. Parallelamente, si è osservato un aumento significativo dell'espressione dell'enzima arginasi (ARG2), sia a livello trascrizionale (Pannello C) dopo 24 ore, sia a livello proteico (Pannello D), con un accumulo progressivo della proteina riscontrata dopo 24 e 48 ore di trattamento. Nel complesso, questi risultati dimostrano che il terreno condizionato derivante da macrofagi attivati dalla proteina Spike modula negativamente l'espressione di NOS3/eNOS, inibendo così la produzione fisiologica di ossido nitrico (NO), e promuove contestualmente l'induzione dell'enzima arginasi, spostando il metabolismo dell'arginina verso un profilo disfunzionale. Questa doppia modulazione contribuisce verosimilmente alla compromissione della funzione endoteliale, in accordo con osservazioni cliniche che descrivono un'alterazione del metabolismo dell'arginina nei pazienti affetti da COVID-19.

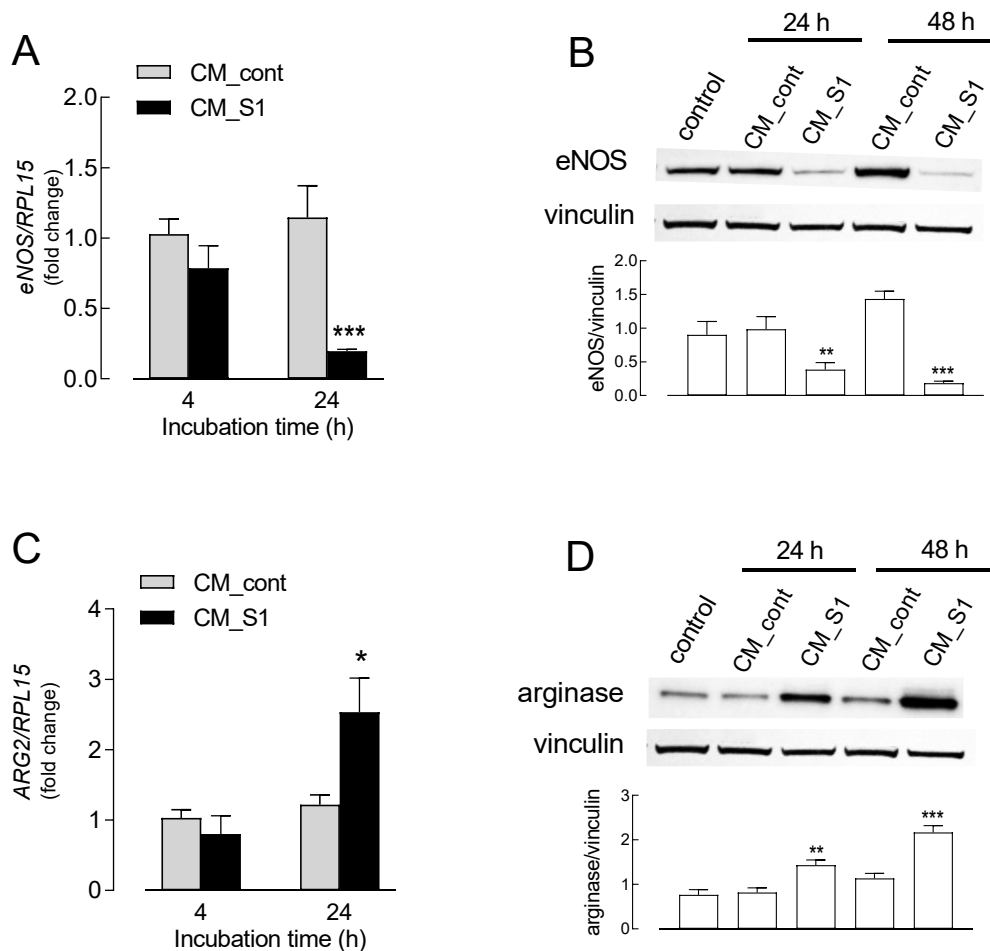


Figura 24. Effetti del CM_S1 sull'espressione di arginasi in cellule endoteliali. Le cellule HUVEC sono state incubate in terreno condizionato (CM) ottenuto da macrofagi derivati da monociti non trattati (CM_cont) o trattati per 24 ore con la proteina S1 (CM_S1); come controllo, le cellule sono state mantenute in terreno RPMI1640. Dopo 4 e 24 ore, i livelli di mRNA di NOS3 (Pannello A) e ARG2 (Pannello C) sono stati valutati con RT-qPCR e mostrati come induzione rispetto al controllo (= 1). Le barre rappresentano le medie \pm SEM di quattro esperimenti eseguiti in duplicato. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ rispetto al controllo con test t di Student. L'espressione proteica di eNOS (Pannello B) e arginasi (Pannello D) è stata determinata con Western Blot, come descritto nella sezione Materiali e Metodi. Sono mostrati blot rappresentativi, insieme alla media \pm SEM dell'analisi densitometrica in tre diversi esperimenti. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ rispetto alle cellule di controllo con ANOVA unidirezionale

Meccanismi molecolari sottostanti gli effetti immunomediati di Spike S1 sulle cellule endoteliali

Poiché nei precedenti esperimenti condotti su cellule epiteliali alveolari A549 abbiamo osservato l'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B da parte del CM_S1, nonché il ruolo centrale svolto da IRF1 nella regolazione del ciclo cellulare, abbiamo voluto indagare se la ridotta vitalità delle cellule

endoteliali osservata nelle stesse condizioni sperimentali potesse dipendere dall'attivazione dei pathways mediati da STAT1/IRF1 e NF- κ B. I risultati riportati in Figura 25 mostrano in modo chiaro che né IRF1 né STAT1 risultano attivati nelle cellule HUVEC mantenute in terreno di controllo o trattate con CM_cont. Al contrario, l'incubazione con CM_S1 induce un'attivazione transitoria ma marcata di IRF1, accompagnata da un significativo aumento della fosforilazione di STAT1, indicando una chiara attivazione della via JAK/STAT. Parallelamente, in risposta al CM_S1 si osserva anche un'attivazione persistente del pathway di NF- κ B, come evidenziato dalla fosforilazione della subunità p65 e del suo inibitore I κ B α . Questi risultati suggeriscono che la compromissione della vitalità endoteliale sia riconducibile, almeno in parte, all'attivazione congiunta delle vie pro-infiammatorie IRF1/STAT1 e NF- κ B.

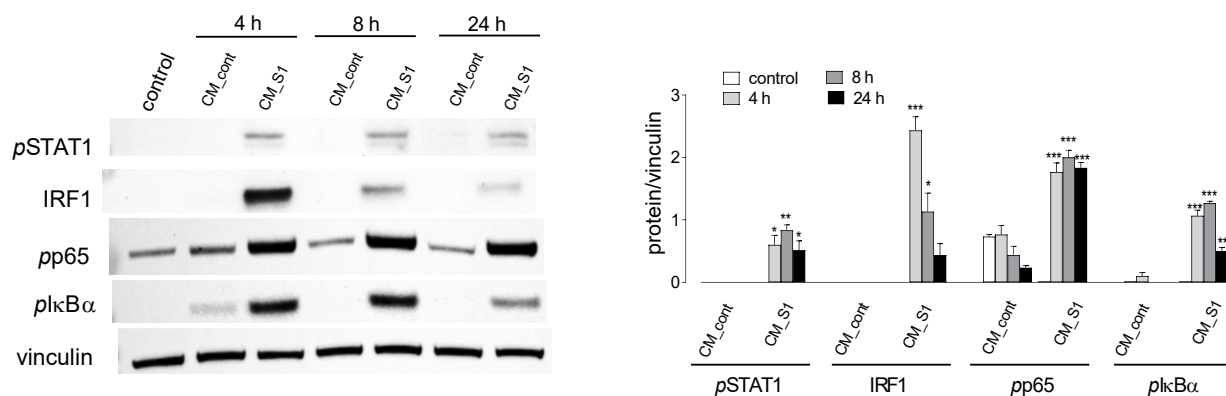


Figura 25. Effetti del CM_S1 sui pathways molecolari mediati da NF- κ B e IRF1 in cellule endoteliali. Le HUVECs sono state mantenute in medium di crescita (controllo) o incubate in CM_cont o in CM_S1 per i tempi indicati. L'espressione delle proteine è stata valutata mediante analisi Western blot. Sono mostrati blot rappresentativi (a sinistra); è mostrata anche la media \pm SD dell'analisi densitometrica di tre diversi esperimenti (a destra). * $p < 0,05$ rispetto alle cellule di controllo tramite test di Kruskal-Wallis.

