

4. Novembre

Riassunto: cosa pensiamo di aver capito su come SARS-CoV-2 causa il COVID-19

*Coloro che capiscono solo ciò che può essere spiegato
capiscono molto poco.*

Marie von Ebner-Eschenbach

Come i virus entrano nelle cellule

I virus entrano nelle cellule e iniziano l'infezione legandosi ai loro recettori di superficie cellulare affini. L'espressione e la distribuzione dei recettori di ingresso virale regola quindi il loro tropismo, determinando i tessuti che vengono infettati e quindi la patogenesi della malattia. La sindrome respiratoria acuta grave coronavirus 2 (SARS-CoV-2) è il terzo coronavirus umano noto per cooptare l'enzima di conversione dell'angiotensina peptidasi 2 (ACE2) per l'ingresso nelle cellule. L'interazione tra SARS-CoV-2 e ACE2 è fondamentale per determinare sia il tropismo dei tessuti che la progressione dall'infezione precoce da SARS-CoV-2 alla grave malattia da coronavirus 2019 (COVID-19). Comprendere le basi cellulari dell'infezione da SARS-CoV-2 potrebbe rivelare trattamenti che prevengono lo sviluppo di malattie gravi e quindi riducono la mortalità.

La centralità della Spike protein

Come per tutti i coronavirus, l'ingresso delle cellule SARS-CoV-2 dipende dalla sua proteina spike (S) di 180 kDa, che media due eventi essenziali: il legame all'ACE2 da parte della regione ammino-terminale e la fusione delle membrane virali e cellulari attraverso il regione carbossi-terminale.

L'enigma della furina polibasica

L'infezione delle cellule polmonari richiede l'attivazione proteolitica dell'ospite in corrispondenza di un sito di scissione della furina polibasica. Ad oggi, questo sito di scissione si trova in tutte le proteine spike da isolati clinici di SARS-CoV-2, così come in alcuni altri virus altamente patogeni (ad esempio, l'influenza aviaria A), ma è assente da SARS-CoV ed è probabile che abbia acquisita per ricombinazione tra i coronavirus nei pipistrelli. La scissione da parte della proteasi furinosa espande quindi il tropismo cellulare SARS-CoV-2 e potrebbe aver facilitato la trasmissione dai pipistrelli all'uomo.

I meccanismi di fusione

La fusione della membrana richiede anche la scissione da parte di proteasi aggiuntive, in particolare la proteasi transmembrana serina 2 (TMPRSS2), una proteasi della superficie della cellula ospite che scinde il picco poco dopo il legame con ACE2. Il tropismo di SARS-CoV-2 dipende quindi dall'espressione delle proteasi cellulari, così come da ACE2.

Stanno emergendo anche altre proteine che consentono l'ingresso delle cellule SARS-CoV-2, tra cui la neuropilina 1 (NRP1), un recettore che lega il motivo RXXR carbossi-terminale nel picco esposto dopo la scissione della furina. Non è chiaro come NRP1 promuova l'ingresso delle cellule, ma potrebbe aumentare ulteriormente i tipi di cellule infette.

I magnifici sette della corona

Dei sette coronavirus umani conosciuti, tre sono altamente patogeni [SARS-CoV, SARS-CoV-2 e sindrome respiratoria mediorientale (MERS)-CoV] e i restanti quattro (HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43, e HCoV-HKU1) sono meno virulenti, causando "raffreddori comuni". SARS-CoV, SARS-CoV-2 e HCoV-NL63 utilizzano ACE2 come recettore di ingresso cellulare. MERS-CoV lega

DPP4 (dipeptidil peptidasi 4) e HCoV-229E utilizza CD13 (aminopeptidasi N). Nessun recettore della proteina ospite è stato identificato per gli altri due virus.

Una strana coincidenza...

Sembra una coincidenza notevole che tutti i recettori umani conosciuti del coronavirus siano peptidasi della superficie cellulare, in particolare perché le interazioni non coinvolgono il sito attivo dell'endopeptidasi. Particolarmente degna di nota è la presenza di una regione specifica all'interno di ACE2, bersaglio di tre coronavirus. Al contrario, il dominio di legame del recettore dello spike è codificato dalla parte più variabile del genoma del coronavirus. Ciò implica che la diversificazione di questi virus ha generato sequenze diverse che convergevano sulla stessa regione della stessa proteina utilizzando soluzioni strutturali alternative.

Cosa c'è di così speciale in ACE2?

ACE2 è una proteina transmembrana meglio caratterizzata per il suo ruolo omeostatico nel controbilanciare gli effetti dell'ACE sul sistema cardiovascolare.