Alla luce di questi risultati e considerando gli effetti protettivi osservati per il baricitinib sulle cellule epiteliali A549, lo studio si è successivamente concentrato sulla valutazione della sua efficacia nella modulazione della risposta infiammatoria endoteliale indotta dai mediatori rilasciati da macrofagi attivati dalla proteina Spike. A questo scopo, cellule HUVEC sono state trattate con CM_cont o CM_S1; in quest'ultima condizione, il baricitinib è stato aggiunto 2 ore prima dell'incubazione con il CM_S1.

Come evidenziato precedentemente, il trattamento con CM_S1 induce una marcata attivazione endoteliale, confermata dall'aumentata espressione delle molecole di adesione ICAM-1 e VCAM-1. Tuttavia, la somministrazione di baricitinib si è rivelata inefficace nel contrastare l'induzione di VCAM-1, mentre ha determinato una lieve riduzione dei livelli di ICAM-1, sia a livello trascrizionale che proteico (Figura 26).

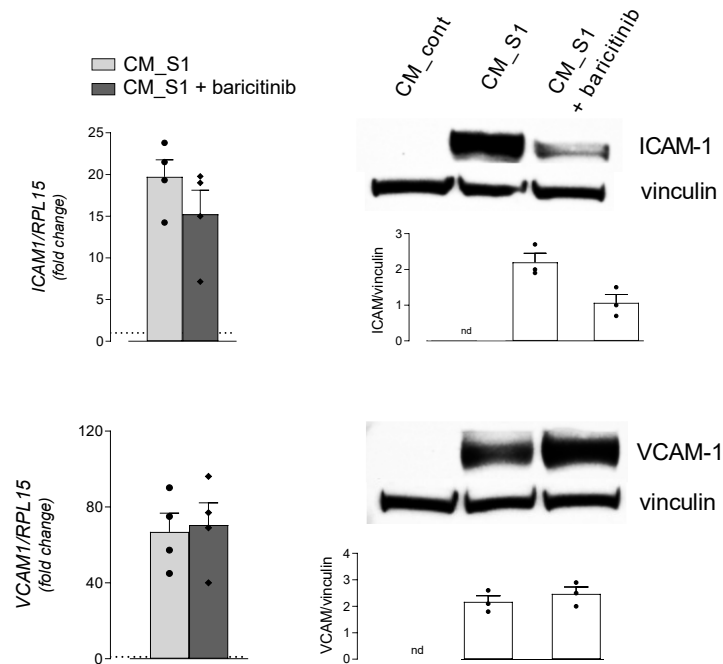


Figura 26. Effetti del baricitinib sull'induzione di molecole di adesione in cellule endoteliali. Le HUVEC sono state incubate in un terreno condizionato con MDM, ottenuto incubando MDM per 24 ore in assenza (CM_cont) o in presenza della proteina S1 (CM_S1); il baricitinib è stato aggiunto a CM_S1 2 ore prima dell'esperimento e mantenuto per tutta la durata. Dopo 4 ore, l'espressione dei geni indicati (pannelli di sinistra) è stata misurata mediante RT-qPCR e calcolata rispetto a CM_cont (=1; linea tratteggiata) previa normalizzazione per il gene housekeeping RPL15. Le barre rappresentano le medie SEM di quattro esperimenti (punti singoli), ciascuno eseguito in duplicato. Dopo 6 ore, la quantità delle proteine corrispondenti (pannelli di destra) è stata valutata mediante analisi Western Blot (vedere Materiali e Metodi); sono mostrati blot rappresentativi, insieme alla media delle analisi densitometriche (barre) di tre diversi esperimenti (punti singoli).

Nelle stesse cellule, l'incubazione con CM_S1 stimola inoltre in modo significativo l'espressione di numerose citochine e chemochine, in particolare IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8, MCP-1, IP-10 e RANTES (Figura 27). L'aggiunta di baricitinib previene completamente l'induzione di IL-6, IP-10 e RANTES, lasciando inalterata l'espressione di tutti gli altri mediatori testati.

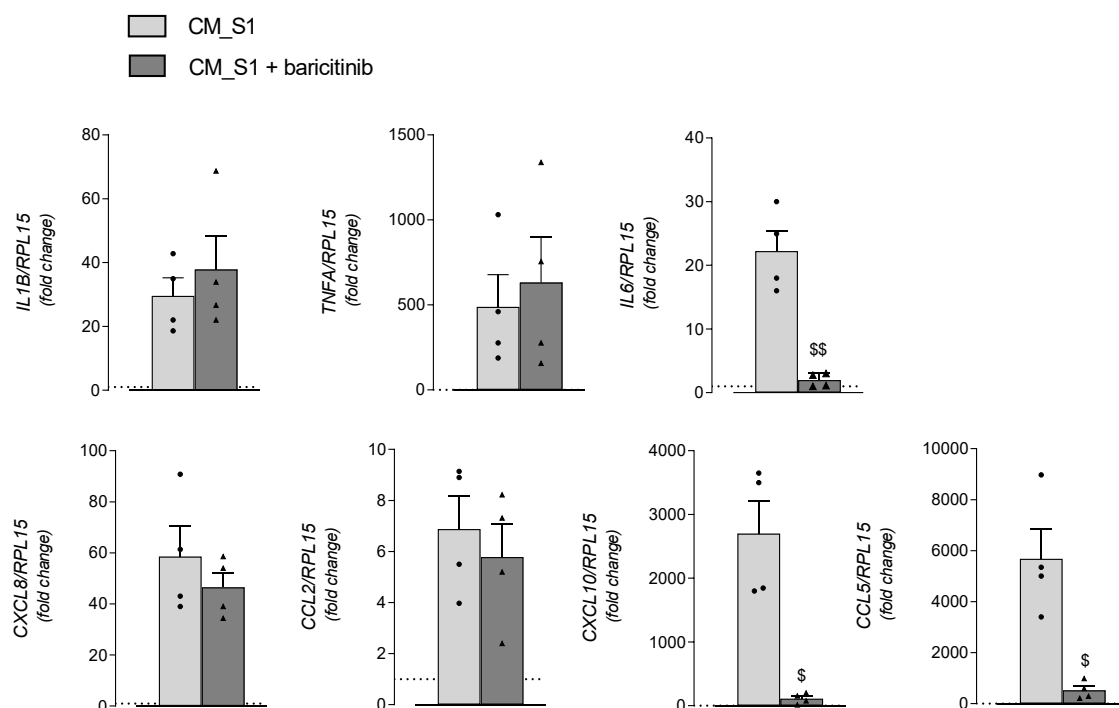


Figura 27. Effetti del baricitinib sull'induzione di citochine infiammatorie in cellule endoteliali. Le cellule HUVEC sono state incubate per 4 ore come descritto in Figura 26. L'espressione dei geni indicati è stata misurata mediante RT-qPCR e calcolata relativamente a CM_cont (=1; linea tratteggiata) dopo la normalizzazione per il gene housekeeping RPL15. Le barre rappresentano le medie SEM di quattro esperimenti (punti singoli), ciascuno eseguito in duplicato. \$ $p < 0,05$, \$\$ $p < 0,01$ rispetto alle cellule trattate con S1 con test t di Student.

DISCUSSIONE

1. La disfunzione polmonare durante l'infezione da SARS-CoV-2

La prima parte di questo lavoro di tesi ha riguardato la comprensione dei fenomeni alla base del danno polmonare causato dall'infezione da SARS-CoV-2. I meccanismi patogenetici precisi alla base dell'insorgenza della sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS) nei casi gravi di COVID-19 risultano ancora parzialmente non chiariti. Tuttavia, un numero crescente di evidenze, provenienti sia da studi clinici che da modelli sperimentali in vitro e in vivo, attribuisce un ruolo centrale al rilascio massiccio di mediatori pro-infiammatori — il fenomeno noto come "tempesta citochinica". Questo processo coinvolge in modo rilevante le cellule dell'immunità innata, come i macrofagi e i monociti, così come le cellule epiteliali del tratto respiratorio, che contribuiscono all'amplificazione della risposta infiammatoria locale e sistemica [80]. A questo proposito, l'analisi condotta in questo studio sulla risposta delle cellule epiteliali alveolari all'incubazione con terreno condizionato da macrofagi attivati dalla proteina Spike S1 ha evidenziato una marcata secrezione di mediatori infiammatori. Questi risultati indicano che tali cellule non solo rappresentano un bersaglio dell'infiammazione, ma agiscono anche come fonte attiva di citochine e chemochine. In particolare, le cellule alveolari rispondono ai segnali presenti nel terreno condizionato con una significativa induzione dell'espressione e del rilascio della citochina IL-6, nonché delle chemochine MCP-1, RANTES e IL-8. Tra i mediatori analizzati, l'IL-8 rappresenta un'eccezione rilevante: già abbondantemente secreta dai macrofagi attivati con S1, la sua produzione risulta ulteriormente amplificata dalle cellule epiteliali A549 in risposta al terreno condizionato, raggiungendo concentrazioni estremamente elevate nell'ambiente extracellulare. Questo risultato è coerente con le evidenze cliniche che, oltre a riconoscere un ruolo centrale dell'IL-6 come marcatore di gravità del COVID-19 [81], riportano livelli aumentati di IL-8 nei pazienti con ARDS correlata al COVID-19 [82] e nei pazienti con COVID-19 grave [83]; inoltre, elevati livelli sierici di IL-8, insieme a IL-6 e TNF α , sono stati associati a una scarsa sopravvivenza [84].

Lo studio ha inoltre indagato i potenziali meccanismi di danno a carico delle cellule epiteliali alveolari, attribuibili all'eccessiva secrezione di citochine. Un elemento distintivo della sindrome da distress respiratorio acuto associata a COVID-19 (CARDS) è infatti il danno alveolare diffuso (DAD), caratterizzato da una massiva morte cellulare che coinvolge sia le cellule epiteliali che quelle endoteliali. Questo processo è fortemente correlato alla cosiddetta "tempesta citochinica", generata dall'attivazione aberrante delle cellule immunitarie innate e, come emerso in questo studio, anche

delle cellule epiteliali stesse. Tali cellule, infatti, non solo agiscono come bersagli dell'inflammatione, ma contribuiscono attivamente al mantenimento e all'amplificazione del microambiente infiammatorio polmonare [85]. In questo contesto, un ruolo di primo piano è attribuibile ai macrofagi, inclusi i macrofagi alveolari residenti (AM) e i monociti/macrofagi transitori reclutati dal sangue [86]. In questo lavoro, approfondendo gli effetti del terreno condizionato ricco di citochine (CM_S1), derivato da macrofagi attivati dalla proteina Spike S1, sulle cellule alveolari A549, abbiamo riscontrato marcati cambiamenti morfologici accompagnati da un evidente arresto proliferativo in fase G0/G1. In tali condizioni, le cellule epiteliali hanno mostrato ulteriori alterazioni funzionali, tra cui l'induzione dell'autofagia. In linea con questi risultati, il trattamento con medium condizionato di macrofagi attivati da Spike S1 ha determinato un aumento significativo dell'espressione di geni associati sia al processo autofagico sia al sistema ubiquitina-proteasoma, i due principali meccanismi intracellulari deputati al controllo della qualità e al turnover delle proteine, noti per essere funzionalmente interconnessi. Questi dati suggeriscono che l'esposizione prolungata a un microambiente infiammatorio, come quello riprodotto dal terreno condizionato, comprometta profondamente l'omeostasi cellulare epiteliale, favorendo risposte di tipo adattativo piuttosto che citotossico, almeno nelle prime fasi dell'esposizione [87]. Più precisamente, l'analisi ha evidenziato una marcata induzione dell'espressione di UBD (Ubiquitin D), un marcatore del pathway di degradazione proteasoma-dipendente, accompagnata da una sovraregolazione della subunità β tipo 8 del proteasoma (PSMB8), componente dell'immunoproteasoma. Contestualmente, è stata osservata un'attivazione ancora più pronunciata di TRIM22, una proteina inducibile dall'interferone, nota per il suo ruolo nell'amplificare il processo autofagico in diverse tipologie cellulari. Questi dati confermano che il terreno condizionato derivato da macrofagi attivati dalla proteina Spike S1 promuove l'attivazione di vie degradative intracellulari complesse, come autofagia e degradazione proteasomiale, suggerendo un tentativo da parte delle cellule epiteliali di mantenere l'omeostasi proteica in risposta a uno stress infiammatorio prolungato [88]. Il destino cellulare in seguito all'attivazione dell'autofagia nelle nostre condizioni sperimentali rimane da chiarire. L'autofagia è ampiamente riconosciuta come un meccanismo cellulare di sopravvivenza, fondamentale nella risposta dell'organismo a condizioni di stress e coinvolto nella protezione contro numerose patologie, tra cui malattie degenerative, infiammatorie, neoplastiche e infettive. In particolare, studi recenti hanno dimostrato che l'infezione con pseudovirioni di SARS-CoV-2 è in grado di attivare il processo autofagico in almeno tre differenti modelli cellulari, suggerendo un ruolo diretto della componente virale nella modulazione di questa via intracellulare [89]. In realtà, è noto che

un'eccessiva attivazione dell'autofagia può portare alla morte cellulare. Nelle nostre condizioni sperimentali, al contrario, l'induzione dell'autofagia, almeno fino a 72 ore di incubazione, non è associata a segni di morte cellulare. La discrepanza tra i risultati ottenuti nel nostro studio e quelli riportati in letteratura potrebbe essere attribuibile alla diversa natura degli stimoli utilizzati per attivare l'autofagia. Nel nostro modello sperimentale, infatti, l'induzione dell'autofagia nelle cellule alveolari A549 non è provocata da un'infezione virale diretta, bensì dall'esposizione a un terreno di coltura condizionato ricco di citochine proinfiammatorie, derivante da macrofagi attivati dalla proteina Spike S1. Le citochine infiammatorie sono a loro volta noti induttori del processo autofagico: in particolare, l'IFN γ è stato ampiamente descritto come un fattore capace di stimolare l'autofagia, che può a sua volta amplificare la risposta infiammatoria promuovendo il rilascio di ulteriori citochine, instaurando così un circuito di feedback positivo [90]. Pertanto, sebbene non si possa escludere il coinvolgimento di altri mediatori, è probabile supporre che gli effetti descritti siano principalmente attribuibili all'IFN γ , la cui quantità è significativamente maggiore nel terreno condizionato da cellule S1- attivate rispetto a quelle non trattate. In effetti, nelle nostre condizioni sperimentali, l'aumentata regolazione di IRF1, un fattore di trascrizione specificamente indotto dagli IFN di tipo II [91], sostiene un ruolo dell'IFN γ nell'attivazione dell'autofagia. Tra le numerose funzioni mediate da IRF1, si è scoperto che la sovraespressione di questo fattore induce l'autofagia nelle cellule di epatocarcinoma e il suo silenziamento blocca l'autofagia mediata dall'IFN γ [92]. È importante anche sottolineare che è stata descritta una sovra-regolazione di IRF1 in diversi tessuti, tra cui polmoni e fegato, nella malattia critica da COVID-19 [93].