L'ACE converte l'angiotensina I in angiotensina II, un ottapeptide altamente attivo che mostra sia attività vasopressorie (contrazione vascolare per aumentare la pressione sanguigna) che proinfiammatorie. L'attività della carbossipeptidasi dell'ACE2 converte l'angiotensina II nell'eptapeptide angiotensina-(1-7), un antagonista funzionale dell'angiotensina II. Poiché l'ACE è altamente espresso nelle cellule endoteliali vascolari dei polmoni, è probabile che l'angiotensina II sia elevata anche nel sistema vascolare polmonare. Infatti, la delezione di *Ace2* in modelli murini di danno polmonare acuto provoca una malattia più grave, suggerendo un ruolo protettivo per ACE2 nel tessuto polmonare. In molte interazioni virus-ospite, l'espressione del recettore virale è down-regolata nelle cellule infette e l'espressione di ACE2 nei polmoni dei topi è stata ridotta dall'infezione da SARS-CoV. La deplezione di ACE2 può quindi svolgere un ruolo causale nel danno polmonare causato da SARS-CoV e SARS-CoV-2 e nei pazienti con COVID-19 è riportato un alto livello di angiotensina II plasmatica.

Un sospetto...

Tuttavia, MERS-CoV provoca una malattia polmonare simile senza prendere di mira l'ACE2, quindi anche altri fattori devono essere importanti.

Il tropismo per le vie respiratorie

Essendo un virus respiratorio, SARS-CoV-2 deve inizialmente entrare nelle cellule che rivestono il tratto respiratorio. Il sequenziamento di una singola cellula e la mappatura in situ dell'RNA del tratto respiratorio umano mostrano che l'espressione di ACE2 e TMPRSS2 è più alta nelle cellule epiteliali nasali ciliate, con quantità minori nelle cellule epiteliali bronchiali ciliate e nelle cellule epiteliali alveolari di tipo II. Ciò si traduce in una maggiore permissività delle cellule epiteliali del tratto respiratorio superiore rispetto a quello inferiore per l'infezione da SARS-CoV-2 in vitro e si adatta alla patologia della malattia: i sintomi del tratto respiratorio superiore sono comuni all'inizio della malattia, con tamponi nasofaringei e faringei positivi per SARS-CoV-2 a presentazione clinica.

SARS-Cov-1/SARS-Cov-2

A differenza di SARS-CoV, l'infettività dei pazienti con SARS-CoV-2 raggiunge un picco prima dell'insorgenza dei sintomi. In effetti, la trasmissione presintomatica rende impossibile il contenimento di SARS-CoV-2 attraverso il solo isolamento del caso ed è un fattore chiave della pandemia. Questa alterazione nel modello della malattia può essere correlata all'acquisizione del

sito di scissione della furina nello spike o all'aumento dell'affinità di legame per ACE2 in SARS-CoV-2, rispetto a SARS-CoV .

Ignoriamo il significato della distribuzione topografica di ACE2

Se il ruolo principale di ACE2 è quello di scindere l'angiotensina II, non è chiaro perché l'espressione nel tessuto polmonare sia più prominente nelle cellule epiteliali che nelle cellule endoteliali. Inoltre, l'Atlante delle cellule umane evidenzia l'espressione di ACE2 negli enterociti intestinali, piuttosto che nei polmoni. Questa distribuzione può riflettere ruoli non enzimatici di ACE2, come i trasportatori di amminoacidi chaperoning. In effetti, l'infezione da SARS-CoV-2 del tratto gastrointestinale (GI) è comune, con RNA virale rilevabile nelle feci fino al 30% dei pazienti COVID-19. Questo probabilmente contribuisce alla frequenza dei sintomi gastrointestinali. Al contrario, mentre si pensa che la trasmissione fecale-orale dei coronavirus sia prominente tra i pipistrelli, sembra essere una via di trasmissione minore per SARS-CoV-2 nell'uomo, forse perché il fluido del colon inattiva il virus.

Non è chiaro se l'espressione extrapolmonare di ACE2 e l'infezione virale concomitante rappresentino altre manifestazioni cliniche di SARS-CoV-2. L'associazione tra infezione da SARS-CoV-2 e anosmia (perdita dell'olfatto) può riflettere l'espressione di ACE2 e TMPRSS2 nelle cellule sustentcolari, che mantengono l'integrità dei neuroni sensoriali olfattivi. Anche le cellule epiteliali olfattive esprimono NRP1 e potrebbero fornire una via diretta al cervello .

Sebbene una percentuale sostanziale di individui con infezione da SARS-CoV-2 riporti pochi o nessun sintomo e si riprenda completamente, la tomografia computerizzata del torace (TC) evidenzia di polmonite virale è presente in > 90% dei casi sintomatici entro 3-5 giorni dall'esordio. Ciò riflette presumibilmente la replicazione virale nel tratto respiratorio inferiore, con infezione di pneumociti di tipo II e infiammazione associata. La patologia polmonare in questa fase iniziale è scarsamente segnalata perché la maggior parte dei pazienti guarisce.

Le scimmie cynomolgus

L'istopatologia da scimmie cynomolgus, 4 giorni dopo l'inoculazione con SARS-CoV-2, mostra una polmonite virale con edema alveolare, perdita capillare, infiltrazione di cellule infiammatorie, ispessimento interstiziale e fusione cellulare (caratteristica dell'infezione da coronavirus), con espressione di picco virale su cellule epiteliali alveolari.