Tuttavia, oltre ad IRF1, molte vie molecolari guidano diversi processi alla base dell'infezione da SARS-CoV-2 come la secrezione di marcatori infiammatori [94]. Ad esempio, numerose proteine virali sono in grado di iperattivare la via di segnalazione NF- κ B, che, rafforzando il rilascio di citochine, contribuisce a diffondere il danno multiorgano [64]; l'attivazione di questo fattore di trascrizione è, infatti, un segno distintivo dei casi critici di COVID-19 [95]. Analogamente, è noto che l'asse Janus Kinasi (JAK)/Trasduttori di Segnale e Attivatori della Trascrizione (STAT) è profondamente coinvolto nell'insorgenza della tempesta citochinica nel COVID-19 [96]. Analizzando le vie di trasduzione responsabili dell'induzione della secrezione di citochine nelle cellule epiteliali alveolari A549 esposte al terreno condizionato da macrofagi trattati con la proteina Spike S1 (CM_S1), abbiamo osservato l'attivazione simultanea di molteplici fattori di trascrizione. Questo è coerente con l'elevata concentrazione di citochine presenti nel mezzo. In particolare, oltre alla ben documentata attivazione delle vie NF- κ B e STAT1/3, è risultata attiva anche la via MAPK/AP-1, indicando un

coinvolgimento coordinato di diverse vie di segnalazione nella risposta infiammatoria epiteliale. Questi dati sperimentali trovano riscontro anche nell'evidenza clinica, che sottolinea il potenziale terapeutico dell'inibizione della via NF- κ B nei pazienti affetti da COVID-19 grave [97], nonché l'uso di farmaci che agiscono sulle chinasi JAK per migliorare la gravità della malattia; di conseguenza, il baricitinib, un inibitore selettivo orale di JAK 1 e 2, approvato per il trattamento dell'artrite reumatoide, è ora in uso per il trattamento di pazienti gravi. In questo lavoro di tesi, abbiamo dimostrato che il baricitinib è in grado di modulare efficacemente la risposta infiammatoria immunomediata nelle cellule epiteliali alveolari A549. In particolare, il farmaco inibisce significativamente la sintesi del fattore di trascrizione IRF1 e riduce quasi completamente l'espressione dei suoi bersagli a valle, tra cui TRIM22, UbD e PSMB8. Parallelamente, il trattamento con baricitinib previene l'induzione dell'autofagia e contrasta le alterazioni morfologiche indotte dal terreno condizionato da macrofagi attivati dalla proteina Spike S1. Inoltre, gli effetti citostatici osservati in queste condizioni vengono almeno parzialmente invertiti, suggerendo un potenziale effetto protettivo del farmaco sul ciclo cellulare.

Infine, è stato recentemente riconosciuto un ruolo importante anche per la deregolazione del metabolismo dell'ossido nitrico (NO) nella patogenesi del COVID-19 e nello sviluppo della sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS) nei pazienti con forme gravi della malattia. [98]. Il ruolo preciso dell'ossido nitrico (NO) nella patogenesi del COVID-19 deve ancora essere completamente chiarito. Focalizzandosi sulle isoforme di NO sintetasi, si è ipotizzato che l'iperinfiammazione induca una disfunzione endoteliale con conseguente riduzione della produzione di NO derivata da eNOS, l'isoforma costitutiva, provocando alterazioni sistemiche soprattutto a livello del sistema vascolare. Parallelamente, l'attività di iNOS, l'isoforma inducibile, e la produzione di NO aumentano nell'ambito della risposta antivirale. Tuttavia, quando questa risposta è deregolata, l'eccesso di NO prodotto da iNOS può contribuire al danno polmonare e alla progressione della sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS) [98]. Prove in letteratura hanno riportato che, almeno nella prima ondata di pazienti affetti da COVID-19, i livelli sierici di iNOS erano aumentati, e si è proposto che iNOS fosse predittivo dell'esito del COVID-19 [99]; coerentemente, Karki et al. hanno riportato che l'espressione di NOS2 era significativamente aumentata nei pazienti con COVID-19 grave e critico rispetto ai controlli sani [100].

I nostri risultati dimostrano che il terreno condizionato di macrofagi esposti alla proteina Spike S1 di SARS-CoV-2 induce potentemente l'espressione di iNOS nelle cellule epiteliali alveolari A549,

probabilmente grazie alla presenza simultanea di IFN γ , IL-1 β e TNF α . Queste citochine, infatti, stimolano debolmente l'espressione di NOS2 se utilizzate singolarmente; tuttavia, quando combinate, l'IFN γ agisce sinergicamente con il TNF α e, ancor più, con l'IL-1 β , portando a un'induzione di NOS2 a livelli molto elevati, comparabili a quelli osservati con il terreno condizionato. Pur non escludendo il possibile coinvolgimento di altri mediatori rilasciati dai macrofagi attivati da S1, i risultati qui presentati assegnano chiaramente a queste citochine un ruolo fondamentale nella stimolazione CM_S1-dipendente dell'espressione di iNOS nelle cellule epiteliali alveolari. Ad oggi, gli studi che hanno indagato i pathways molecolari responsabili dell'induzione di NOS2 sono stati condotti principalmente su macrofagi murini e hanno evidenziato il coinvolgimento della via JAK/STAT1/IRF1. Nell'uomo, un'indagine trascrizionale a singola cellula su PBMC di pazienti affetti da COVID-19 ha suggerito che l'IFN γ e la sua attività nelle cellule T e dendritiche contribuiscono alla gravità della malattia tramite l'attivazione di STAT1 [101]. In linea con queste evidenze presenti in letteratura, i nostri risultati ottenuti su cellule A549 prive di IRF1 dimostrano che la principale via di induzione di iNOS, mediata dal terreno condizionato di macrofagi trattati con S1 o con cytomix, coinvolge l'attivazione del fattore di trascrizione IRF1 tramite la stimolazione della via JAK/STAT. Questi dati sostengono ulteriormente il ruolo protettivo del baricitinib che, oltre a modellare la risposta immunitaria del paziente [102] e a sopprimere l'iperproduzione di citochine [103], potrebbe essere utile anche per prevenire il danno cellulare causato dall'espressione di iNOS.

2. La disfunzione endoteliale durante l'infezione da SARS-CoV-2

La seconda parte di questo lavoro di tesi ha approfondito i meccanismi alla base della disfunzione endoteliale osservata in seguito all'infezione da SARS-CoV-2.

Le forme gravi di COVID-19 sono tutt'oggi considerate forme sistemiche vascolari in cui un ruolo patogenetico fondamentale è rappresentato dalla disfunzione endoteliale [104]. In questo contesto, l'endotelio appare sia un effettore, che contribuisce all'infiammazione e alla trombosi, sia un organo bersaglio, la cui disfunzione può portare all'insorgenza della coagulopatia [105]. Diversi studi recenti indicano che la perdita di integrità vascolare, lo sviluppo di uno stato pro-coagulativo endoteliale e l'infiltrazione di cellule infiammatorie nei polmoni rappresentano processi chiave nelle fasi iniziali e di progressione della sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS), spesso associata alle forme gravi di COVID-19. Le evidenze cliniche suggeriscono che la disfunzione endoteliale in COVID-19 sia determinata sia da meccanismi virus-dipendenti, legati all'infezione diretta dell'endotelio da parte di SARS-CoV-2, sia da meccanismi immunomediati [106]; tuttavia, i pathways molecolari e cellulari specificamente responsabili della compromissione dell'integrità endoteliale rimangono comunque finora poco definiti.

Per questo motivo, lo scopo di questo studio di tesi è stato quello di indagare la risposta dell'endotelio al SARS-CoV-2 sia a seguito della esposizione diretta delle cellule endoteliali alla proteina Spike S1, sia dopo l'intervento delle cellule dell'immunità innata. Preliminarmente, il riscontro di trascritti di mRNA per ACE2 e per i co-recettori NRP1 e NRP2 sia nelle HLMVEC che nei macrofagi suggerisce che entrambi questi tipi cellulari possano essere potenziali bersagli di infezione virale. I risultati ottenuti indicano che l'incubazione delle HLMVEC con la sola proteina S1 induce significativamente l'espressione di marcatori tipici di attivazione endoteliale, quali le molecole di adesione ICAM-1 e VCAM-1, nonché delle chemochine infiammatorie CCL2/MCP-1 e CXCL10/IP-10. Effetti simili sono stati descritti in letteratura in cellule endoteliali del microcircolo cerebrale umano e dell'arteria polmonare, dove è stata riportata un'induzione della risposta pro-infiammatoria dipendente dalla proteina Spike, accompagnata da evidenze di danno cellulare [107]. Un altro studio ha evidenziato che l'infezione con SARS-CoV-2 in cellule endoteliali microvascolari polmonari umani transfettate con il recettore ACE2 [108] produce cambiamenti significativi nell'espressione dei geni coinvolti nel processo infiammatorio e coagulativo, suggerendo la possibilità di una interazione diretta del virus con l'endotelio.

Nel nostro studio, le cellule endoteliali mostrano un'attivazione quando trattate con la sola proteina Spike S1. Tuttavia, questa attivazione risulta nettamente amplificata quando le cellule endoteliali vengono incubate con medium condizionato proveniente da macrofagi precedentemente trattati per 24 ore con la proteina virale. In questa condizione si osserva un marcato aumento dell'espressione delle molecole di adesione ICAM-1 e VCAM-1, delle chemochine CXCL8/IL-8, CCL2/MCP1 e CXCL10/IP-10, nonché di marcatori pro-coagulanti. In particolare, si registra una diminuzione della trombomodulina (THBD) e, al contrario, una netta comparsa della proteina trombogenica tissue factor (TF), assente nelle cellule endoteliali trattate con la sola S1.

I dati qui ottenuti, assieme a quelli di altri lavori [109], concordano nel suggerire che il rafforzamento immuno-dipendente della risposta endoteliale sia dovuto alla presenza di mediatori pro-infiammatori secreti dai macrofagi attivati con la proteina virale. L'analisi quantitativa di questi mediatori nel medium di coltura indica la presenza di un massiccio rilascio di citochine e chemochine, tra cui IL-1 β , IL-6, TNF α , IFN γ . Risultati simili sono stati descritti da Karwaciak et al. in macrofagi umani differenziati con GM-CSF [110] ed in macrofagi di topi derivati dal midollo osseo [111]. Collettivamente, questi risultati sono coerenti con gli elevati livelli plasmatici di marcatori infiammatori osservati nei pazienti COVID-19 [112], in cui i profili di IL-6, CCL2/MCP-1 e CXCL10/IP-10 si associano alla gravità della malattia[113].

Inoltre, una caratteristica distintiva della patologia COVID-19 risiede nelle anomalie coagulative/fibrinolitiche clinicamente definite da elevati livelli plasmatici di D-dimero, fattore VIII e fattore di von Willebrand [114]. A tal proposito è stato suggerito che la causa primaria risieda nella infiammazione eccessiva che amplifica il danno vascolare fino alla compromissione delle fisiologiche proprietà anti-trombogeniche dell'endotelio vascolare ed allo sviluppo di trombi nei vasi [54]. In particolare, si è ipotizzato che una sovra-regolazione del fattore tissutale endoteliale (TF) giochi un ruolo centrale nella patogenesi delle complicazioni trombotiche nel COVID-19 [115], anche se ancora manca la dimostrazione scientifica definitiva. In questo lavoro di tesi è stato dimostrato che l'incubazione delle HLMVEC con medium condizionato provoca una marcata induzione dell'espressione proteica del fattore tissutale (TF), che risulta invece assente sia nelle condizioni di controllo sia nelle cellule esposte unicamente alla proteina Spike. Contestualmente, si osserva una significativa diminuzione dell'espressione della trombomodulina, una proteina con funzione antitrombotica.

Visto il coinvolgimento del pathway JAK/STAT in molti degli effetti osservati nelle A549 a seguito del trattamento con CM_S1 ed essendo attualmente riconosciuto come uno dei meccanismi di segnalazione principalmente coinvolti nell'induzione di citochine e chemochine nel COVID-19 [65], lo studio è proseguito valutando l'efficacia del baricitinib sullo stato infiammatorio indotto dalla proteina Spike S1 nelle cellule endoteliali. In questo studio, l'aggiunta di baricitinib nelle cellule HUVEC previene selettivamente l'induzione di IL-6, RANTES e IP-10, senza influenzare gli altri mediatori testati. Tra le citochine analizzate, l'IL-6, il cui livello plasmatico è significativamente elevato nei pazienti con COVID-19, riveste un ruolo cruciale nel predire la progressione e la gravità della malattia [116]. Questa citochina è nota per stimolare la produzione di ulteriori citochine e chemochine da parte delle cellule endoteliali ed epiteliali, principalmente attraverso l'attivazione di STAT3, con conseguente amplificazione della cascata infiammatoria. In questo contesto, i nostri risultati, che mostrano come il baricitinib prevenga completamente l'induzione di IL-6 nelle cellule endoteliali, suggeriscono che il farmaco possa svolgere un ruolo chiave nel modulare la risposta infiammatoria, interrompendo il ciclo positivo innescato dall'IL-6. Al contrario, l'inefficacia del baricitinib nel modulare l'espressione di TNF α nelle medesime condizioni sperimentali suggerisce che l'induzione di questo mediatore, così come di altri presenti nel terreno condizionato dei macrofagi (MDM), avvenga tramite vie di segnalazione indipendenti dalla famiglia STAT.

Al fine di approfondire i meccanismi responsabili del danno endoteliale, l'attenzione si è concentrata sugli effetti del CM_S1 sull'integrità delle cellule endoteliali. L'esposizione a CM_S1 per 72 ore ha provocato una significativa riduzione della proliferazione cellulare, accompagnata da evidenti segni di citotossicità. Analizzando i meccanismi molecolari alla base degli effetti antiproliferativi/pro-apoptotici del CM-S1, è stata evidenziata una significativa modulazione nell'espressione di p21 e Rb, suggerendo un ruolo di queste proteine nella diminuzione della popolazione di cellule endoteliali. Entrambe le proteine sono, infatti, regolatori ben caratterizzati della progressione del ciclo cellulare [117], mentre è noto che p21 ha un ruolo anche nella morte cellulare apoptotica [118].

Inoltre, esplorando anche i meccanismi molecolari alla base degli effetti immunomediati del CM_S1, è stata riscontrata un'attivazione transitoria ma marcata di IRF1, accompagnata da un significativo aumento della fosforilazione di STAT1, indicando una chiara attivazione della via JAK/STAT. Parallelamente, in risposta al CM_S1 si è osservata anche un'attivazione persistente del pathway di NF- κ B. Questi risultati suggeriscono che la compromissione della vitalità endoteliale sia riconducibile, almeno in parte, all'attivazione congiunta delle vie pro-infiammatorie IRF1/STAT1 e NF- κ B.

Infine, studi clinici indicano che il metabolismo dell'arginina è alterato nel COVID-19. Uno studio recente ha rilevato che i pazienti COVID-19 con ARDS presentano livelli inferiori di eNOS solubile rispetto ai pazienti COVID-19 non-ARDS [119]. L'attività dell'arginasi è stata riportata, invece, sovraregolata nei pazienti con COVID-19, dove favorisce la produzione di ornitina e dei suoi metaboliti dall'arginasi rispetto alla sintesi di NO [120] ; per questo motivo lo studio si è concluso analizzando l'eventuale alterazione del metabolismo dell'arginina nelle cellule endoteliali a seguito del trattamento con CM_S1. I risultati dimostrano che questo terreno condizionato modula anche l'espressione di eNOS e dell'arginasi, con una soppressione quasi completa dei livelli di NOS3/eNOS parallela a un aumento dell'espressione dell'arginasi. In linea con l'aumento osservato dell'attività dell'arginasi, è stato descritto che i livelli plasmatici circolanti di arginina diminuiscono progressivamente con l'aumentare della gravità della malattia [121]. Poiché il mantenimento dell'equilibrio NOS/arginasi sembra essere fondamentale per la corretta preservazione della funzione endoteliale, i nostri risultati che dimostrano la perdita di eNOS e l'induzione di arginasi suggeriscono che questa compromissione possa avere un ruolo nell'insorgenza della disfunzione endoteliale associata al COVID-19.