I "sommersi" e i "salvati"

Circa l'80% dei pazienti con polmonite da COVID-19 guarisce senza un trattamento specifico. Tuttavia, 20% dei pazienti peggiora, spesso rapidamente, da 7 a 10 giorni dopo l'insorgenza dei sintomi. Questo è il momento in cui i pazienti sono più frequentemente ricoverati in ospedale, con peggioramento della febbre, ipossia, linfopenia, aumento dei marker infiammatori [proteina C reattiva (CRP), interleuchina-1 (IL-1) e IL-6], coagulopatia e coinvolgimento cardiovascolare . Circa il 25% di questi pazienti richiederà la ventilazione meccanica, che è associata ad un'elevata mortalità (dal 50 all'80%).

La demografia di questo gruppo "a rischio" è riprodotta in molti paesi: uomini più anziani con ipertensione, diabete e obesità, nonché un contributo meno ben definito dell'etnia . Fattori simili regolano l'espressione di ACE2, che può quindi contribuire alla gravità della malattia. Tuttavia, la quantità e la distribuzione dell'espressione di ACE2 non possono essere l'unico fattore che influenza la progressione della malattia, perché i tre coronavirus umani che utilizzano ACE2 per l'ingresso delle cellule mostrano una patogenicità notevolmente diversa.

Quali sono le cause del forte deterioramento che porta a un grave COVID-19 sistemico?

La patologia polmonare nella malattia grave è diversa dalla precedente polmonite, con progressiva perdita dell'integrità epiteliale-endoteliale, danno capillare settale e marcata infiltrazione neutrofila, con deposizione di complemento, deposizione di antigene virale intravascolare e coagulazione intravascolare localizzata. Se la precedente polmonite virale riflette l'infezione diretta mediata da ACE2 dei pneumociti di tipo II, cosa determina questa fase successiva, potenzialmente mortale, di danno polmonare acuto, con la concomitante rottura della barriera epiteliale respiratoria, danno endoteliale e deterioramento del paziente?

Ancora più importante: come può essere fermato?

La tempistica del deterioramento suggerisce un ruolo per il sistema immunitario adattativo, sia per gli anticorpi che per i linfociti T, e ha molte caratteristiche dell'infiammazione guidata dal sistema immunitario. Il danno endoteliale può derivare da un danno immuno-mediato, attraverso l'attivazione del complemento, il potenziamento anticorpo-dipendente e/o il rilascio di citochine. L'attenzione si è quindi focalizzata sull'uso di terapie immunomodulanti nei pazienti con malattia grave. Tuttavia, il colpevole più evidente di una malattia grave è il virus stesso, da solo o con patologia immunitaria. La rottura della barriera epitelio-endoteliale polmonare potrebbe innescare il danno endoteliale e la disseminazione virale, con un'infezione più).

Le domande senza risposta della tempistica

Gli studi che documentano il decorso temporale della diffusione dell'RNA SARS-CoV-2 sono principalmente limitati alla malattia lieve e in genere mostrano un declino progressivo dopo un picco intorno all'insorgenza dei sintomi. Tuttavia, la carica virale dei tamponi polmonari può essere correlata alla gravità della malattia e i pazienti con grave malattia polmonare rimangono RNA-positivi più a lungo. È fondamentale determinare per quanto tempo la replicazione virale attiva persiste realmente nei polmoni dei pazienti con malattia grave e con quale frequenza si verifica la replicazione virale nei siti extrapolmonari in cui è espresso ACE2 (o altri recettori), come l'endotelio vascolare.

Sarebbe meglio prevenire

Sebbene ci siano enormi sforzi per comprendere e trattare il COVID-19 grave, sarebbe preferibile prevenire lo sviluppo e la progressione della malattia clinica. Come si potrebbe ottenere questo? I candidati al vaccino mirano principalmente a suscitare anticorpi neutralizzanti, per prevenire il legame del picco all'ACE2. La stessa logica è alla base dell'uso dell'immunizzazione passiva, con plasma convalescente o anticorpi monoclonali, o della somministrazione di ACE2 ricombinante e solubile. In alternativa, i farmaci antivirali possono essere utilizzati per colpire enzimi virali essenziali come l'RNA polimerasi RNA-dipendente. L'esperienza di altre infezioni, come l'influenza, sottolinea che il trattamento con agenti antivirali è più efficace se somministrato il prima possibile in caso di infezione.

Identificare quelli che rischiano di più

Perciò, è essenziale identificare gli individui con infezione precoce da SARS-CoV-2 che sono ad alto rischio di progressione verso una malattia grave e testare terapie antivirali per prevenire l'ingresso e la replicazione virale. Non dovrebbe essere troppo difficile identificare questi pazienti "a rischio" che sono in pericolo di progredire verso una malattia grave attraverso la ricerca e il test dei contatti, anche prima dell'insorgenza dei sintomi. Al contrario, ritardare il trattamento antivirale candidato fino a quando i pazienti non vengono ricoverati in ospedale con gravi lesioni polmonari

può essere troppo tardi ed è probabile che sia necessaria la combinazione con la modulazione immunitaria.

Ogni spiegazione dà origine a una nuova domanda a un livello più profondo. (Joseph E. Stiglitz).

To be continued...