CONCLUSIONI

Alla luce dei risultati mostrati possiamo concludere che, nell'insorgenza della disfunzione epiteliale alveolare ed endoteliale da COVID-19, siano coinvolti sia effetti diretti dell'infezione da SARS-CoV-2, che effetti indiretti, mediati da una risposta infiammatoria deregolata che determina un significativo rafforzamento delle risposte al virus.

L'incubazione di cellule alveolari così come di cellule endoteliali con terreno condizionato di macrofagi attivati dalla proteina Spike S1 ha rafforzato gli effetti già osservati a seguito del trattamento delle cellule con la sola proteina S1 e causato segni di danno cellulare.

Nel complesso, i nostri risultati evidenziano la rilevanza delle cellule immunitarie innate nell'induzione, dipendente dalla proteina Spike, di un fenotipo cellulare attivato e forniscono un modello patogenetico per la disfunzione alveolare ed endoteliale nel COVID-19 basato su un'interazione tra cellule immunitarie ed alveolari/endoteliali, entrambe bersaglio della proteina Spike S1. Questo modello prevede che le citochine infiammatorie secrete dai macrofagi amplifichino l'attivazione delle cellule alveolari ed endoteliali che, a loro volta, producono mediatori infiammatori, tra cui chemochine che probabilmente reclutano monociti circolanti; l'insorgenza di questo ciclo positivo potrebbe spiegare la disregolazione delle risposte infiammatorie.

In particolare, l'asse IFN γ -IRF1 sembra svolgere un ruolo centrale nell'induzione di molti degli effetti osservati, che potrebbero essere coinvolti nell'insorgenza del danno epiteliale alveolare e di quello endoteliale. Questo permette di affidare al baricitinib, noto inibitore di JAK1/2 e approvato dall'FDA per il trattamento delle forme gravi di COVID-19, un ruolo chiave nel modulare la risposta immunitaria deregolata a seguito dell'infezione da SARS-CoV-2.

BIBLIOGRAFIA

1. Paraskevis, D., et al., *Full-genome evolutionary analysis of the novel corona virus (2019-nCoV) rejects the hypothesis of emergence as a result of a recent recombination event*. *Infect Genet Evol*, 2020. **79**: p. 104212.
2. Hu, B., et al., *Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19*. *Nat Rev Microbiol*, 2021. **19**(3): p. 141-154.
3. Hoffmann, T., et al., *Electron microscopy images and morphometric data of SARS-CoV-2 variants in ultrathin plastic sections*. *Scientific Data*, 2024. **11**(1).
4. Wang, M.Y., et al., *SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020. **10**: p. 587269.
5. Scialo, F., et al., *ACE2: The Major Cell Entry Receptor for SARS-CoV-2*. *Lung*, 2020. **198**(6): p. 867-877.
6. Arya, R., et al., *Structural insights into SARS-CoV-2 proteins*. *J Mol Biol*, 2021. **433**(2): p. 166725.
7. Cao, Y., et al., *Characterization of the SARS-CoV-2 E Protein: Sequence, Structure, Viroporin, and Inhibitors*. *Protein Sci*, 2021. **30**(6): p. 1114-1130.
8. Mahtarin, R., et al., *Structure and dynamics of membrane protein in SARS-CoV-2*. *J Biomol Struct Dyn*, 2022. **40**(10): p. 4725-4738.
9. Ruch, T.R. and C.E. Machamer, *The coronavirus E protein: assembly and beyond*. *Viruses*, 2012. **4**(3): p. 363-82.
10. Vaccari, J.C.D., et al., *The Inflammasome in Times of COVID-19*. *Frontiers in Immunology*, 2020. **11**.
11. Wu, C.R., et al., *Structure genomics of SARS-CoV-2 and its Omicron variant: drug design templates for COVID-19*. *Acta Pharmacol Sin*, 2022. **43**(12): p. 3021-3033.
12. Kirtipal, N., S. Bharadwaj, and S.G. Kang, *From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses*. *Infect Genet Evol*, 2020. **85**: p. 104502.
13. Bedada, F.B., et al., *Insight into genomic organization of pathogenic coronaviruses, SARS-CoV-2: Implication for emergence of new variants, laboratory diagnosis and treatment options*. *Front Mol Med*, 2022. **2**: p. 917201.
14. Minskaia, E., et al., *Discovery of an RNA virus 3'->5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(13): p. 5108-13.
15. Sevajol, M., et al., *Insights into RNA synthesis, capping, and proofreading mechanisms of SARS-coronavirus*. *Virus Res*, 2014. **194**: p. 90-9.
16. Boson, B., et al., *The SARS-CoV-2 envelope and membrane proteins modulate maturation and retention of the spike protein, allowing assembly of virus-like particles*. *J Biol Chem*, 2021. **296**: p. 100111.
17. Grint, D.J., et al., *Severity of Severe Acute Respiratory System Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Alpha Variant (B.1.1.7) in England*. *Clin Infect Dis*, 2022. **75**(1): p. e1120-e1127.
18. Davies, N.G., et al., *Increased mortality in community-tested cases of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7*. *medRxiv*, 2021.
19. Roquebert, B., et al., *The SARS-CoV-2 B.1.351 lineage (VOC beta) is outgrowing the B.1.1.7 lineage (VOC alpha) in some French regions in April 2021*. *Euro Surveill*, 2021. **26**(23).
20. He, X., et al., *The challenges of COVID-19 Delta variant: Prevention and vaccine development*. *MedComm (2020)*, 2021. **2**(4): p. 846-854.
21. Dos Santos, C.A., et al., *SARS-CoV-2 genomic surveillance in Northeast Brazil: timing of emergence of the Brazilian variant of concern P1*. *J Travel Med*, 2021. **28**(7).
22. Mohiuddin, M. and K. Kasahara, *Investigating the aggressiveness of the COVID-19 Omicron variant and suggestions for possible treatment options*. *Respir Med*, 2022. **191**: p. 106716.
23. Dyer, O., *Covid-19: Omicron is causing more infections but fewer hospital admissions than delta, South African data show*. *BMJ*, 2021. **375**: p. n3104.

24. Tao, K., et al., *The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants*. Nat Rev Genet, 2021. **22**(12): p. 757-773.
25. Mizumoto, K., et al., *Estimating the asymptomatic proportion of coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases on board the Diamond Princess cruise ship, Yokohama, Japan, 2020*. Euro Surveill, 2020. **25**(10).
26. Cascella, M., et al., *Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19)*, in *StatPearls*. 2025: Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Michael Rajnik declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Abdul Aleem declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Scott Dulebohn declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Raffaella Di Napoli declares no relevant financial relationships with ineligible companies.
27. Dharra, R., A. Kumar Sharma, and S. Datta, *Emerging aspects of cytokine storm in COVID-19: The role of proinflammatory cytokines and therapeutic prospects*. Cytokine, 2023. **169**: p. 156287.
28. Merad, M. and J.C. Martin, *Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages*. Nat Rev Immunol, 2020. **20**(6): p. 355-362.
29. Sironi, M., et al., *IL-1 stimulates IL-6 production in endothelial cells*. J Immunol, 1989. **142**(2): p. 549-53.
30. Becher, B., S. Tugues, and M. Greter, *GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation*. Immunity, 2016. **45**(5): p. 963-973.
31. Wang, J., et al., *Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts*. J Leukoc Biol, 2020. **108**(1): p. 17-41.
32. Rotondi, M., et al., *Role of chemokines in endocrine autoimmune diseases*. Endocr Rev, 2007. **28**(5): p. 492-520.
33. Bacon, K., et al., *Chemokine/chemokine receptor nomenclature*. J Interferon Cytokine Res, 2002. **22**(10): p. 1067-8.
34. Bachelierie, F., et al., *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors*. Pharmacol Rev, 2014. **66**(1): p. 1-79.
35. Tiberio, L., et al., *Chemokine and chemotactic signals in dendritic cell migration*. Cell Mol Immunol, 2018. **15**(4): p. 346-352.
36. Osuchowski, M.F., et al., *The COVID-19 puzzle: deciphering pathophysiology and phenotypes of a new disease entity*. Lancet Respir Med, 2021. **9**(6): p. 622-642.
37. Barkauskas, C.E., et al., *Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung*. J Clin Invest, 2013. **123**(7): p. 3025-36.
38. Calfee, C.S., et al., *Subphenotypes in acute respiratory distress syndrome: latent class analysis of data from two randomised controlled trials*. Lancet Respir Med, 2014. **2**(8): p. 611-20.
39. Kikkert, M., *Innate Immune Evasion by Human Respiratory RNA Viruses*. J Innate Immun, 2020. **12**(1): p. 4-20.
40. Nienhold, R., et al., *Two distinct immunopathological profiles in autopsy lungs of COVID-19*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 5086.
41. Hadjadj, J., et al., *Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients*. Science, 2020. **369**(6504): p. 718-724.
42. Matthay, M.A., et al., *Acute respiratory distress syndrome*. Nat Rev Dis Primers, 2019. **5**(1): p. 18.
43. Vadász, I., S. Raviv, and J.I. Sznajder, *Alveolar epithelium and Na, K-ATPase in acute lung injury*. Intensive Care Medicine, 2007. **33**(7): p. 1243-1251.
44. Islam, A.M.M.K. and M.A.A.K. Khan, *Lung transcriptome of a COVID-19 patient and systems biology predictions suggest impaired surfactant production which may be druggable by surfactant therapy*. Scientific Reports, 2020. **10**(1).

45. Lamers, M.M. and B.L. Haagmans, *SARS-CoV-2 pathogenesis*. Nature Reviews Microbiology, 2022. **20**(5): p. 270-284.
46. Bonaventura, A., et al., *Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19*. Nature Reviews Immunology, 2021. **21**(5): p. 319-329.
47. Indolfi, C., et al., *COVID-19 Pediatric Follow-Up: Respiratory Long COVID-Associated Comorbidities and Lung Ultrasound Alterations in a Cohort of Italian Children*. Children-Basel, 2024. **11**(2).
48. Zarrilli, G., et al., *The Immunopathological and Histological Landscape of COVID-19-Mediated Lung Injury*. International Journal of Molecular Sciences, 2021. **22**(2).
49. Moderbacher, C.R., et al., *Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity*. Cell, 2020. **183**(4): p. 996-+.
50. Thompson, B.T., R.C. Chambers, and K.D. Liu, *Acute Respiratory Distress Syndrome REPLY*. New England Journal of Medicine, 2017. **377**(19): p. 1904-1905.
51. Evans, P.C., et al., *Endothelial dysfunction in COVID-19: a position paper of the ESC Working Group for Atherosclerosis and Vascular Biology, and the ESC Council of Basic Cardiovascular Science*. Cardiovascular Research, 2020. **116**(14): p. 2177-2184.
52. Huertas, A., et al., *Endothelial cell dysfunction: a major player in SARS-CoV-2 infection (COVID-19)?* European Respiratory Journal, 2020. **56**(1).
53. Varga, Z., et al., *Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19*. Lancet, 2020. **395**(10234): p. 1417-1418.
54. Nicosia, R.F., et al., *COVID-19 Vasculopathy: Mounting Evidence for an Indirect Mechanism of Endothelial Injury*. American Journal of Pathology, 2021. **191**(8): p. 1374-1384.
55. Cantuti-Castelvetri, L., et al., *Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity*. Science, 2020. **370**(6518): p. 856-+.
56. Roberts, K.A., et al., *Vascular Manifestations of COVID-19 - Thromboembolism and Microvascular Dysfunction*. Frontiers in Cardiovascular Medicine, 2020. **7**.
57. Prasad, M., et al., *Viral Endothelial Dysfunction: A Unifying Mechanism for COVID-19*. Mayo Clinic Proceedings, 2021. **96**(12): p. 3099-3108.
58. Rotoli, B.M., et al., *Endothelial Cell Activation by SARS-CoV-2 Spike S1 Protein: A Crosstalk between Endothelium and Innate Immune Cells*. Biomedicines, 2021. **9**(9).
59. Gaiani, F., et al., *Monocytes from infliximab-resistant patients with Crohn's disease exhibit a disordered cytokine profile*. Scientific Reports, 2020. **10**(1).
60. Rotoli, B.M., et al., *γ -LAT1 and γ -LAT2 contribution to arginine uptake in different human cell models: Implications in the pathophysiology of Lysinuric Protein Intolerance*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2020. **24**(1): p. 921-929.
61. Kampf, G., et al., *Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents*. Journal of Hospital Infection, 2020. **104**(3): p. 246-251.
62. Lee, S., et al., *Clinical Course and Molecular Viral Shedding Among Asymptomatic and Symptomatic Patients With SARS-CoV-2 Infection in a Community Treatment Center in the Republic of Korea*. Jama Internal Medicine, 2020. **180**(11): p. 1447-1452.
63. Khan, S., et al., *SARS-CoV-2 spike protein induces inflammation via TLR2-dependent activation of the NF- κ B pathway*. Elife, 2021. **10**.
64. Kandasamy, M., *NF- κ B signalling as a pharmacological target in COVID-19: potential roles for IKK β inhibitors*. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 2021. **394**(3): p. 561-567.
65. Luo, W., et al., *Targeting JAK-STAT Signaling to Control Cytokine Release Syndrome in COVID-19*. Trends in Pharmacological Sciences, 2020. **41**(8): p. 531-543.
66. He, R.T., et al., *Activation of AP-1 signal transduction pathway by SARS coronavirus nucleocapsid protein*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003. **311**(4): p. 870-876.
67. Feng, H., et al., *Interferon regulatory factor 1 (IRF1) and anti-pathogen innate immune responses*. Plos Pathogens, 2021. **17**(1).

68. Banerjee, S., et al., *JAK-STAT Signaling as a Target for Inflammatory and Autoimmune Diseases: Current and Future Prospects* (vol 77, pg 521, 2017). *Drugs*, 2017. **77**(11): p. 1261-1261.
69. Barilli, A., et al., *Growth Arrest of Alveolar Cells in Response to Cytokines from Spike S1-Activated Macrophages: Role of IFN- γ* . *Biomedicines*, 2022. **10**(12).
70. Dell'Albani, P., et al., *JAK/STAT signaling pathway mediates cytokine-induced iNOS expression in primary astroglial cell cultures*. *Journal of Neuroscience Research*, 2001. **65**(5): p. 417-424.
71. Tseng, C.T.K., et al., *Apical entry and release of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus in polarized Calu-3 lung epithelial cells*. *Journal of Virology*, 2005. **79**(15): p. 9470-9479.
72. Lertkiatmongkol, P., et al., *Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31)*. *Current Opinion in Hematology*, 2016. **23**(3): p. 253-259.
73. Abukhdeir, A.M. and B.H. Park, *P21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance*. *Expert Rev Mol Med*, 2008. **10**: p. e19.
74. Giacinti, C. and A. Giordano, *RB and cell cycle progression*. *Oncogene*, 2006. **25**(38): p. 5220-5227.
75. Adebayo, A., et al., *L-Arginine and COVID-19: An Update*. *Nutrients*, 2021. **13**(11).
76. Flowers, M.A., et al., *Reciprocal regulation of endothelin-1 and endothelial constitutive NOS in proliferating endothelial cells*. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 1995. **269**(6): p. H1988-H1997.
77. Xu, S.W., et al., *Endothelial Dysfunction in Atherosclerotic Cardiovascular Diseases and Beyond: From Mechanism to Pharmacotherapies*. *Pharmacological Reviews*, 2021. **73**(3): p. 924-967.
78. Bryan, N.S., *Nitric oxide deficiency is a primary driver of hypertension*. *Biochemical Pharmacology*, 2022. **206**.
79. Yang, Z.H. and X.F. Ming, *Arginase: the emerging therapeutic target for vascular oxidative stress and inflammation*. *Frontiers in Immunology*, 2013. **4**.
80. Ahmad, T., et al., *COVID-19: The Emerging Immunopathological Determinants for Recovery or Death*. *Front Microbiol*, 2020. **11**: p. 588409.
81. Grifoni, E., et al., *Interleukin-6 as prognosticator in patients with COVID-19*. *Journal of Infection*, 2020. **81**(3): p. 466-467.
82. Wang, J.J., et al., *Specific cytokines in the inflammatory cytokine storm of patients with COVID-19-associated acute respiratory distress syndrome and extrapulmonary multiple-organ dysfunction*. *Virology Journal*, 2021. **18**(1).
83. Can, F.K., et al., *Effect of IL-6, IL-8/CXCL8, IP-10/CXCL 10 levels on the severity in COVID 19 infection*. *International Journal of Clinical Practice*, 2021. **75**(12).
84. Del Valle, D.M., et al., *An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival*. *Nature Medicine*, 2020. **26**(10): p. 1636-+.
85. Ragab, D., et al., *The COVID-19 Cytokine Storm; What We Know So Far*. *Frontiers in Immunology*, 2020. **11**.
86. Kosyreva, A., et al., *The Role of Macrophages in the Pathogenesis of SARS-CoV-2-Associated Acute Respiratory Distress Syndrome*. *Front Immunol*, 2021. **12**: p. 682871.
87. Kocaturk, N.M. and D. Gozuacik, *Crosstalk Between Mammalian Autophagy and the Ubiquitin-Proteasome System*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2018. **6**.
88. Lou, J., et al., *TRIM22 regulates macrophage autophagy and enhances Mycobacterium tuberculosis clearance by targeting the nuclear factor-multiplicity kappaB/beclin 1 pathway*. *J Cell Biochem*, 2018. **119**(11): p. 8971-8980.
89. Li, F., et al., *SARS-CoV-2 spike promotes inflammation and apoptosis through autophagy by ROS-suppressed PI3K/AKT/mTOR signaling*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, 2021. **1867**(12).
90. Ge, Y., M. Huang, and Y.M. Yao, *Autophagy and proinflammatory cytokines: Interactions and clinical implications*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2018. **43**: p. 38-46.

91. Forero, A., et al., *Differential Activation of the Transcription Factor IRF1 Underlies the Distinct Immune Responses Elicited by Type I and Type III Interferons*. *Immunity*, 2019. **51**(3): p. 451-+.
92. Li, P.Y., et al., *Interferon-gamma induces autophagy with growth inhibition and cell death in human hepatocellular carcinoma (HCC) cells through interferon-regulatory factor-1 (IRF-1)*. *Cancer Letters*, 2012. **314**(2): p. 213-222.
93. Shin, J., et al., *SARS-CoV-2 infection impairs the insulin/IGF signaling pathway in the lung, liver, adipose tissue, and pancreatic cells via IRF1*. *Metabolism-Clinical and Experimental*, 2022. **133**.
94. Farahani, M., et al., *Molecular pathways involved in COVID-19 and potential pathway-based therapeutic targets*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2022. **145**.
95. Attiq, A., et al., *The triumvirate of NF-KB, inflammation and cytokine storm in COVID-19*. *International Immunopharmacology*, 2021. **101**.
96. Grant, A., et al., *The Many Faces of JAKs and STATs Within the COVID-19 Storm*. *Frontiers in Immunology*, 2021. **12**.
97. Hariharan, A., et al., *The Role and Therapeutic Potential of NF-kappa-B Pathway in Severe COVID-19 Patients*. *Inflammopharmacology*, 2021. **29**(1): p. 91-100.
98. Guimaraes, L.M.F., C.V.T. Rossini, and C. Lameu, *Implications of SARS-Cov-2 infection on eNOS and iNOS activity: Consequences for the respiratory and vascular systems*. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry*, 2021. **111**: p. 64-71.
99. Gelzo, M., et al., *Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS): Why a Different Production in COVID-19 Patients of the Two Waves?* *Viruses*, 2022. **14**(3).
100. Karki, R., et al., *Synergism of TNF- α and IFN- γ Triggers Inflammatory Cell Death, Tissue Damage, and Mortality in SARS-CoV-2 Infection and Cytokine Shock Syndromes*. *Cell*, 2021. **184**(1): p. 149-+.
101. Zhu, L.N., et al., *Single-Cell Sequencing of Peripheral Mononuclear Cells Reveals Distinct Immune Response Landscapes of COVID-19 and Influenza Patients*. *Immunity*, 2020. **53**(3): p. 685-+.
102. Bronte, V., et al., *Baricitinib restrains the immune dysregulation in patients with severe COVID-19*. *Journal of Clinical Investigation*, 2020. **130**(12): p. 6409-6416.
103. Selvaraj, V., et al., *Baricitinib in hospitalised patients with COVID-19: A meta-analysis of randomised controlled trials*. *Eclinicalmedicine*, 2022. **49**.
104. Libby, P. and T. Lüscher, *COVID-19 is, in the end, an endothelial disease*. *European Heart Journal*, 2020. **41**(32): p. 3038-3044.
105. Jung, F., et al., *COVID-19 and the endothelium*. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 2020. **75**(1): p. 7-11.
106. Bernard, I., et al., *Endothelium Infection and Dysregulation by SARS-CoV-2: Evidence and Caveats in COVID-19*. *Viruses-Basel*, 2021. **13**(1).
107. Buzhdygan, T.P., et al., *The SARS-CoV-2 spike protein alters barrier function in 2D static and 3D microfluidic in-vitro models of the human blood-brain barrier*. *Neurobiol Dis*, 2020. **146**: p. 105131.
108. Conde, J.N., et al., *Recombinant ACE2 Expression Is Required for SARS-CoV-2 To Infect Primary Human Endothelial Cells and Induce Inflammatory and Procoagulative Responses*. *Mbio*, 2020. **11**(6).
109. Perico, L., et al., *Immunity, endothelial injury and complement-induced coagulopathy in COVID-19*. *Nature Reviews Nephrology*, 2021. **17**(1): p. 46-64.
110. Karwaciak, I., et al., *Nucleocapsid and Spike Proteins of the Coronavirus SARS-CoV-2 Induce in Monocytes and Macrophages-Potential Implications for Cytokine Storm Syndrome*. *Vaccines*, 2021. **9**(1).
111. Duarte, C., et al., *Age-dependent effects of the recombinant spike protein/SARS-CoV-2 on the M-CSF- and IL-34-differentiated macrophages in vitro*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2021. **546**: p. 97-102.

112. Escher, R., N. Breakey, and B. Lämmle, *Severe COVID-19 infection associated with endothelial activation*. *Thrombosis Research*, 2020. **190**: p. 62-62.
113. Chi, Y., et al., *Serum Cytokine and Chemokine Profile in Relation to the Severity of Coronavirus Disease 2019 in China*. *Journal of Infectious Diseases*, 2020. **222**(5): p. 746-754.
114. Panigada, M., et al., *Hypercoagulability of COVID-19 patients in intensive care unit: A report of thromboelastography findings and other parameters of hemostasis*. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2020. **18**(7): p. 1738-1742.
115. Bautista-Vargas, M., F. Bonilla-Abadía, and C.A. Cañas, *Potential role for tissue factor in the pathogenesis of hypercoagulability associated with in COVID-19*. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 2020. **50**(3): p. 479-483.
116. Elahi, R., et al., *An updated overview of recent advances, challenges, and clinical considerations of IL-6 signaling blockade in severe coronavirus disease 2019 (COVID-19)*. *International Immunopharmacology*, 2022. **105**.
117. Moser, J., et al., *Control of the Restriction Point by Rb and p21*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018. **115**(35): p. Eb219-Eb227.
118. Karimian, A., Y. Ahmadi, and B. Yousefi, *Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage*. *DNA Repair (Amst)*, 2016. **42**: p. 63-71.
119. Vassiliou, A.G., et al., *Soluble Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) Is Upregulated and Soluble Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Is Downregulated in COVID-19-induced Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)*. *Pharmaceuticals*, 2021. **14**(7).
120. Falck-Jones, S., et al., *Functional monocytic myeloid-derived suppressor cells increase in blood but not airways and predict COVID-19 severity*. *J Clin Invest*, 2021. **131**(6).
121. Reizine, F., et al., *SARS-CoV-2-Induced ARDS Associates with MDSC Expansion, Lymphocyte Dysfunction, and Arginine Shortage*. *Journal of Clinical Immunology*, 2021. **41**(3): p. 515-525.